

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto**

**Deborah dos Reis Estrella**

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GENÉTICA ENTRE VARIANTES COMUNS E  
RARAS E DA SOBREVIVÊNCIA NA FIBROSE PULMONAR FAMILIAR**

**Belo Horizonte  
2023**

**Deborah dos Reis Estrella**

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GENÉTICA ENTRE VARIANTES COMUNS E RARAS E DA SOBREVIDA NA FIBROSE PULMONAR FAMILIAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde do Adulto.

Orientador: Prof. Ricardo de Amorim  
Corrêa  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Eliane Viana  
Mancuzo

**Belo Horizonte**

**2023**

Estrella, Deborah dos Reis.  
ES82a Avaliação da interação genética entre variantes comuns e raras e da  
sobrevida na fibrose pulmonar familiar / Deborah dos Reis Estrella -- Belo  
Horizonte: 2023.  
128f.: il.

Orientador: Ricardo de Amorim Corrêa.

Coorientadora: Eliane Viana Mancuzo.

Área de concentração: Pneumologia. Doenças respiratórias.

Tese (Doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de  
Medicina.

1. Doenças Pulmonares Intersticiais. 2. Fibrose Pulmonar. 3. Dispneia.  
4. Sobrevida. 5. Genética. 6. Dissertação Acadêmica. I. Corrêa, Ricardo de  
Amorim. II. Mancuzo, Eliane Viana. III. Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WF 654

Bibliotecário responsável: Monaliza Maria da Silveira Caires Lima CRB-6/1707



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO  
**ATA DE DEFESA DE TESE**

Às 14:00 horas do dia doze de dezembro de dois mil e vinte e três, sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **DEBORAH DOS REIS ESTRELLA**, número de registro 2020661041, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO. A presidência da sessão coube ao professor Ricardo de Amorim Corrêa, Orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Ricardo de Amorim Corrêa - Orientador (UFMG), Eliane Viana Mancuzo - Coorientadora (UFMG), Maria Raquel Soares (UNIFESP) - participação a distância, Carlos Alberto de Castro Pereira (UNIFESP) - participação a distância, Fábio Eiji Arimura (USP) - participação a distância e Paulo Henrique Costa Diniz (UFMG). Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: **AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GENÉTICA ENTRE VARIANTES COMUNS E RARAS E DA SOBREVIVÊNCIA NA FIBROSE PULMONAR FAMILIAR**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar aprovada a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da Comissão. Conforme artigo 77 das Normas Gerais de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese será pública. A aluna e os membros da Comissão estão cientes e autorizaram a gravação da defesa, que ficará disponibilizada em acervo da Faculdade de Medicina. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Viana Mancuzo, Professora do Magistério Superior**, em 15/12/2023, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Costa Diniz, Membro**, em 15/12/2023, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo de Amorim Correa, Professor do Magistério Superior**, em 15/12/2023, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Raquel Soares, Usuária Externa**, em 16/12/2023, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitora**

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

**Vice-Reitor**

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

**Pró-Reitora de Pós-Graduação**

Profa. Isabela Almeida Pordeus

**Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Fernando Marcos dos Reis

**FACULDADE DE MEDICINA**

**Diretora da Faculdade de Medicina**

Profa Alamanda Kfourri Pereira

**Chefe do Departamento de Clínica Médica**

Prof. Márcio Weissheimer Lauria

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO  
ADULTO**

**Coordenadora**

Profa. Luciana Costa Faria

**Subcoordenadora**

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

**Colegiado**

Profa. Claudia Alves Couto

Prof. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Luciana Costa Faria

Profa. Karina Braga Gomes Borges

Profa. Adriana Maria Kakehasi

Profa. Melissa Orlandin Premaor

Fábia Carolina Pereira Resende – Discente Titular

Grazielle Duarte de Oliveira – Discente Suplente

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Eliane Viana Mancuzo e ao professor Ricardo de Amorim Corrêa, que foram parte fundamental dessa caminhada de seis anos até a conclusão desse projeto. Agradeço pela disponibilidade em me ensinarem tanto e por contribuírem de maneira especial na minha formação, tanto profissional quanto pessoal. Fui agraciada pela oportunidade de trabalhar com vocês.

Agradeço a parceria com Professor Rodrigo Calado e seu grupo, em especial Flávia Donaires e André Pinto, que nos ajudaram na realização do sequenciamento genético e na escrita de um dos artigos.

Agradeço também aos professores Carlos Alberto de Castro Pereira e Maria Raquel Soares pela colaboração na condução e na redação de um dos artigos.

Aos pacientes, pela confiança e por aceitarem participar da condução dessa pesquisa.

Aos meus familiares e amigos, agradeço ao apoio e torcida pelo meu sucesso.

## RESUMO

**Introdução:** A fibrose pulmonar familiar (FPF) é definida como a presença de doença pulmonar intersticial (DPI) de qualquer etiologia, em dois ou mais familiares – de primeiro ou segundo grau de parentesco - de uma mesma família. O quadro clínico da FPF é o mesmo das formas esporádicas de DPI e dados sobre a sua sobrevida ainda são escassos. A genética pode contribuir apontando potenciais biomarcadores com valor prognóstico e/ou de resposta ao tratamento.

**Objetivos:** Objetivo primário foi investigar a interação gene-gene e do comprimento telomérico com variantes genéticas raras e comuns em uma coorte de pacientes brasileiros. Secundariamente, buscou-se avaliar o impacto dessas variantes genéticas e também de fatores clínicos na sobrevida de pacientes com FPF.

**Metodologia:** FPF foi definida de acordo com as diretrizes atuais. Para atender ao objetivo primário, foram incluídos 82 casos-índice de FPF e 44 participantes com telomeropatia sem envolvimento pulmonar como controles. Foram avaliadas a presença do alelo de risco MUC5B (rs35705950), da variante TOLLIP, de variantes comuns de TERT e de variantes raras do gene da biologia dos telômeros. Comparou-se a frequência dos alelos de variantes comuns a bancos de dados públicos de genoma (*Genome Aggregation Database* e *Online Archive of Brazilian Mutations*). Foi considerado enriquecido quando a presença de alguma das variantes comuns era mais frequente na amostra com FPF que nos bancos de dados. Foi criado um modelo de árvore de inferência condicional para classificar os subgrupos dos participantes, segundo as variantes genéticas, de acordo com as variáveis idade, sexo, comprimento telomérico, *status* das variantes comuns TOLLIP e MUC5B rs35705950. Para verificar os objetivos secundários, foram incluídos casos incidentes de pacientes com FPF e fenótipos de fibrose pulmonar idiopática (FPI) e pneumonite por hipersensibilidade fibrótica (PHf) (F-FPI e F-PHf, respectivamente) e pacientes com FPI e PHf sem história familiar (não – F-FPI e não – F-PHf, respectivamente) como controles. Os pacientes foram acompanhados de 1º de janeiro de 2007 até o óbito ou 31 de maio de 2022. As variáveis relacionadas à sobrevida foram estimadas por meio de regressão univariada e multivariada de Cox e método proporcional anterógrado. As variáveis que apresentaram diferença estatística ( $p < 0.05$ ) entre os grupos familiar e não familiar foram controladas antes de estimar as curvas de sobrevivência. A sobrevida foi estimada pelo método de Kaplan-Meier e as curvas comparadas pelo Log-Rank. O nível de significância adotado foi de 5%.

**Resultados:** No total, foram incluídos 101 participantes com FPF e 132 com DPI não familiar. Na análise primária, variantes raras foram identificadas em 24 casos de FPF, dos quais 18 (22%) apresentavam também telômeros curtos e foram classificados como telômeros relacionados (TR)-FPF. Participantes que apresentavam ou telômeros curtos ou variante rara (mas nunca os dois ao mesmo tempo), foram classificados como não-TR-FPF. Os participantes com TR-FPF tiveram sobrevida global inferior à dos não-TR-FPF (61.2 [13.1 - 83.1] vs. 115.5 [71.9 - 179.7] meses, respectivamente;  $p=0.0006$ ). Os alelos das variantes comuns MUC5B rs35705950 e TOLLIP foram mais frequentes entre participantes com FPF do que em bancos de dados de genoma públicos,  $p < 0.003$ . As variantes comuns do TOLLIP foram enriquecidas nos casos não TR-FPF ( $p < 0,001$ ), mas não no TR-FPF. Em contraste, o MUC5B rs35705950 foi enriquecido em ambos os grupos, mas em pacientes com telomeropatia sem envolvimento pulmonar, sua frequência foi comparável à dos controles. Usando a árvore de inferência condicional, o status do MUC5B previu corretamente a FPF em 76% dos casos com variantes raras da biologia dos telômeros. Na análise secundária foram avaliados 198 participantes, 88 com diagnóstico de FPI e 110 com PHf. Na coorte de FPI, 52 pacientes eram não – F-FPI e 36 F-FPI. No grupo PHf, foram incluídos 80 pacientes não – F-PHf e 30 pacientes F-PHf. Os pacientes de ambos os grupos de F-FPI e F-PHf apresentaram curvas de sobrevida semelhantes e inferiores às das formas não familiares de FPI e HPf. A sobrevida mediana para o grupo FPF foi de 46 meses em comparação com 75 meses da apresentação não familiar.

**Conclusão:** Variantes raras do gene da biologia dos telômeros, telômeros curtos e o alelo MUC5B rs35705950 cooperam no desenvolvimento da FPF. Variantes do *TOLLIP* aumentam o risco de fibrose pulmonar em pacientes não-TR-FPF apenas. A combinação de dados genéticos pode ajudar a identificar o subconjunto de pacientes com telomeropatia com maior probabilidade de desenvolver doença pulmonar e fornecer informações sobre sua patogênese. Pacientes com FPI e PHf nas formas familiares apresentam sobrevida aproximadamente 2,5 anos menor que pacientes com as mesmas etiologias, mas em apresentação esporádica.

**Palavras – chave:** Doenças pulmonares intersticiais; genética; fibrose pulmonar; dispneia; sobrevida.



## ABSTRACT

**Introduction:** Familial pulmonary fibrosis (FPF) is defined as the presence of interstitial lung disease (ILD) of any etiology, in two or more relatives – first or second degree – from the same family. The clinical presentation of FPF is the same as that of sporadic forms of ILD and data on survival are still scarce. Genetics can contribute by pointing out potential biomarkers with prognostic value and/or response to treatment.

**Aims/Objectives:** Primary objective was to investigate gene-gene and telomeric length interactions with rare and common genetic variants in a cohort of Brazilian patients. Secondly, we sought to evaluate the impact of these genetic variants and also of clinical factors on the survival of patients with FPF.

**Methods:** FPF was defined according to current guidelines. To meet the primary outcome, 82 index cases of FPF and 44 participants with telomeropathy without lung involvement were included as controls. The presence of the MUC5B risk allele (rs35705950), the TOLLIP variant, common TERT variants and rare variants of the telomere biology gene were evaluated. The frequency of alleles of common variants was compared to public genome databases (Genome Aggregation Database and Online Archive of Brazilian Mutations). It was considered enriched when the presence of any of the common variants was more frequent in the FPF sample than in the databases. A conditional inference tree model was created to classify subgroups of participants, according to genetic variants, according to the variables age, sex, telomeric length, status of the common TOLLIP and MUC5B rs35705950 variants. To evaluate the secondary outcomes, we included incident cases of patients with FPF and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and fibrotic hypersensitivity pneumonitis (PHf) phenotypes (F-FPI and F-PHf, respectively) and patients with IPF and PHf without a history of family (non-F-FPI and non-F-PHf, respectively) as controls. Patients were followed from January 1, 2007 until death or May 31, 2022. Variables related to survival were estimated using univariate and multivariate Cox regression and antegrade proportional method. The variables that showed a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the family and non-family groups were controlled before estimating the survival curves. Survival was estimated using the Kaplan-Meier method and curves compared using Log-Rank. The significance level adopted was 5%.

**Results:** 101 participants with FPF and 132 with non-familial ILD were included. In the primary analysis, rare variants were identified in 24 cases of FPF, of which 18 (22%) also had short telomeres and were classified as telomere related (TR)-FPF.

Participants who had either short telomeres or a rare variant (but never both at the same time) were classified as non-TR-FPF. Participants with TR-FPF had lower overall survival than those without TR-FPF (61.2 [13.1 - 83.1] vs. 115.5 [71.9 - 179.7] months, respectively,  $p=0.0006$ ). Alleles of the common variants MUC5B rs35705950 and TOLLIP were more frequent among participants with FPF than in public genome databases,  $p < 0.003$ . Common TOLLIP variants were enriched in non-TR-FPF cases ( $p < 0.001$ ) but not in TR-FPF. In contrast, MUC5B rs35705950 was enriched in both groups, but in patients with telomeropathy without lung involvement, its frequency was comparable to that in controls. Using the conditional inference tree, MUC5B status correctly predicted FPF in 76% of cases with rare telomere biology variants. In the secondary analysis, 198 participants were evaluated, 88 diagnosed with IPF and 110 with PHf. In the IPF cohort, 52 patients were non-F-IPF and 36 F-IPF. In the PHf group, 80 non-F-PHf patients and 30 F-PHf patients were included. Patients in both the F-IPF and F-PHf groups had survival curves similar and inferior to those in the non-familial forms of IPF and PHf. Median survival for the FPF group was 46 months compared with 75 months for the nonfamilial presentation.

**Conclusion:** Rare variants of the telomere biology gene, short telomeres and the MUC5B rs35705950 allele cooperate in the development of FPF. TOLLIP variants increase the risk of pulmonary fibrosis in non-TR-FPF patients only. Combining genetic data can help identify the subset of patients with telomeropathy most likely to develop lung disease and provide insights into its pathogenesis. Patients with IPF and PHf in familial forms have a survival rate approximately 2.5 years shorter than patients with the same etiologies, but in sporadic presentation.

**Key words:** Interstitial lung diseases, genetic; pulmonary fibrosis; dyspnea; survival.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Classificação das doenças pulmonares intersticiais .....	25
Figura 2. Fluxograma de diagnóstico de pneumonite por hipersensibilidade fibrosante de acordo com padrão tomográfico, achados no lavado broncoalveolar e histopatologia .....	28
Figura 3. Algoritmo para diagnóstico de pneumonite por hipersensibilidade fibrótica e não fibrótica .....	29
Figura 4. Contribuição das variantes raras e comuns para o risco de fibrose pulmonar idiopática .....	34
Figura 5. Efeito das variantes genéticas no desenvolvimento da fibrose pulmonar familiar .....	38
Figura 6. Delineamento do estudo .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos padrões tomográficos das doenças intersticiais pulmonares idiopáticas .....	23
Tabela 2. Definição de fibrose pulmonar progressiva (FPP) .....	32
Tabela 3. Painel customizado de sequência incluindo éxons de 154 genes (SRG, TRG, biologia dos ribossomos, reparação de DNA, hematopoiese, resposta imune) e regiões intrônicas/regulatórias dos polimorfismos comuns da FPF (TERT, TOLLIP e MUC5B) .....	49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCA3	Gene associado à proteína do surfactante
<i>ABraOM</i>	<i>Brazilian genomic variants</i>
AF	Allele frequency
ANOVA	Análise variância
API	Anormalidades pulmonares intersticiais
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
ATS/ERS/JRS/ALAT	<i>American Thoracic Society/ European Respiratory Society/ Japanese Respiratory Society/ Associação Latino-americana do Tórax</i>
BR-DPI	Bronquiolite respiratória associada a doença pulmonar intersticial
CVF	Capacidade vital forçada
DCO	Difusão de monóxido de carbono
DKC1	Proteína da enzima telomerase
DMD	Discussões multidisciplinares
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPI - NC	Doença pulmonar intersticial não classificável
DPI	Doenças pulmonares intersticiais
DTC	Doenças do tecido conjuntivo
EDTAK2	ácido etilenodiamino tetra-acético dipotássico
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
FA	Frequência alélica
FPF	Fibrose pulmonar familiar
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
FPP	Fibrose pulmonar progressiva
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
HC UFMG	Hospital das clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HC USPRP	Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo campi Ribeirão Preto
ILD	Interstitial lung disease
LBA	Lavado broncoalveolar
mL	Mililitros
mMRC	<i>modified Medical Research Council</i>
MUC5B	Mucina 5 subtipo B
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
Non-lung TBD	<i>Non-lung telomere–biology disease</i>

Non-TR-FPF *Non-telomere related familial pulmonary fibrosis*  
PH Pneumonite por hipersensibilidade  
PHf Pneumonite por hipersensibilidade fibrótica  
PIA Pneumonia intersticial aguda  
PIAI Pneumonia intersticial com achados autoimunes  
PID Pneumonia intersticial descamativa  
PII Pneumonias intersticiais idiopáticas  
PIL Pneumonia intersticial linfocítica  
PINE Pneumonia intersticial não específica  
PIU Pneumonia intersticial usual  
POC Pneumonia em organização criptogênica  
RNA Ácido ribonucleico  
RTEL1 Proteína da enzima telomerase  
SBPT Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia  
SFTPA Gene associado ao surfactante da proteína A  
SFTPA2 Gene associado à proteína do surfactante  
SFTPB Gene associado ao surfactante da proteína B  
SFTPC Gene associado ao surfactante da proteína C  
SFTPD Gene associado ao surfactante da proteína D  
SNPs *Single nucleotide polymorphisms*  
SP-A Surfactante associado à proteína A  
SP-B Surfactante associado à proteína B  
SP-C Surfactante associado à proteína C  
SP-D Surfactante associado à proteína D  
SpO<sub>2</sub> Saturação periférica de oxigênio  
SRG Genes responsáveis pela homeostasia do surfactante  
TCAR Tomografia computadorizada de tórax em alta resolução  
TERC RNA componente da enzima telomerase  
TERT Proteína da enzima telomerase  
TIN2 Proteína da enzima telomerase  
TOLLIP *Toll-interacting protein gene*  
TR-FPF *Telomere related familial pulmonary fibrosis*  
TRF Fragmentos de restrição teloméricos  
TRG Genes responsáveis pela homeostasia dos telômeros

UNIFESP Universidade Federal do estado de São Paulo

USPRP Universidade de São Paulo campi Ribeirão Preto

VEF<sub>1</sub> / CVF Relação entre o volume expiratório forçado do primeiro segundo e a capacidade vital forçada

VEF<sub>1</sub> Volume expiratório forçado do primeiro segundo

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	21
2.1	Doenças pulmonares intersticiais .....	21
2.1.1	Classificação e epidemiologia .....	21
2.1.1 a)	Doenças pulmonares intersticiais secundárias às doenças do tecido conjuntivo.....	26
2.1.1 b)	Pneumonite por hipersensibilidade .....	26
2.1.1 c)	Fibrose pulmonar idiopática.....	30
2.1.1 d)	Fibrose pulmonar progressiva .....	31
2.2	Apresentação clínica .....	32
2.3	A investigação genética e molecular nas doenças pulmonares intersticiais ....	33
2.4	Fibrose pulmonar familiar.....	35
2.4.1	Epidemiologia da fibrose pulmonar familiar .....	36
2.4.2	Genética na fibrose pulmonar familiar .....	37
2.4.2 a)	Genes associados a homeostase dos telômeros .....	39
2.4.2 b)	Genes associados a homeostase do surfactante.....	39
2.4.2 c)	Variantes genéticas comuns.....	40
3.	JUSTIFICATIVA .....	41
4.	OBJETIVOS .....	43
4.1	Objetivo primário.....	43
4.2	Objetivos secundários .....	43
5.	METODOLOGIA.....	44
5.1	Delineamento do estudo.....	44
5.2	Critérios de inclusão e exclusão .....	45
5.2.1	Critérios de inclusão .....	45
5.2.2	Critérios de exclusão .....	45
5.3	Variáveis clínicas, funcionais, tomográficas e histopatológicas.....	45
5.3.1	Variáveis descritivas .....	45
5.3.2	Testes de função pulmonar .....	46
5.3.3	Tomografia de tórax em alta resolução (TCAR) .....	46
5.3.4	Histopatologia .....	47
5.4	Identificação da etiologia da doença pulmonar intersticial.....	47
5.5	Variáveis genéticas realizadas.....	47
5.5.1	Análise genética.....	47
5.5.1 a)	Avaliação do comprimento telomérico .....	50
5.5.1 b)	Sequenciamento genético .....	50
5.6	Amostragem.....	52
5.7	Análise estatística .....	53
5.8	Considerações éticas .....	54
6.	NOTA EXPLICATIVA .....	55



7.	RESULTADOS.....	56
7.1	Artigo 01.....	56
	Title: Common and rare genetic variant interaction in familial pulmonary fibrosis	
	.....	56
	ABSTRACT.....	58
	INTRODUCTION.....	60
	METHODS.....	61
	RESULTS.....	63
	DISCUSSION.....	67
	REFERENCES.....	71
7.2	Artigo 02.....	89
	Title: Survival in familial idiopathic pulmonary fibrosis and fibrotic hypersensitivity	
	pneumonitis.....	89
	INTRODUCTION.....	90
	METHODS.....	90
	RESULTS.....	91
	DISCUSSION.....	91
	REFERENCES.....	93
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
10.	APÊNDICES.....	112
11.	ANEXOS.....	119

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças pulmonares intersticiais (DPI) são um grupo heterogêneo de alterações de parênquima pulmonar com variabilidade clínica, radiológica e histopatológica que resultam em fibrose pulmonar.<sup>(1-3)</sup> Dentre as causas de DPI incluem-se as doenças intersticiais associadas à doenças do tecido conjuntivo (DTC), doenças associadas a exposições ambientais e inalações de partículas - sendo a pneumonite por hipersensibilidade (PH) a mais prevalente deste grupo - doenças císticas, sarcoidose, além de formas idiopáticas e não classificadas de DPI.<sup>(2, 4)</sup> Algumas formas de DPI podem ter evolução rapidamente progressiva com piora dos sintomas, da função pulmonar, da qualidade de vida e aumento do risco de morte.<sup>(2)</sup>

Entre as décadas de 1950 e 1970 a publicação de algumas séries de casos apontaram para uma possível predisposição genética à ocorrência de fibrose pulmonar sugerida pela alta prevalência da doença em famílias de pacientes com diagnóstico da forma idiopática.<sup>(5, 6)</sup> Estes primeiros estudos reforçaram a hipótese da associação entre alterações genéticas e ambientais e conduziram ao desenvolvimento de técnicas de investigação em genética humana e da compreensão da fisiopatologia das formas familiares de DPI.<sup>(5, 6)</sup> Os estudos mostraram que a associação familiar ocorre em diversas etiologias de DPI e que se apresenta sob a forma de vários padrões de acometimento pulmonar à tomografia computadorizada do tórax de alta resolução (TCAR), confirmando a heterogeneidade da fibrose pulmonar familiar (FPF).<sup>(1, 7, 8)</sup> Posteriormente, a FPF foi definida como a ocorrência de qualquer DPI em dois ou mais familiares de primeiro grau ou segundo grau de parentesco.<sup>(7)</sup> Estima-se que até 20% dos casos de fibrose pulmonar idiopática (FPI) têm associação familiar e que em até 80% dos casos os fenótipos de DPI são discordantes sendo, portanto, mais prevalente do que se acreditava inicialmente.<sup>(9, 10)</sup> Adicionalmente, os dados disponíveis colocam a história familiar como um forte fator de risco para progressão da DPI e de pior sobrevida.<sup>(1, 11)</sup>

Novos estudos trouxeram informações sobre alterações genéticas envolvendo, principalmente, os genes responsáveis pela homeostasia dos telômeros (*telomere related genes* - TRG) e do surfactante pulmonar (*surfactant related genes* - SRG) na FPF.<sup>(12, 13)</sup> Além disso, mais de 10 variantes genéticas raras já foram identificadas e associadas a evolução para fibrose pulmonar.<sup>(12)</sup> A partir dos dados desses estudos pôde-se afirmar que a FPF tem um padrão de herança autossômica dominante com

penetrância variável.<sup>(12)</sup> Entretanto, não se pode falar em características clínicas ou histopatológicas distintas da FPF daquelas que ocorrem nas formas esporádicas de DPI, fato que dificulta o diagnóstico precoce de casos e de indivíduos sob maior risco de acometimento. A genética pode contribuir apontando potenciais biomarcadores com valor prognóstico e/ou de resposta ao tratamento. Graças ao grande avanço neste campo, em 2022 houve a publicação de um manual para investigação genética em pacientes com FPF.<sup>(13)</sup>

Diante do exposto, pretendeu-se, primariamente, com o presente estudo investigar a interação genética e do comprimento telomérico com variantes genéticas raras e comuns em uma coorte de pacientes brasileiros. Secundariamente, buscou-se avaliar o impacto dessas variantes genéticas e também de fatores clínicos na sobrevida de pacientes com FPF.

## 2. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

### 2.1 Doenças pulmonares intersticiais

#### 2.1.1 Classificação e epidemiologia

A classificação atual das DPI inclui grupos de patologias que acometem o parênquima pulmonar, caracterizadas pela infiltração de células inflamatórias, fibrose e proliferação de células que participam da parede alveolar.<sup>(14)</sup> As DPI são um grupo heterogêneo de afecções que apresentam achados clínicos, funcionais e radiológicos semelhantes.<sup>(3)</sup> As causas de DPI podem ser conhecidas ou se apresentar de forma idiopática ou, ainda, podem estar associadas a doenças autoimunes e exposições inalatórias ambientais, dentre outras.<sup>(14, 15)</sup>

No final da década de 80 o uso da TCAR permitiu avanços na caracterização das DPI por meio de estudos de correlação histológica e radiológica.<sup>(16, 17)</sup> Na primeira classificação histológica, proposta por Liebow e Carrington, foram sugeridas cinco apresentações histológicas distintas para as pneumonias intersticiais idiopáticas (PII): pneumonia intersticial usual (PIU), pneumonia intersticial descamativa (PID), pneumonia intersticial com bronquiolite, pneumonia intersticial linfoide (PIL) e pneumonia intersticial de células gigantes.<sup>(18)</sup> Em 1994, Katzenstein e Fiorelli descreveram um novo padrão - a pneumonia intersticial não específica (PINE) - após a avaliação de 64 casos com características histológicas e prognóstico distintos da PIU, PID e da pneumonia intersticial aguda (PIA).<sup>(19)</sup> Em 1997, Müller e Coiby sugeriram uma classificação radiológica e patológica que excluiu a PIL e a pneumonia intersticial de células gigantes - definidas como doenças linfoproliferativa e ocupacional, respectivamente - incluindo a PINE e renomeando a bronquiolite obliterante com pneumonia em organização como pneumonia em organização criptogênica (POC).<sup>(20)</sup> Em 1998, Katzenstein et al. propuseram uma classificação histológica para a síndrome clínica da FPI que compreendia os padrões de PIU, PINE, PID e PIA, cada um com suas características clínicas e prognósticas.<sup>(21)</sup> Nessa publicação, os autores sugeriram que o termo FPI fosse reservado para os casos com achados histológicos de PIU, por caracterizar pacientes com doença progressiva, de início insidioso, com pouca resposta ao tratamento e geralmente fatal.<sup>(21)</sup>

Em 2002, a *American Thoracic Society* (ATS) e a *European Respiratory Society* (ERS) publicaram um documento com a finalidade de uniformizar a terminologia e os

critérios diagnósticos empregados na classificação das PII.<sup>(22)</sup> O posicionamento das sociedades, na ocasião, sugeriu que a utilização da biópsia pulmonar cirúrgica deveria ser incorporada como padrão áureo para o diagnóstico das DPI à discussão multidisciplinar (DMD), esta última definida como um processo dinâmico entre o clínico, o radiologista e o patologista para definição do diagnóstico e da conduta a ser tomada frente a um caso de fibrose pulmonar.<sup>(22)</sup> Sete condições foram caracterizadas segundo os achados clínicos, radiológicos e histológicos: FPI, PINE, POC, PIA, bronquiolite respiratória associada a DPI (BR-DPI), PID e PIL.<sup>(22)</sup> Em 2013, a ATS e a ERS publicaram uma atualização dessa classificação.<sup>(23)</sup> As principais mudanças foram a inclusão da PINE como um padrão histológico distinto e bem definido e a adição do grupo de PII raras (pneumonia em organização aguda fibrinosa, pneumonia intersticial bronquiolocêntrica e fibroelastose pleuroparenquimatosa idiopática).<sup>(23)</sup>

Em 2011 um documento da ATS/ERS em associação com a *Japanese Respiratory Society* e *Associação Latino-americana do Tórax* (ATS/ERS/JRS/ALAT) propôs o emprego de três padrões tomográficos principais para a classificação das TCAR na FPI.<sup>(24)</sup> A revisão deste documento em 2018 recomendou que fosse utilizada a classificação da radiológica da TCAR para o diagnóstico de FPI em quatro padrões tomográficos, que é a classificação vigente atualmente: PIU, PIU provável, padrão indeterminado e padrão mais consistente com diagnósticos alternativos à PIU (Tabela 1).<sup>(25)</sup>

**Tabela 1. Classificação dos padrões tomográficos das doenças intersticiais pulmonares idiopáticas.**

	<b>PIU</b>	<b>PIU provável</b>	<b>Indeterminado</b>	<b>Padrões mais consistentes com diagnósticos alternativos à PIU</b>
<b>Distribuição</b>	Predomínio basal e subpleural: muitas vezes heterogênea *pode ser difusa/assimétrica	Predomínio basal e subpleural: muitas vezes heterogênea.	Predomínio basal e subpleural.	Predomínio em campos médios ou superiores, peribroncovascular, perilinfática.
<b>Características</b>	Faveolamento com ou sem bronquiectasias ou bronquiolectasias de tração periféricas  *pode associar-se a padrão reticular, vidro fosco discreto, ossificação.	Padrão reticular com bronquiectasias ou bronquiolectasias de tração periférica  *pode associar-se vidro fosco discreto	Padrão reticular discreto Pode associar-se vidro fosco ou distorção arquitetural (padrão incipiente).  *distribuição e características não sugerem um diagnóstico específico (indeterminado verdadeiro)	Sugere outros diagnósticos: cistos, mosaico extenso, predomínio de vidro fosco, micronódulos profusos, nódulos centrolobulares, consolidações.  *outros: placa/derrame pleural, dilatação esôfago, adenomegalia, erosão de clavícula.

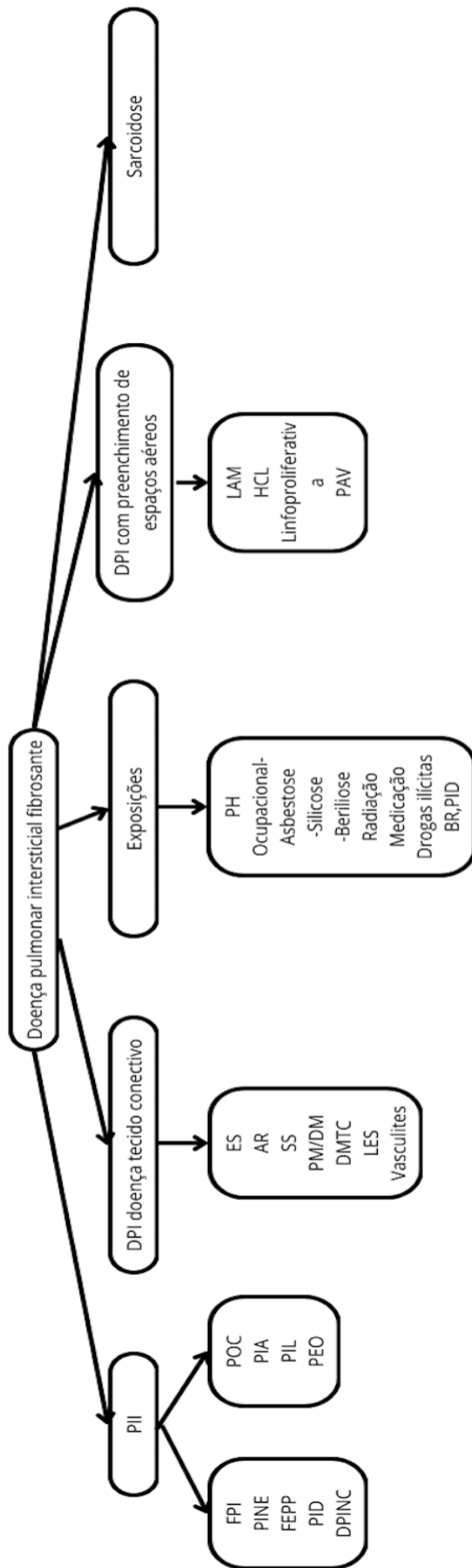
Adaptado de Raghu G et al. <sup>(25)</sup>

A última classificação da ATS/ERS/JRS/ALAT divide as DPIs em quatro subgrupos: causa conhecida (relacionadas à doença de base, ocupacional, tóxica), granulomatosas, idiopáticas e subgrupo com doenças órfãs (histiocitose de células de Langerhans, linfangioleiomiomatose), (Figura 1).<sup>(4)</sup> Esta publicação classifica-as segundo semelhanças clínicas, radiológicas e patológicas baseando-se na premissa de que identificar a etiologia subjacente afeta decisões de manejo e prognóstico.<sup>(23)</sup> No entanto, essa classificação não fornece informações para a predição de uma

resposta potencial a qualquer tipo de tratamento ou sobre o tratamento específico de cada grupo. Também é descrito uma classificação que agrupa as DPI de acordo com seu fenótipo nos seguintes padrões: predominância de alterações inflamatória, fibróticas ou mista.<sup>(26)</sup> Essa divisão se baseia no fato de as formas não fibróticas terem uma sobrevida melhor que as formas fibróticas.<sup>(26)</sup>

A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT) publicou em 2012 uma classificação para as DPI que incluiu outras categorias além das PII.<sup>(3)</sup> Nessa proposta, são categorizadas as DPI associadas à exposição ambiental ou ocupacional, DTC, doenças granulomatosas, assim como as apresentações mais raras.<sup>(3)</sup> Foram excluídas deste documento a BR-DPI e a PID, por serem decorrentes do tabagismo na maioria dos casos.<sup>(3)</sup>

Em relação a epidemiologia, os diagnósticos mais frequentes de DPI estão relacionados à DPI secundária a DTC, FPI, pneumonite por hipersensibilidade fibrótica (PHf), sarcoidose, e doença pulmonar fibrosante não classificável.<sup>(14)</sup> A prevalência das DPI é variável, pois há levantamentos nos quais a FPI consta como a causa mais comum entre as DPI idiopáticas enquanto que outros indicam sarcoidose e PHf como as formas mais frequentes.<sup>(25, 27, 28)</sup> No Brasil, um estudo epidemiológico multicêntrico realizado em 2019, envolvendo 1015 pacientes, mostrou que a DPI-DTC como a forma mais prevalente (21,7%) seguida de PHf (19%), FPI (9,6%) e FPF (8%).<sup>(29)</sup>



**Figura 1. Classificação das doenças pulmonares intersticiais.**

Legenda: PIL: pneumonites intersticiais idiopáticas; FPI-PIU: fibrose pulmonar idiopática-pneumonia intersticial usual; PINE: pneumonia intersticial não específica; FEPP: fibroelastose pleuroparenquimatosa; PID: pneumonia intersticial descamativa; DPINC: doença pulmonar intersticial não classificada; POC: pneumonite organizante criptogênica; PIA: pneumonia intersticial aguda; PIL: pneumonia intersticial linfocítica; PEO: pneumonia eosinofílica; DPI: doença pulmonar intersticial; ES: esclerose sistêmica; AR: artrite reumatoide; SS: síndrome de Sjögren; PM/DM: polimiosite/dermatomiosite inflamatórias; DMTC: doença mista do tecido conjuntivo; LES: lúpus eritematoso sistêmico; PH: pneumonite de hipersensibilidade; BR/PID: bronquiolite respiratória-pneumonite intersticial descamativa; LAM: linfangioleiomiomatose; HCL: histiocitose de células de Langerhans; PAV: proteinose alveolar.

Fonte: adaptado de Raghu G et al.<sup>(4)</sup>



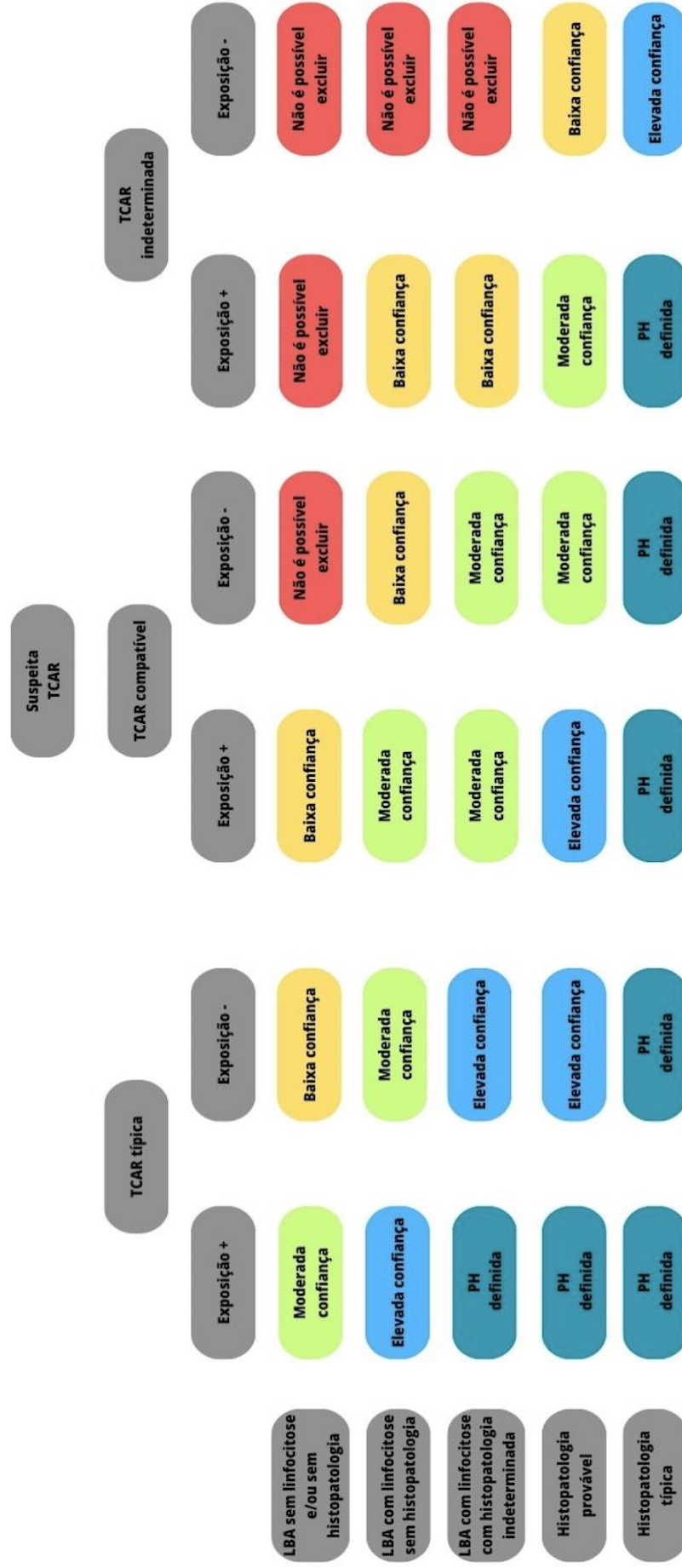
### 2.1.1 a) Doenças pulmonares intersticiais secundárias às doenças do tecido conjuntivo

As doenças do tecido conjuntivo (DTC) constituem um grupo de doenças inflamatórias imunomediadas heterogêneas, que frequentemente acometem o trato respiratório, podendo ser acometido em qualquer um de seus compartimentos, como o parênquima pulmonar, as vias aéreas, a pleura, a circulação pulmonar e musculatura respiratória.<sup>(30)</sup> É importante salientar que as alterações pulmonares podem tanto preceder como quanto acompanhar ou suceder as demais manifestações sistêmicas.<sup>(31)</sup> Além disso, as lesões pulmonares na DTC podem decorrer da própria doença, de infecções respiratórias ou ainda como reação ao tratamento instituído. Muitas drogas modificadoras de doença e biológicos comumente usados para o tratamento das DTC foram associadas as manifestações pulmonares intersticiais.<sup>(32)</sup> O tratamento envolve o uso de imunossuppressores associados ou não à corticosteroides, exceto na esclerose sistêmica em que o uso de corticosteroides contínuo não deve ser indicado.<sup>(14, 33)</sup>

### 2.1.1 b) Pneumonite por hipersensibilidade

A PH engloba um grupo de doenças pulmonares causadas pela inalação de ampla gama de partículas antigênicas, usualmente de natureza orgânica.<sup>(34)</sup> As três categorias de partículas mais prevalentes que causam PH são microbiana, proteínas animais e substâncias químicas de baixo peso molecular.<sup>(34)</sup> Anteriormente, a PH era definida de acordo com o tempo de duração até a apresentação clínica em aguda, subaguda e crônica.<sup>(34, 35)</sup> No entanto, como essa classificação não reflete o comportamento clínico da doença e o seu prognóstico, a diretriz atual recomenda a classificação da PH em PH fibrótica (PHf) e não fibrótica.<sup>(34)</sup> Nos últimos anos foram publicados duas diretrizes, com algumas semelhanças, com o objetivo de uniformizar o diagnóstico da PH.<sup>(34, 36)</sup> Os dois documentos enfatizam a importância da discussão multidisciplinar para a definição diagnóstica. A primeira diretriz utiliza o padrão tomográfico inicial como ponte para o início da classificação (Figura 2).<sup>(34)</sup> Já o segundo manual parte da presença ou ausência de exposição conhecida e considera

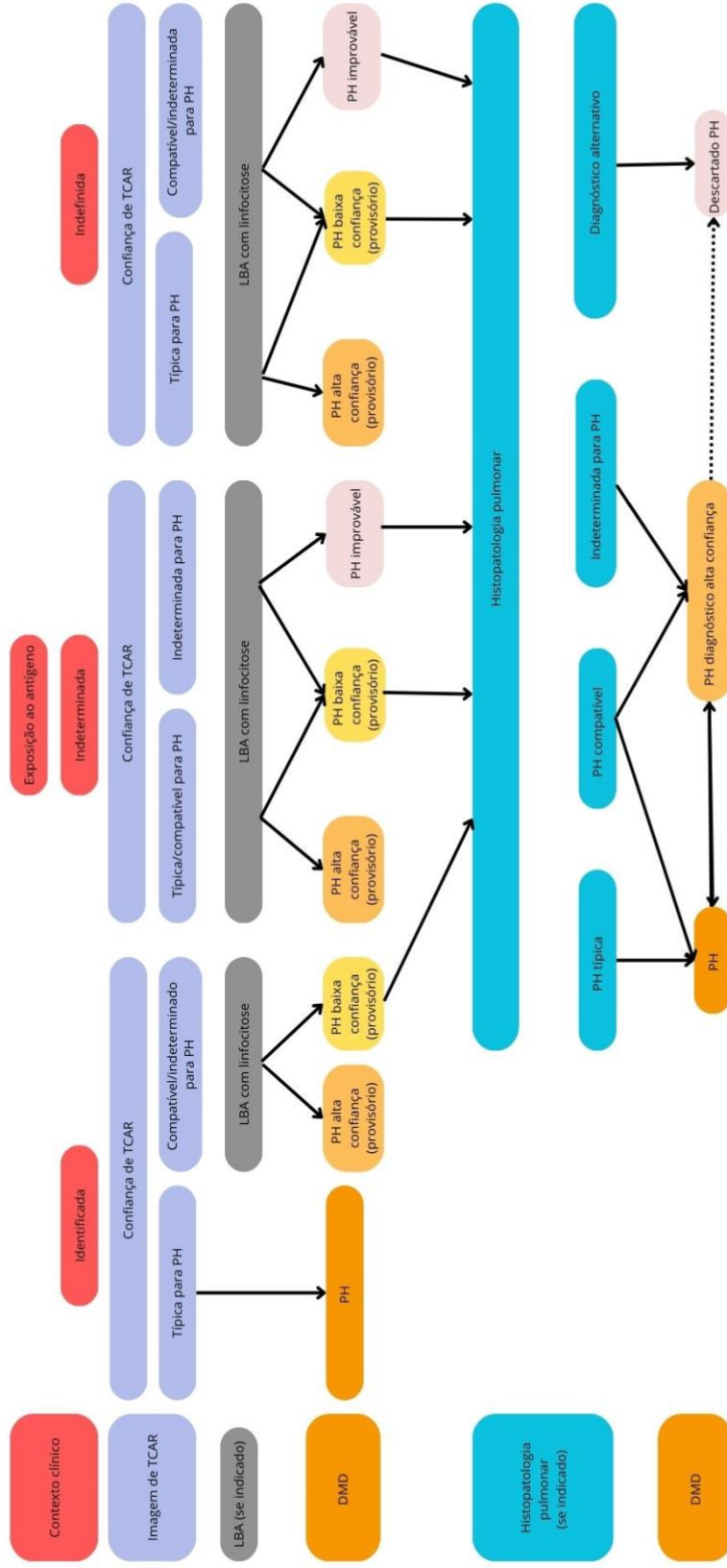
o diagnóstico definitivo quando a exposição ao antígeno é conhecida e há o padrão tomográfico típico de PH (Figura 3).<sup>(36)</sup> Os critérios de Raghu et al. incluem o diagnóstico definitivo da PHf, a presença de exposição conhecida, achados típicos de PH na TCAR (presença de distorção arquitetural com espessamento septal, bronquioloectasias com ou sem faveolamento, associado a um ou mais dentre os seguintes: nódulos centrolobulares, atenuação em mosaico, opacidades em vidro fosco, aprisionamento aéreo) e alterações histopatológicas compatíveis.<sup>(34)</sup> Na ausência de dados histopatológicos, o diagnóstico poderá ser de elevada, moderada ou baixa confiança a depender da presença ou não de linfocitose em lavado broncoalveolar (LBA), conforme as figura 2 e 3.<sup>(34)</sup>



**Figura 2. Fluxograma de diagnóstico de pneumonite por hipersensibilidade fibrosante de acordo com padrão tomográfico, achados no lavado broncoalveolar e histopatologia.**

TCAR: tomográfica computadorizada de tórax com cortes de alta resolução; LBA: lavado broncoalveolar; PH: pneumonite por hipersensibilidade.

Fonte: Adaptado de: Raghu G et al.<sup>(34)</sup>



**Figura 3. Algoritmo para diagnóstico de PH fibrótica e não fibrótica.**  
 PH=pneumonte de hipersensibilidade; TCAR = Tomografia computadorizada de alta resolução; DMD: discussão multidisciplinar.  
 Fonte: Fernandez Perez et al. (36)

O afastamento da exposição é o principal tratamento da PH o que resulta em aumento da sobrevida quando comparado àqueles que não se afastam.<sup>(37)</sup> Em relação ao tratamento medicamentoso, não há estudos randomizados, controlados por placebo que avaliaram especificamente o tratamento para PH. Naqueles pacientes que não melhoram com o afastamento e/ou que apresentam progressão da doença, podem ser usados corticosteroides. Entretanto, a evidência de benefício a longo prazo ou de lentificação da progressão da doença é fraca.<sup>(38)</sup> Embora frequente na prática clínica, o uso de imunossupressores na PH carece de evidência robusta que suporte a sua recomendação rotineira para o tratamento desses pacientes.<sup>(38)</sup> Azatioprina e micofenolato de mofetila têm sido usados nos pacientes com doença progressiva, embasados em estudos retrospectivos que mostraram estabilização e/ou melhora da função pulmonar.<sup>(39-41)</sup> Não há evidência de superioridade do micofenolato em comparação à azatioprina.<sup>(39-41)</sup> A PH tem curso clínico heterogêneo e imprevisível, podendo ocorrer a progressão da doença mesmo naqueles em manutenção com corticosteroides e que se afastaram definitivamente da exposição.<sup>(38)</sup> Em 2019, foi publicado um estudo randomizado e controlado por placebo, em que se utilizou nintedanibe em pacientes com doença pulmonar intersticial progressiva e que mostrou retardo da progressão da doença no grupo tratamento.<sup>(42)</sup> Neste estudo foram incluídos pacientes com diagnóstico de PH fibrosante progressiva, justificando a indicação do uso de nintedanibe em pacientes com PHf e perfil de fibrose pulmonar progressiva.<sup>(42)</sup>

### 2.1.1 c) Fibrose pulmonar idiopática

A FPI é a principal representante do grupo das PII e se caracteriza por ser uma doença fibrosante, crônica e progressiva, restrita aos pulmões, que acomete preferencialmente homens acima dos 50 anos de idade, aumentando a incidência em paralelo com o aumento da idade e com história de tabagismo atual ou pregresso.<sup>(24, 43)</sup> O diagnóstico de FPI é firmado na presença padrão de PIU/PIU provável na TCAR, associado à exclusão de outras causas de fibrose pulmonar, ou na presença de outros padrões na TCAR mas com histopatologia sugestiva.<sup>(4, 25)</sup> A presença de padrão PIU provável em paciente com exposição conhecida em que o achado histopatológico não

se correlacionar com FPI a definição do diagnóstico deve-se dar em discussão multidisciplinar.<sup>(44, 45)</sup>

Dessa forma, o diagnóstico de FPI baseia-se nos seguintes critérios:

- Presença de padrão PIU definido em TCAR, exclusão de outras doenças intersticiais e ausência de exposições inalatórias de acordo com questionário específico (APÊNDICE 01), ou;
- Histopatologia pulmonar confirmando FPI.

Sem tratamento, a mediana de sobrevida da FPI gira em torno de dois a três anos.<sup>(43)</sup> O uso dos antifibróticos (pirfenidona e nintedanibe) está indicado para tratamento da FPI.<sup>(46, 47)</sup> Os estudos mostram que essas medicações reduzem a taxa de declínio da capacidade vital forçada (CVF), o que ocorreu em aproximadamente 50% dos pacientes no período de 52 semanas de seguimento.<sup>(46-48)</sup> Estudos mais recentes e de vida real sugerem ainda que, além do impacto favorável dos antifibróticos na função pulmonar, esses medicamentos aumentam a sobrevida livre de progressão, reduzem a ocorrência e o tempo até a ocorrência de exacerbações e reduzem a mortalidade pela doença.<sup>(49-51)</sup> Além disso, o perfil de segurança e de eficácia foram mantidos a longo prazo.<sup>(52, 53)</sup>

#### 2.1.1 d) Fibrose pulmonar progressiva

Apesar da FPI ser a DPI com maior perfil de doença rapidamente progressiva, todas os subtipos de DPI podem se comportar desta forma.<sup>(2, 15)</sup> Estima-se que até 40% das DPI não FPI podem desenvolver o fenótipo de fibrose pulmonar progressiva (FPP).<sup>(2, 54)</sup>

Atualmente, a FPP é definida como a DPI que apresenta pelo menos dois dentre os critérios apresentados na tabela 2 no período de 12 meses de seguimento.<sup>(4)</sup> Pacientes que preenchem esses critérios, independente de serem formas familiares ou não, têm indicação do uso do antifibrótico nintedanibe a fim de reduzir a taxa de progressão da doença.<sup>(4, 42)</sup>

O fenótipo dominante de apresentação da FPP é a FPP, geralmente associada a prognóstico reservado, independente da etiologia da DPI.<sup>(13)</sup> Um estudo com 79 participantes com a forma familiar de FPI mostrou uma queda mais rápida de função pulmonar nesse grupo quando comparado com o grupo de formas esporádicas de

FPI.<sup>(55)</sup> Outro estudo com 115 participantes com DPI e alteração nos genes responsáveis pela manutenção dos telômeros estimou uma queda média da CVF de 300 ml em 12 meses.<sup>(9)</sup> A sobrevida da FPP desde o diagnóstico é reduzida, com estimativa entre 2,4 e 7,3 anos.<sup>(8, 56, 57)</sup>

### **Tabela 2. Definição de fibrose pulmonar progressiva (FPP)**

---

Em paciente com DPI de etiologia conhecida ou não, a FPP é definida como a presença de pelo menos dois dos critérios abaixo, no período de 12 meses de seguimento:

1. Piora dos sintomas respiratórios
2. Evidência de progressão de doença na função pulmonar: a) queda de CVF  $\geq 5\%$  do previsto em 12 meses; e/ou b) queda de DCO  $\geq 10\%$  do previsto em 12 meses
3. Evidência de progressão de doença (um ou mais) nas imagens tomográficas: a) aumento da extensão de bronquiectasias de tração; b) novas opacidades em vidro fosco em concomitância com bronquiectasias de tração; c) reticulado novo; d) aumento na extensão de reticulação; e) faveolamento novo ou em piora; f) aumento de perda de volume pulmonar.

---

Adaptado de Raghu G et al.<sup>(4)</sup>

## **2.2 Apresentação clínica**

Os sinais e sintomas das DPI são inespecíficos e envolvem dispneia aos esforços, tosse crônica, baqueteamento digital e ausculta pulmonar com crepitações com som de velcro.<sup>(14)</sup> Por conta disso, o diagnóstico pode levar meses até que seja realizado.<sup>(14)</sup> Em relação às DTC, o comprometimento pulmonar pode preceder as manifestações sistêmicas, o que justifica a investigação clínica e laboratorial deste grupo de doenças na propedêutica de pacientes com opacidades intersticiais pulmonares.<sup>(58)</sup> Na anamnese, é importante investigar a presença de exposições a antígenos inalatórios como mofo, aves, além de exposições ocupacionais como asbesto, berílio, metais, poeiras, que podem ser responsáveis pelo surgimento de fibrose pulmonar.<sup>(3)</sup> Já é descrito que a presença de exposição a mofo, pássaros,

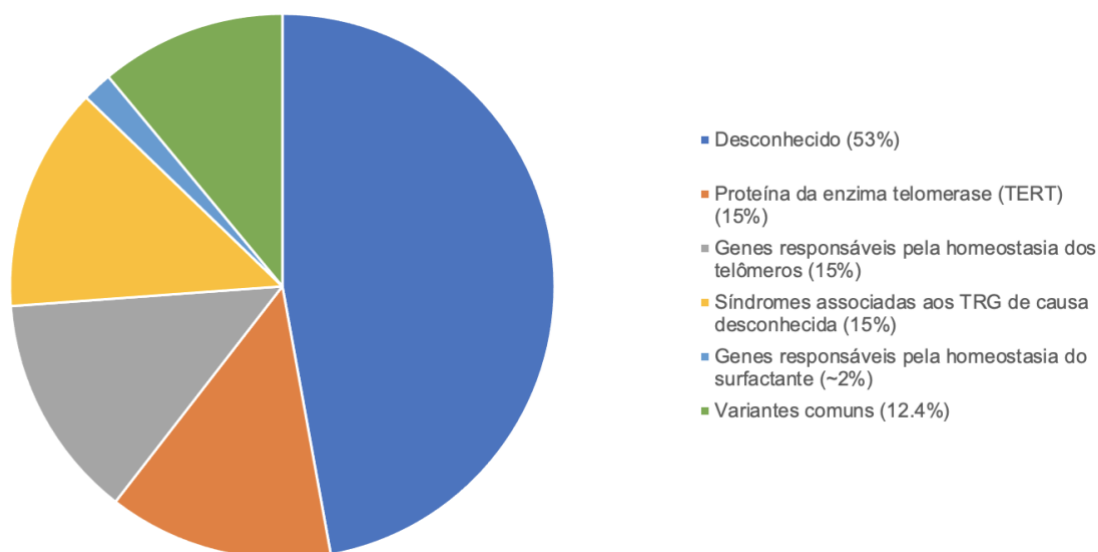
alumínio (fundição) e chumbo associa-se com a presença de anormalidades pulmonares intersticiais (API).<sup>(59)</sup>

O desenvolvimento da TCAR propiciou uma melhor caracterização radiológica das alterações intersticiais, contribuindo para a redução do tempo para diagnóstico de fibrose pulmonar.<sup>(16)</sup> Os achados incluem destruição da arquitetura pulmonar, áreas de opacidades reticulares, redução do volume pulmonar, bronquiectasias, faveolamento e outros achados específicos de cada padrão de TCAR.<sup>(14)</sup> Em 2018, as diretrizes da ATS/ERS/JRS/ALAT recomendaram a classificação das DPI segundo quatro padrões, que é a classificação adotada atualmente (Tabela 1).<sup>(25)</sup>

### **2.3 A investigação genética e molecular nas doenças pulmonares intersticiais**

A predisposição genética para fibrose pulmonar foi confirmada pela descoberta de diversas variantes que se associam doença pulmonar fibrosante.<sup>(13)</sup> O estudo genético na FPF tem sido construído no desenvolvimento e validação de diretrizes baseadas em evidências para o rastreio genético de formas familiares FPI, em um contexto significativo de investigação (Figura 4). Assim, a FPI tem sido classificada com base em características moleculares permitindo a implementação de abordagens de medicina de precisão. Sugere-se que predisposição genética para fibrose pulmonar aumenta em 10 vezes o risco em familiares de pacientes com FPI.<sup>(7, 60)</sup> Estudos iniciais mostraram a associação de genes responsáveis pela homeostasia dos telômeros e de surfactante, variantes raras e comuns a FPI (Figura 4).<sup>(61)</sup> No entanto, a presença dessas mesmas alterações já foi encontrada em outras etiologias de DPI como PHf, PINE e DPI associada a artrite reumatoide.<sup>(9, 56, 62-64)</sup> A presença de variantes comuns como o polimorfismo do MUC5B também já foi descrita em varias etiologias de DPI (em formas esporádicas e familiares) como DPI associada a artrite reumatoide, PHf, asbestose, e DPI com apresentação de fibrose pulmonar progressiva.<sup>(62, 63, 65, 66)</sup>





**Figura 4. Contribuição de variantes raras e comuns para o risco de FPI.**

TRG: *telomere related genes*.

Fonte: Adaptado de Alonso González A et al. <sup>(61)</sup>

Outra ferramenta molecular recentemente descrita é o classificador genômico Envisia.<sup>(67-69)</sup> Esse modelo propõe uma forma algoritmo de aprendizado de máquina através da identificação de dados de sequenciamento de RNA em tecidos extraídos de biópsias transbrônquicas de pacientes em investigação para FPI.<sup>(67-69)</sup> O objetivo é identificar a presença do padrão PIU e confirmar FPI através de uma ferramenta molecular, evitando-se a necessidade de biópsia cirúrgica para o diagnóstico.<sup>(67-69)</sup> Um estudo prospectivo testou a hipótese de que a inclusão de um resultado positivo para PIU do Envisia aumentaria os diagnósticos de FPI, o grau de confiança no diagnóstico e a recomendação de terapia antifibrótica.<sup>(70)</sup> Esse estudo incluiu pacientes que apresentavam uma TCAR sem um padrão típico de PIU, um resultado positivo para PIU do Envisia e um diagnóstico final de FPI por discussão em equipe multidisciplinar (DMD).<sup>(70)</sup> Cada caso foi apresentado em três formatos diferentes: uma coorte pré-pós DMD, onde cada caso é apresentado inicialmente sem e depois com Envisia, e duas coortes independentes, em que cada caso é apresentado sem e com Envisia, respectivamente.<sup>(70)</sup> Esse estudo confirmou que o número de diagnósticos de FPI aumentou cerca de 39% após o Envisia, com nível de confiança superior 90% tanto na coorte pré-pós quanto nas coortes independente.<sup>(70)</sup> Da mesma forma, o uso de antifibróticos no tratamento aumentou de cerca de 36% para 46,4% na coorte pré-pós e em 11% na coorte independente.<sup>(70)</sup> Apesar de contribuir para um diagnóstico mais

precoce da FPI, o uso do Envisia não resultou em aumento do tempo de livre de progressão da doença ou não foi capaz de evitar declínio longitudinal da CVF.<sup>(71)</sup>

## 2.4 Fibrose pulmonar familiar

Nas décadas de 1950 e de 1960, foram publicadas as primeiras séries de casos de DPI em pacientes de um mesmo grupo familiar, sugerindo a possibilidade de alterações genéticas como um dos fatores de risco associados com o desenvolvimento de doença pulmonar fibrosante.<sup>(5, 6)</sup> Apesar de terem havido publicações posteriores, acreditava-se que as formas familiares de DPI fossem raras, o que levou ao uso da expressão “fibrose pulmonar familiar” nas formas familiares de FPI ou em associação com doenças neoplásicas.<sup>(72-75)</sup> Entretanto, em 2005, Steele et al., sugeriram a utilização da expressão “pneumonia intersticial familiar” e ao demonstrarem uma maior prevalência da FPF e também a sua heterogeneidade de apresentação, estimularam o interesse da pesquisa sobre a fisiopatologia da FPF.<sup>(7)</sup>

Recentemente, sugeriu-se a adoção do termo “fibrose pulmonar familiar” (FPF).<sup>(13)</sup> A FPF, portanto, é definida como a presença de DPI, de qualquer etiologia, em dois ou mais familiares – de primeiro e segundo grau de parentesco - de uma mesma família.<sup>(7, 13)</sup>

O quadro clínico da FPF é o mesmo das formas esporádicas de DPI caracterizando-se por dispneia progressiva, tosse crônica, crepitações teleinspiratórias e baquetamento digital.<sup>(13)</sup>

Nos últimos dez anos, novos estudos trouxeram mais informações sobre as características fenotípicas da FPF, confirmando a diversidade das suas formas de apresentação. Apesar da FPI ser o diagnóstico mais frequentemente relatado, outras formas de DPI têm sido identificadas. Newton et al, avaliando 115 participantes, confirmaram o diagnóstico em 77 deles.<sup>(9)</sup> Neste estudo, os diagnósticos finais foram: FPI (45,5%), doença pulmonar intersticial não classificável em 19,5% (DPI-NC), PHf (11,7%), fibroelastose pulmonar (10,4%), pneumonia intersticial com achados autoimunes (PIAI; 6,5%), PINE (2,6 %), DPI-DTC; (2,6%) e PID (1,3%).<sup>(9)</sup> Em outro estudo mais recente, com 1262 participantes, os achados foram semelhantes, com maior frequência de diagnóstico de FPI (58%), seguido por DPI-DTC (32%), PHf(27%) e DPI-NC (41%).<sup>(1)</sup> Bennet et al confirmaram a heterogeneidade das apresentações tomográficas na FPF: em seu estudo retrospectivo com 46 indivíduos, foram

encontrados padrões de TCAR que variavam desde do padrão de PIU - presente em 54,3% da amostra - até padrão inconsistente com PIU (23,9% da amostra).<sup>(8)</sup> Outro estudo mostrou que diferentes padrões histopatológicos de DPI podem aparecer na FPF.<sup>(76)</sup>

Deve-se ressaltar que a história familiar positiva para DPI é um fator de risco para o desenvolvimento de FPI, impactando inclusive na sobrevida: a história familiar de DPI é um preditor de menor sobrevida pós transplante pulmonar em pacientes com FPI.<sup>(1, 11)</sup> Além disso, pacientes com FPF de fenótipo não FPI, podem apresentar um curso clínico de doença rapidamente progressiva.<sup>(1)</sup> A FPF é usualmente progressiva e frequentemente associada com pior prognóstico, independente da etiologia, sugerindo que a intervenção nesses casos deve ser a mais precoce possível e que o rastreio de familiares ainda não afetados deva ser considerado.<sup>(13)</sup>

#### **2.4.1 Epidemiologia da fibrose pulmonar familiar**

A epidemiologia da FPF ainda não está bem esclarecida. Acreditava-se inicialmente que a FPF era rara, com estimativa, no início dos anos 2000, de apenas 2-5% dos casos de DPI fossem familiares.<sup>(77, 78)</sup> Estudos atuais sugerem que aproximadamente 20% dos casos de DPI têm comportamento familiar.<sup>(11, 79, 80)</sup> No entanto, esses estudos trouxeram informações de uma única população. Um estudo brasileiro, multicêntrico e transversal, que estimou a prevalência das DPI no país, 5,8 % dos casos eram de FPF.<sup>(29)</sup> O REFIPI foi um estudo multicêntrico que avaliou as características clínicas, funcionais e tomográficas de pacientes latino-americanos com FPI que mostrou que 8,4% dos pacientes tinham história familiar positiva, sugerindo que aproximadamente 1 em cada 10 pacientes com FPI tenham FPF.<sup>(81)</sup>

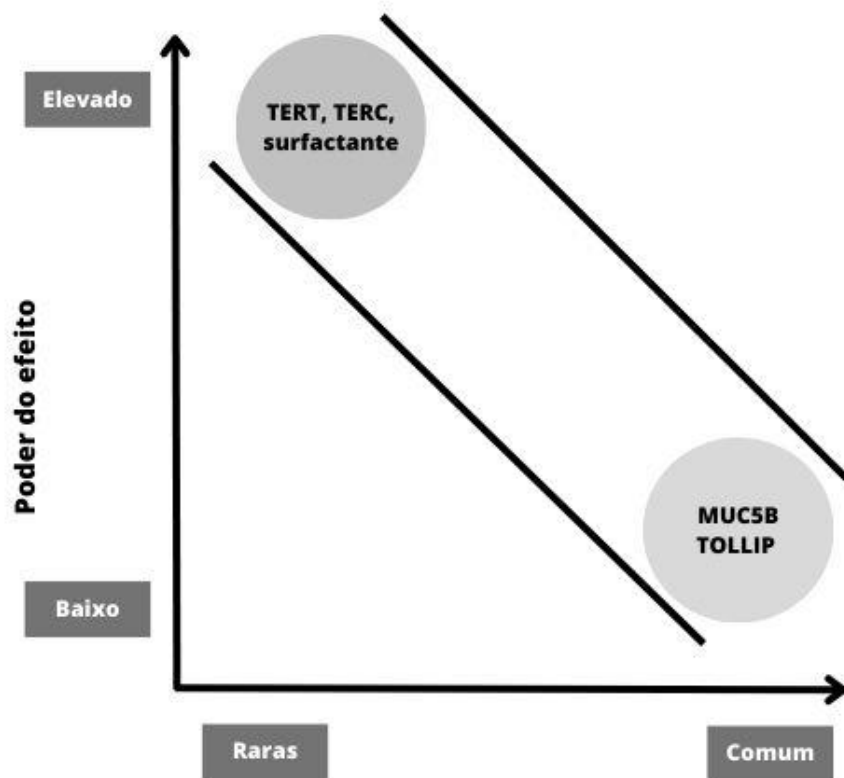
Um fator dificultador do conhecimento epidemiológico da FPF é o fato de que muitas vezes os familiares acometidos não terão o diagnóstico de DPI de forma sincrônica. Não é infrequente que o segundo familiar acometido receba o diagnóstico de DPI anos depois do primeiro caso na família. Kropski et al relataram que aproximadamente 10% dos pacientes que estão em seguimento por FPI, por exemplo, irão identificar outro familiar com acometimento de fibrose pulmonar de alguma etiologia ao longo do seguimento.<sup>(82)</sup>

Apesar de já ser descrito que até um sexto dos familiares de primeiro grau de pacientes com fibrose pulmonar irão evoluir com DPI não diagnosticada e API, a FPF ainda é subdiagnosticada.<sup>(83)</sup>

#### **2.4.2 Genética na fibrose pulmonar familiar**

Com auxílio das técnicas de sequenciamento genético, *candidate-gene base* e outras, mais de dez genes responsáveis pela FPF foram reconhecidos.<sup>(12)</sup> Estes resultados sugerem que a FPF tenha um padrão de transmissão autossômica dominante, com penetrância incompleta.<sup>(7)</sup>

Estudos iniciais mostraram alterações genéticas associadas à homeostase dos telômeros (*telomere related genes* - TRG) e à homeostase do surfactante (*surfactant related genes* - SRG), além de outras variantes raras com frequência alélica inferior a  $<0.001$  na população.<sup>(12, 13)</sup> Variantes comuns (definidas como aquelas cuja menor frequência alélica é superior à 5% na população) como o polimorfismo do MUC5B também já foram associadas a FPF.<sup>(84, 85)</sup> Segundo Borie et al, as variantes raras teriam um efeito determinante no desenvolvimento de fibrose pulmonar maior que as variantes mais comuns, pois as variantes comuns demandariam mais influência dos fatores ambientais, conforme o autor ilustrou na figura abaixo (Figura 2).<sup>(86)</sup>



Adaptado de: Borie R, Kannengieser C, Sicre De Fontbrune F, Gouya L, Nathan N and Crestani B. Management of suspected monogenic lung fibrosis in a specialised centre. *Eur Respir Rev.* 2017.

**Figura 5. Efeito das variantes genéticas no desenvolvimento da fibrose pulmonar familiar.**

Fonte: Adaptado de Borie R et al. <sup>(86)</sup>

Apesar de já serem conhecida associação de variantes genéticas com FPF, a recomendação para rastreio genético ainda se baseia em opinião de especialistas. Atualmente, recomenda-se sequenciamento genético em com doença monogênica já conhecida.<sup>(13)</sup> Outros autores sugerem a investigação de comprimento telomérico e sequenciamento genético em pacientes com formas familiares de FPI com menos de 50 anos e presença de sintomas sistêmicos de telomeropatias.<sup>(61, 87)</sup> No entanto, em outros fenótipos de fibrose pulmonar na FPF, não são descritas recomendações de rastreio genético.

#### 2.4.2 a) Genes associados a homeostase dos telômeros

As alterações nos genes relacionados a homeostasia dos telômeros são as variantes genéticas mais frequentemente encontradas na FPF, presente em aproximadamente 20 % dos casos.<sup>(13)</sup>

Os telômeros são sequências repetitivas de DNA localizadas no final dos cromossomos<sup>(88)</sup> e o seu encurtamento a cada divisão celular leva ao envelhecimento da célula.<sup>(9, 13)</sup> Quando muito curtos, os telômeros sinalizam parada de proliferação celular, senescência e apoptose.<sup>(88)</sup> A telomerase é uma enzima de transcriptase reversa, produzida por células germinativas e algumas células somáticas, que mantém a sequência de DNA ao final do cromossomo, atrasando o encurtamento telomérico.<sup>(9, 88)</sup> A unidade catalítica da telomerase contém duas cópias da proteína da telomerase (TERT) e do RNA componente da enzima (TERC), discinerina (DKC1) e outras proteínas (TIN2, RETL1) que estabilizam o complexo.<sup>(88)</sup> Variantes genéticas no TERT, TERC e nas outras proteínas do complexo da enzima telomerase (DKC1, TIN2, RETL1) levam ao encurtamento precoce do comprimento telomérico, e estão associadas com o surgimento de FPF.<sup>(9, 86, 88)</sup>

A forma pela qual as variantes dos genes relacionados à manutenção dos telômeros trazem dano ao tecido pulmonar é ainda incerta, mas acredita-se que as alterações dos telômeros comprometam a reparação do epitélio pulmonar.<sup>(10)</sup> A alteração no TERT resulta em redução média da sobrevida de três anos.<sup>(86)</sup>

Durante a investigação de pacientes com DPI deve-se rastrear casos familiares FPF, e manifestações clínicas e laboratoriais de TRG como anormalidades hematológicas (macrocitose, neutropenia, linfopenia, trombocitopenia, mielodisplasia, leucemia aguda), disfunções hepáticas (enzimas hepáticas elevadas, cirrose criptogênica, hipertensão portal, síndrome hepatopulmonar, cirrose hepática), canescência precoce do cabelo, disceratose congênita (unhas distróficas, alteração de pigmentação da pele e fibrose pulmonar), são sugestivas de telomeropatias.<sup>(13)</sup>

#### 2.4.2 b) Genes associados a homeostase do surfactante

As variantes genéticas relacionadas ao surfactante são raras e têm frequência inferior a 5%.<sup>(13, 89)</sup>

O surfactante é composto por proteínas e lipídeos e é sintetizado e secretado pelos pneumócitos tipo II.<sup>(89)</sup> O surfactante associado à proteína A (SP-A) e o surfactante associado à proteína D (SP-D) são importantes para a defesa pulmonar, enquanto o surfactante associado à proteína B (SP-B) e o surfactante associado à proteína C (SP-C) estão associados à função do surfactante.<sup>(13)</sup> Os genes correspondentes são, respectivamente, SFTPA, SFTPD, SFTPB e, SFTPC.<sup>(89)</sup> Outros genes relacionados às proteínas do surfactante e que também já foram associados à FPF incluem SFTPA2 e ABCA3.<sup>(86)</sup>

#### 2.4.2 c) Variantes genéticas comuns

A MUC5B é uma mucina produzida pelas glândulas da submucosa que não se encontra no epitélio alveolar.<sup>(86)</sup> A MUC5B tem forte expressão nas células dos cistos de favelamento da fibrose pulmonar.<sup>(90)</sup>

O polimorfismo rs35705950 localiza-se no *loci* do cromossomo 11 (chr11p15.5) que contém os genes MUC5B e TOLLIP. Esses genes associam-se com o desenvolvimento tanto da FPF quanto da FPI.<sup>(85, 91)</sup> Apesar dessa associação, a maioria dos portadores deste alelo não desenvolverá a doença.<sup>(91)</sup> Além disso e paradoxalmente, a presença do polimorfismo do MUC5B parece ser um fator protetor nos pacientes com FPI esporádica, pois associa-se com melhor sobrevida e progressão mais lenta em comparação com pacientes que não possuem a variante.<sup>(91)</sup>

Como as variantes genéticas comuns seguem padrões de herança complexos, em vez de mendelianos, o rastreamento de variantes genéticas comuns não está indicado nos casos de pacientes com FPF.<sup>(12, 13)</sup>

### 3. JUSTIFICATIVA

A literatura disponível confirma a heterogeneidade da FPF, mostrando que diversas etiologias podem ter apresentação familiar e que indivíduos de uma mesma família podem apresentar diferentes fenótipos de DPI entre eles. Os estudos que descreveram os achados clínicos, funcionais, tomográficos e histopatológicos da FPF contribuíram para trazer informações importantes sobre o seu curso clínico e suas formas de apresentações. No entanto, ainda são poucos os dados sobre a interação gene-a-gene no surgimento da FPF e o comportamento da sobrevida da FPF.

A informação de que as formas familiares de DPI podem ter prognóstico ainda mais reservado do que as formas esporádicas impulsionou a busca por informações fisiopatológicas que pudessem identificar mais precocemente a FPF. A investigação da genética tem se mostrado uma ferramenta promissora, podendo identificar variantes patogênicas que funcionariam como biomarcadores tanto para identificação de doença mais progressiva, o que permitiria intervenções terapêuticas mais precoces, ou o desenvolvimento de terapias-alvo no futuro. Adicionalmente, a genética poderia ser útil na identificação e aconselhamento de familiares em risco potencial para desenvolvimento de fibrose pulmonar. Várias alterações genéticas, especialmente associadas com genes da manutenção dos telômeros e produção de surfactante estão associadas com FPF. Além disso, variantes genéticas comuns como polimorfismo rs35705950 MUC5B e TOLLIP também foram descritas nos pacientes com FPF. No entanto, são escassas as informações sobre os riscos de desenvolver FPF na presença da interação entre genes. Além disso, a maneira como esses genes podem influenciar a sobrevida da FPF também é pouco conhecida.

Em relação a sobrevida, estudos retrospectivos não identificaram diferença de sobrevida entre FPF e formas esporádicas de DPI, apesar de ser relatado que a presença de história familiar de fibrose pulmonar implica em pior prognóstico.<sup>(1, 57, 92)</sup> Esses dados sugerem que a FPF, independente da etiologia da DPI, pode ter uma forma de apresentação progressiva e com sobrevida reduzida. Apesar desses achados em relação a sobrevida trazerem informações importantes poucos estudos compararam a sobrevida entre os fenótipos da FPF.

Portanto, a identificação de genótipos associados ao desenvolvimento de DPI e, particularmente das formas de FPF, permitirá avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na gênese desse grupo de doenças, o que servirá de base



para o aperfeiçoamento do seu diagnóstico e terapêutica. A identificação das variantes genéticas poderá auxiliar na identificação de grupos que se beneficiariam, adicionalmente, de rastreio genético.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo primário**

- Investigar a interação gene-a-gene e do comprimento dos telômeros com variantes patogênicas raras e comuns em uma coorte de pacientes brasileiros.

### **4.2 Objetivos secundários**

- Verificar a taxa de sobrevida dos pacientes com FPF;
- Identificar fatores clínicos associados com a sobrevida de pacientes com FPF;
- Identificar variantes genéticas que possam estar relacionados à sobrevida reduzida de pacientes com FPF.

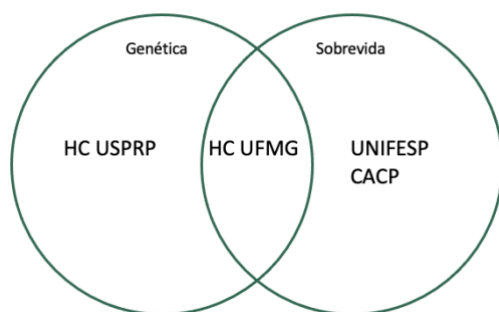
## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo, envolvendo pacientes com diagnóstico de FPF de acordo com as recomendações da ERS: dois ou mais pacientes de uma mesma família – com primeiro ou segundo grau de parentesco - com diagnóstico de DPI de qualquer etiologia.<sup>(13)</sup> A presença de FPF foi confirmada quando: a) todos os familiares tinham seguimento clínico na mesma instituição; b) no caso de seguimentos em locais diferentes ou óbito de outro familiar com DPI, buscou-se documentação médica confirmatória da DPI do familiar acometido, tais como laudos de tomografias de tórax, relatórios médicos, sumários de alta ou declaração de óbito). Como a apresentação de parentes com FPF pode não ser síncrona, o diagnóstico de FPF foi firmado assim que os pacientes informaram na avaliação a presença de outro familiar com fibrose pulmonar.

Foram incluídos pacientes em seguimento em centros de referência para tratamento de DPI ([Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC UFMG), Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (HC USPRP), Clínica Privada (CACP) e Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)]) no período compreendido entre janeiro de 2007 e julho de 2022 (Figura 3) conforme formulário do estudo (ANEXO 01).

Para a realização da análise genética, foram incluídos os participantes casos-índices (definido como primeiro paciente a receber o diagnóstico de DPI) em seguimento no HC UFMG (n=47) e HC USPRP (n=35) (Figura 3). Para realização da análise de sobrevida, foram incluídos todos os participantes com diagnóstico de FPF em seguimento no HC UFMG, UNIFESP e na CACP (Figura 3).



**Figura 06: Delineamento do estudo.**

## **5.2 Critérios de inclusão e exclusão**

### **5.2.1 Critérios de inclusão**

- Idade superior a 18 anos;
- Diagnóstico de FPI ou PHf;
- Presença de dois ou mais familiares de primeiro e/ou segundo grau de parentesco com DPI;
- Para análise genética: 57 pacientes em seguimento no HC UFMG e 35 em seguimento HC USPRP tiveram amostra de sangue coletada para análise genética; dentre esses, 82 (89.1%) foram incluídos nas análises do artigo 1.
- Todos os centros estarem aptos a realizarem DMD rotineiramente.

### **5.2.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes com familiares com outras doenças respiratórias que não DPI (asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasias não fibrose cística, silicose, neoplasia);
- Pacientes que não conseguiram realizar as manobras para os testes de função pulmonar;
- Pacientes com imagens tomográficas de qualidade insuficiente para a interpretação;
- Após revisão dos exames e discussão multidisciplinar, pacientes com outros diagnósticos que não FPI e PHf foram excluídos.

## **5.3 Variáveis clínicas, funcionais, tomográficas e histopatológicas**

### **5.3.1 Variáveis descritivas**

Foram coletadas as variáveis idade à época do diagnóstico, o grau de dispneia segundo a escala *Medical Research Council* modificada (mMRC)<sup>(93)</sup> e saturação periférica de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) em ar ambiente obtidos na primeira consulta; história de exposição ao tabagismo, a antígenos inalatórios orgânicos e a antígenos

reconhecidamente associados a pneumoconioses; data do diagnóstico; data da última consulta ou de óbito; tratamento realizado (nintedanibe, pirfenidona, imunossuppressores, corticosteroide oral).

As variáveis foram coletadas dos prontuários através de um formulário específico de avaliação sistemática de pacientes com DPI (ANEXO 1).

### **5.3.2 Testes de função pulmonar**

Para a realização da espirometria foi utilizado o espirômetro da marca Koko (*Pulmonary Data Service, Inc Company, Louisville, CO, USA*). Os critérios de aceitação e reprodutibilidade para os testes de função pulmonar foram aqueles recomendados pela ATS/ERS.<sup>(94-96)</sup> Os valores encontrados foram descritos como valores absolutos e porcentagem em relação aos valores previstos para a população brasileira.<sup>(97, 98)</sup> As variáveis analisadas foram capacidade vital forçada (CVF), volume expiratório forçado do primeiro segundo (VEF<sub>1</sub>) e relação VEF<sub>1</sub>/CVF. A espirometria foi realizada na data do diagnóstico e semestralmente após esta.

Para a medida difusão de monóxido de carbono (DCO), o método da respiração única foi utilizado.<sup>(99)</sup> Os resultados seguiram os valores preconizados por Guimarães et al.<sup>(100)</sup>

### **5.3.3 Tomografia de tórax em alta resolução (TCAR)**

As imagens tomográficas foram analisadas pela equipe de pneumologia dos referentes ambulatoriais e por radiologista especialista em avaliação de imagens de tórax e classificadas de acordo com os padrões encontrados, inicialmente, em uma de quatro categorias, segundo recomendações da ATS/ERS/JRS/ALAT 2018: padrão definido de pneumonia intersticial usual (PIU); padrão provável de PIU; padrão indeterminado para PIU; e achados tomográficos mais consistentes com diagnósticos alternativos (Tabela 1).<sup>(25)</sup>

### 5.3.4 Histopatologia

As biópsias pulmonares foram avaliadas por um patologista especializado em patologia de pulmão e classificadas de acordo com os padrões histológicos dos manuais atuais:

- Para pacientes com diagnóstico de FPI pela histopatologia foi utilizada a classificação de ATS/ERS/JRS/ALAT 2018 PIU definitiva, Provável PIU, indeterminado e diagnósticos alternativos;<sup>(25)</sup>
- Para pacientes com diagnóstico de PHf confirmada pela análise patológica considerou-se a classificação ATS/JRS/ALAT 2020.<sup>(34)</sup>

### 5.4 Identificação da etiologia da doença pulmonar intersticial

O diagnóstico etiológico das DPIs foi realizado de acordo com as recomendações das diretrizes atuais.

O diagnóstico de FPI foi firmado na presença de: a) TCAR com padrão PIU ou PIU provável em associação a exclusão de outros diagnósticos de DPI; ou b) histologia sugestiva de FPI.<sup>(4, 25)</sup>

Para a definição de caso de PHf foram utilizados os seguintes critérios:<sup>(34, 36)</sup>

- melhora clínica e tomográfica após interrupção da exposição ao antígeno identificado, ou;
- presença exposição associado à de tomografia de tórax com achados típicos e presença de linfocitose (definida como presença de linfócitos > 20%) em amostra de lavado broncoalveolar;
- na ausência de exposição identificada, o diagnóstico de PHf foi considerado apenas por confirmação histopatológica.

### 5.5 Variáveis genéticas realizadas

#### 5.5.1 Análise genética

Apenas os participantes em seguimento no ambulatório de DPI do HC-UFMG e do HC USPRP foram submetidos à coleta de amostra de sangue para pesquisa de variantes genéticas raras e comuns e para comprimento telomérico, compreendendo,

ao todo, 57 pacientes do HC UFMG e 35 do HC USPRP. Entretanto, apenas os casos-índices (definidos como primeiro paciente a receber o diagnóstico de DPI) foram inicialmente incluídos para que fosse possível confirmar a associação de causa-efeito da presença de variantes genéticas e suas interações com o desenvolvimento de FPF. Dessa forma, foram incluídos na análise 47 casos-índices em seguimento no HC UFMG e os 35 do HC USPRP. A avaliação dos 10 participantes restantes (familiares não-índices) permitiu a identificação de variantes que segregavam no fenótipo da doença.

As amostras de sangue foram coletadas através de punção venosa periférica em quatro tubos 4 mL contendo anticoagulante EDTA K2. As amostras foram coletadas e encaminhadas, dentro de 24h, ao laboratório da Divisão de Hematologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da USPRP onde foram processadas em até 48h após o recebimento, com extração de DNA e submetidas às análises.

Foram analisados os comprimentos médios dos fragmentos de restrição teloméricos (TRF) pelo método de *Southern blot*. Foi empregado o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) para o estudo de genes associados a FPF já descritos na literatura (Tabela 3) e para investigação de outras variantes raras de forma exploratória. As variantes genéticas encontradas pelo sequenciamento NGS foram avaliadas pelo método de sequenciamento de Sanger.<sup>(101)</sup>

**Tabela 3. Painel customizado de sequência incluindo éxons de 154 genes (SRG, TRG, biologia dos ribossomos, reparação de DNA, hematopoiese, resposta imune) e regiões intrônicas/regulatórias dos polimorfismos comuns da FPF (*TERT*, *TOLLIP* e *MUC5B*).**

<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>RTEL1</i>	<i>TERT</i> gene
<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>	

Conforme recomendação do *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology* as variantes genéticas encontradas foram classificadas em<sup>(102)</sup>:

- Patogênicas;
- Provavelmente patogênicas;
- Variante de significado incerto (VUS: *variants of uncertain significance*);
- Provavelmente benignas e;
- Benignas.



Além disso, as variantes genéticas foram classificadas de acordo com sua frequência alélica na população sendo<sup>(103)</sup>:

- Variantes raras: polimorfismos de sequência de nucleotídeos (SNPs: *single nucleotide polymorphisms*) com frequência alélica (FA)  $\leq 1\%$ ;
- Variantes pouco frequentes: SNPs com  $<1\% \text{FA} < 5\%$ ;
- Variantes comuns: SNPs com FA  $> 5\%$ .

#### 5.5.1 a) Avaliação do comprimento telomérico

O comprimento médio do TRF foi calculado por meio da comparação da localização dos fragmentos de restrição na membrana com a localização 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)*. Após esses procedimentos, calculou-se a média do TRF. Esta média foi apresentada em kb e calculada através da fórmula abaixo:

$$\text{TRF} = \frac{\sum (\text{OD}_i)}{\sum (\text{OD}_i/\text{Li})}$$

onde i = posição na membrana; OD<sub>i</sub> = sinal quimioluminescente; Li = tamanho do TRF na posição da membrana.

Após esse cálculo, os comprimentos teloméricos foram comparados com valores previamente derivados pelo Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina da USPRP de acordo com a distribuição esperada para a idade.<sup>(104)</sup> Assumindo uma distribuição normal, os comprimentos teloméricos foram determinados em curvas correspondentes aos percentis 1% (P1), 10% (P10), 90% (P90) e 99% (P99). Comprimentos de telômeros inferiores ou iguais ao P20 foram classificados como curtos.<sup>(88, 105, 106)</sup> Valores inferiores ou iguais a P1 foram classificados como muito curtos.<sup>(88, 105, 106)</sup> Todos os outros valores foram considerados como normais.

#### 5.5.1 b) Sequenciamento genético

O DNA genômico total foi extraído das células mononucleares da amostra de sangue utilizando o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Quiagen, Valencia, California, USA) e a pureza das amostras de DNA foi confirmada através de um espectrofotômetro (*NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, USA*). O sequenciamento incluiu as seguintes etapas:

- **Etapa 1:** Construção da biblioteca: foi criado um painel de genes personalizado e desenhado para o estudo de forma a identificar variantes germinativas e *de novo* em 154 genes frequentemente mutados em pacientes com FPF, formas esporádicas de fibrose pulmonar, telomeropatias ou neoplasias hematológicas (Tabela 3).<sup>(10)</sup>
- **Etapa 2:** Sequenciamento: o sequenciamento das bibliotecas foi realizado na plataforma *Next Seq* (Illumina – San Diego, California, USA) utilizando os 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* (Illumina – San Diego, California, USA).
- **Etapa 3:** Identificação de variantes: os arquivos gerados no sequenciador foram analisados pelo software *NextSeq Reporter* (Illumina – San Diego, California, USA). Este software avalia os escores de qualidade de cada base capturada durante o sequenciamento e remove os dados de baixa qualidade (definidos como *Q-scores* inferiores a 30%). Após, o software *SureCall* (Agilent – Santa Clara, California, USA) foi utilizado para alinhamento e mapeamento dos fragmentos de sequencia (chamados de *reads*) com uma sequencia de referência (a referência nesse caso são as regiões do genoma humano correspondentes aos genes enriquecidos nas bibliotecas). As potenciais variantes apontadas pelo programa *SureCall* foram anotadas em uma ferramenta de dados *Wannovar*.<sup>(107)</sup>
- **Etapa 4:** Identificação das variantes relevantes: após anotadas na ferramenta *Wannovar*, foram selecionadas as variantes novas ou descritas com frequência alélica abaixo de 0.1% de acordo com a base de dados de sequenciamento de

exomas e genomas humanos *Genome Aggregation Database (GnomAD)*<sup>(103, 108)</sup>

Em seguida, as variantes identificadas foram filtradas de acordo com o impacto na formação da proteína, permanecendo aquelas em regiões de éxons que levam a mudanças na matriz de leitura, que levam à mudança do aminoácido e as que geram um códon de parada na tradução. Alguns SNPs que já foram associados a FPF também foram considerados relevantes quando presente nos pacientes avaliados. A frequência alélica desses SNPs também foi comparada com as seguintes bases de dados genéticos: *GnomAD* e Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM). Considerou-se a presença de algumas das variantes como enriquecida quando a presença de delas era mais frequente na amostra com FPF que nos bancos de dados públicos (*GnomAD* e ABraOM).

## 5.6 Amostragem

A amostragem foi determinada por conveniência, sem realização de cálculo amostral.

Apenas os pacientes em seguimento no HC UFMG e HC USPRP participaram da coleta de amostra de sangue para análise genética (Figura 3). Após análise genética, os 82 casos-índices foram classificados em dois grupos:

- a) *Telomere related familial pulmonary fibrosis* (TR-FPF): participantes com FPF e comprimento de telômero encurtado e presença de variante rara;
- b) *Non-telomere related familial pulmonary fibrosis* (TR-FPF): participantes com FPF com comprimento de telômero encurtado ou presença de variante rara, mas nunca os dois.

Além disso, 44 participantes que apresentavam telomeropatia mas ausência de doença pulmonar fibrosante compuseram o grupo controle (classificados como *non-lung telomere-biology disease – non-lung TBD*).

Para o estudo das variáveis não genéticas associados a sobrevida foram incluídos, ao todo, 198 pacientes em seguimento no HC UFMG, CACP e UNIFESP (Figura 3). Foram selecionados 66 pacientes com formas familiares de FPI e PHf e

132 pacientes com formas esporádicas de FPI ou PHf que foram adicionados como controles.

### 5.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no ambiente do software R v.4.2.0 (<http://www.r-project.org/>) e o SPSS versão 25.0.

Os dados foram apresentados em tabelas de frequência expressos nas formas absolutas e suas respectivas porcentagens, assim como as medidas descritivas média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e percentis 25 e 75, quando indicados, para os dados quantitativos.

A sobrevida global foi calculada pelo método de Kaplan-Meier e comparada pelo teste de *log-rank*. A data do diagnóstico foi utilizada como a data de referência para a análise de sobrevida.

Foi criado um modelo de árvore de inferência condicional para classificar os subgrupos dos participantes, segundo as variantes genéticas, de acordo com as variáveis idade, sexo, comprimento telomérico, *status* das variantes comuns TOLLIP e MUC5B rs35705950. O modelo de árvore de inferência condicional é uma técnica de modelagem preditiva e aprendizado de máquina usada para construir um sistema de classificação por meio de partições sucessivas baseadas em variáveis de interesse.<sup>(109)</sup>

Os gráficos de frequência alélica foram construídos com o software *GraphPad Prism* v.9.3.0 (*GraphPad*).

As variáveis clínicas relacionadas à sobrevida foram estimadas por regressão uni e multivariada de Cox, por método anterógrado proporcional, e por curvas de Kaplan-Meier. As variáveis que apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos familiar e não familiar foram controladas antes de estimar as curvas de sobrevivência.

Em todos os testes, o nível de significância adotado foi 5%, portanto foram consideradas significativas comparações cujo valor de  $p$  foi inferior a 0.05.

## **5.8 Considerações éticas**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e da USPRP sob os registros, respectivamente: CAAE 448.43215.5.0000.5149 e CAAE 93617018.0.0000.5440 (ANEXO 02 e APÊNDICE 02).

Todos os participantes incluídos no estudo consentiram com a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da realização de qualquer procedimento (TCLE) (ANEXO 03 e APÊNDICE 03).

## **6. NOTA EXPLICATIVA**

Conforme deliberação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, os resultados dessa pesquisa serão apresentados na forma de dois artigos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Artigo 01

**Title: Common and rare genetic variant interaction in familial pulmonary fibrosis**

Authors: Flávia S. Donaires,<sup>1,\*</sup> André L. Pinto,<sup>1,\*</sup> Ana Beatriz Hortense,<sup>2</sup> Fernanda Gutierrez-Rodrigues,<sup>3</sup> Barbara A. Santana,<sup>1</sup> Luiz Fernando B. Catto,<sup>1</sup> Diego V. Clé,<sup>1</sup> Eliane V. Mancuzo,<sup>4</sup> Ricardo de Amorim Corrêa,<sup>4</sup> Edson Z. Martinez,<sup>5</sup> José Baddini-Martinez,<sup>2,6</sup> Deborah R. Estrella,<sup>4</sup> and Rodrigo T. Calado<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Department of Medical Imaging, Hematology, and Oncology, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, and <sup>5</sup>Department of Social Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>3</sup>Hematology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, US, <sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Federal University of Minas Gerais School of Medicine, Belo Horizonte, Brazil, and <sup>6</sup>Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, Brazil*

\*F.S.D. and A.L.P. are joint first authors

#### Correspondence:

Rodrigo T. Calado, M.D., Ph.D.

Department of Medical Imaging, Hematology, and Oncology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. Av. Bandeirantes, 3900, sala 743, 7º andar, HCRP Ribeirão Preto, SP, 14049-900, Brazil. Phone: +55-16-2101-9361; e-mail: [rtcalado@fmrp.usp.br](mailto:rtcalado@fmrp.usp.br)

#### Author contributions:

F.S.D., J.B.-M., D.R.E., and R.T.C. designed the study. F.S.D., A.L.P., F.G.R., and B.A.S. performed the experiments and analyzed data. A.B.H., L.F.B.C., D.V.C., E.V.M., R.A.C., and D.R.E. provided patients' samples and information. E.Z.M.

provided statistical support. J.B.-M. and R.T.C. contributed with materials and intellectual input. F.S.D., D.R.E., and R.T.C. wrote the manuscript.

Support: This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant no. 13/08135-2 and 16/12799-1 to R.T.C.; F.S.D. received a FAPESP postdoctoral scholarship (grant no. 17/09428-4).

Running title: Gene-gene interaction in pulmonary fibrosis

Statement of impact: The *MUC5B* promoter risk allele (rs35705950) increases the risk of developing interstitial lung disease in patients carrying rare germline telomere-biology gene variants with short telomeres. Conversely, the *TOLLIP* common variants do not cooperate with rare variants in telomere-biology genes for pulmonary disease development. These findings have implications for the mechanisms of lung involvement in telomeropathies and clinical management, as they may help identify telomeropathy patients at risk of developing lung disease.

Descriptor: 9.23 Interstitial Lung Disease

Total word count: 3.397 (max, 3500)

Target Journal: *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*



## ABSTRACT

**Rationale and Objectives:** Familial pulmonary fibrosis (FPF) has a complex genetic etiology involving telomere erosion and common and rare gene variants. We evaluated the gene-gene interaction contributing to the disease phenotype.

**Methods:** We evaluated 82 index cases with FPF and 44 patients with telomeropathy without lung involvement for telomere length, the *MUC5B* risk allele (rs35705950), *TOLLIP*, and *TERT* common variants, and rare telomere-biology gene variants. A conditional inference tree was applied for prediction.

**Measurements and Main Results:** Rare variants were identified in 24 FPF cases, of which 18 (22%) also had short telomeres and were classified as telomere-related (TR)-FPF. TR-FPF patients had unfavorable overall survival compared to non-TR-FPF (n=64;  $P=0.0006$ ). The *MUC5B* rs35705950 and the *TOLLIP* common variant alleles were more frequent in FPF than in public databases ( $P<0.003$ ). The *TOLLIP* common variants were enriched in the non-TR-FPF cases ( $P<0.001$ ) but not in TR-FPF. In contrast, the *MUC5B* rs35705950 was enriched in both groups ( $P<2E-07$ ), but in telomeropathy patients without lung involvement, its frequency was comparable to controls. Using the conditional inference tree, the *MUC5B* status correctly predicted FPF in 76% of cases with rare telomere-biology variants.

**Conclusions:** Rare telomere-biology gene variants, short telomeres, and the *MUC5B* rs35705950 allele cooperate in the development of FPF. *TOLLIP* variants increase the lung fibrosis risk in non-TR-FPF patients only. The combination of genetic data may help identify the subset of telomeropathy patients more likely to develop lung disease and provide insights into its pathogenesis.

Word count: 241 (max, 250)

Key words: familial pulmonary fibrosis, *MUC5B* rs35705950, rare telomere-biology gene variants, telomeropathy.

## **Research in context**

### **Evidence before this study**

Although prior studies have identified short telomeres and rare and common gene variants as genetic determinants for idiopathic pulmonary fibrosis, the epistasis among these genetic factors has not been evaluated. We used PubMed to search for evidence between 2000 and 2023, operating as criteria “idiopathic pulmonary fibrosis” and “mutation” (195 articles) or “variant” (127 articles) or “genetic” (986 articles). One single study investigated the prevalence of telomerase rare variants in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (without family history) lacking the *MUC5B* promoter risk allele. However, the gene-gene interaction has not been addressed.

### **Added value of this study**

To the best of our knowledge, this study is the first to investigate the gene-gene interaction between common and rare pathogenic variants and telomere length in FPF compared to patients with telomeropathy without lung involvement. The pathogenesis of lung disease in telomeropathies remains unclear. We found that the *MUC5B* promoter risk allele (rs35705950) increases the chances of developing interstitial lung disease in patients carrying rare telomere-biology gene variants with short telomeres. On the other hand, the *TOLLIP* common variants do not cooperate with telomere-biology genes for pulmonary disease development. These findings have implications for the cellular and molecular mechanisms of lung involvement in telomeropathies. They also help identify those individuals with rare telomere-biology variants at risk for interstitial lung disease.

### **Implications of all the available evidence**

In several previous studies, the common *MUC5B* promoter risk allele (rs35705950) has been associated with interstitial lung disease. Still, it mildly increases the disease risk in the general population, indicating cooperation with other genes, epigenetic events, and environmental factors. On the other hand, telomere-biology gene variants are rare but strongly increase the risk of lung disease, although not in all patients. Our findings help clinicians identify telomeropathy patients at higher risk of developing interstitial lung disease.

## INTRODUCTION

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a common form of idiopathic interstitial pneumonia (IIP), characterized by progressive lung scarring due to repeated injury to the alveolar epithelia and airways with aberrant regenerative response resulting in reduced lung function (1, 2). IPF is associated with aging, usually presenting at age over 60 years, and can be sporadic or hereditary (familial pulmonary fibrosis; FPF). Environmental exposure (e.g., smoking, fibrogenic dust, viruses, gastroesophageal reflux) and genetic factors are essential in disease development (3, 4).

The IPF genetic etiology was initially supported by the identification of familial clustering of cases, in which even asymptomatic individuals presented lung abnormalities and inflammation at an early age, decades before developing the disease (5-7). FPF has an autosomal dominant inheritance pattern with incomplete penetrance corresponding to approximately 20% of IPF cases (8, 9). Germline rare pathogenic gene variants have been first identified in the telomerase enzyme gene (*TERT*) or in the gene that encodes its RNA template (*TERC*) in approximately 15% of FPF cases (10, 11). Telomerase is a reverse transcriptase that extends the telomeres by adding hexameric nucleotides during cell replication in highly proliferative cells, preventing or mitigating telomere erosion (12). Since then, heterozygous germline pathogenic variants in other telomere-biology genes have been found as etiologic in IPF, more commonly in *RTEL1* and *PARN* (4). Patients with pathogenic telomere-biology gene variants have short telomeres, but not all develop IPF and a significant proportion alternatively (or concomitantly) develop bone marrow failure as a result of excessive telomere erosion (12). Another group of rare germline pathogenic variants involved in IPF etiology is related to surfactant production, mainly *ABCA3*, *SFTPA1*, *SFTPA2*, and *SFTPC* (4).

Genome-wide association studies have identified various common gene variants as risk factors for IPF. The *MUC5B* gene variant in the promoter region (rs35705950) is a gain-of-function polymorphism associated with increased mucin 5B (*MUC5B*) expression (13). It is the most common genetic risk factor for IPF, increasing 7-fold the chance of developing the disease. Common polymorphisms in the Toll-interacting protein (*TOLLIP*) gene, associated with innate immunity, also increase the risk of developing IPF (14). Additionally, a common intronic variant in the *TERT* gene has been implicated in IPF (15).

However, the epistasis among these diverse common and rare gene variants is unclear. On the one hand, rare pathogenic variants in telomere-biology genes appear to be more common in sporadic IPF patients without the *MUC5B* promoter risk allele (rs35705950)<sup>(16)</sup>. On the other hand, the rs35705950 has been associated with familial interstitial pneumonia, including in those with *TERT* gene variants.<sup>(17)</sup>

Here, we sought to explore the gene-gene and telomere length interactions among common and rare variants in patients with FPF.

## **METHODS**

### **Study cohort**

We studied 82 independent FPF index cases seen at two separate institutions: the Federal University of Minas Gerais University Hospital and the University of São Paulo at Ribeirão Preto University Hospital pulmonology clinics. Patients with age  $\geq 18$  years old and FPF were included. FPF was diagnosed based on standard criteria for ILD<sup>(1, 18)</sup> and by having at least one family member also affected with the disease<sup>(19, 20)</sup>. Progressive pulmonary fibrosis was defined based on the American Thoracic Society, the European Respiratory Society, the Japanese Respiratory Society, and the Latin American Thoracic Association (ATS/ERS/JRS/ALAT) guideline criteria<sup>(18)</sup>. Lung involvement was further assessed by high-resolution computed tomography (HRCT) scan and spirometry in all patients. An additional 44 telomere-biology disease (TBD) patients with bone marrow failure (aplastic anemia) but without clinical evidence for lung disease seen at the University of São Paulo at Ribeirão Preto University Hospital marrow failure clinic were also included. All patients gave written informed consent, and the study protocol was approved by the local Research Ethics Committee (CAAE number, 93617018.0.0000.5440).

### **Telomere length measurement**

Telomere length was determined using peripheral blood leukocyte DNA by Southern blotting, as previously described<sup>(21)</sup>. Telomere lengths  $< 20$ th percentile was considered short<sup>(22)</sup>; percentiles were adjusted from curves of age-matched telomere lengths of a reference cohort comprising 301 healthy blood donors.

### Massively parallel targeted sequencing

Fifty nanograms of DNA from peripheral blood leukocytes were used for sequencing of a customized panel (**Table E1**, online data supplement) targeting the exonic regions of 154 genes (surfactant-related metabolism, telomere biology, ribosome biology, DNA repair, hematopoiesis, and immune response) as well as intronic/regulatory regions frequently polymorphic in FPF (in *TERT*, *TOLLIP*, and *MUC5B*). An indexed library was prepared for each patient using the SureSelect Q.X.T. Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies) following the manufacturer's protocol. Pooled libraries were then sequenced on a NextSeq instrument (Illumina) using the NextSeq 500/550 High Output v2 for 300 cycles (Illumina). Reads were demultiplexed and mapped to the human genome (GRCh37/hg19) with the Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Variant calling was performed with the SAMTOOLS and GATK, then annotated using the wANNOVAR<sup>(23)</sup>. Germline variants were prioritized using inclusion criteria, such as (1) depth  $\geq 15$  (2) occurrence of nucleotide substitution, insertion or deletion in either exonic, splicing, or non-coding RNA exonic (for *TERC*) regions that lead to frameshift or nonsynonymous amino acid changes (missense or nonsense), (3) scaled Combined Annotation Dependent Depletion score  $\geq 15$ <sup>(24)</sup>, and (4) variant allele frequency (VAF)  $\leq 0.1\%$  (rare), or  $> 0.1\%$  and  $\leq 5\%$  (low-frequency) in the Genome Aggregation Database (gnomAD) V3.1.1<sup>(25)</sup>. Exclusion criteria comprised allele frequency in the sample  $\leq 40\%$  and description in the database of somatic variants in cancer, COSMIC<sup>(26)</sup>. Variants were classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics–Association for Molecular Pathology (ACMG–AMP) guidelines<sup>(27)</sup>. The Sherlock approach was applied to the rare variants<sup>(28)</sup>. Variants of uncertain significance (VUS) were reclassified as 'deleterious VUS' when scored as damaging in at least three *in silico* predictors<sup>(29)</sup>. All rare variants classified as pathogenic, likely pathogenic, deleterious VUS, or VUS were considered.

### Conditional inference tree

A conditional inference tree model was applied to classify the patients into subgroups according to two continuous and three discrete variables: age (in years) and telomere length (in kilobases), sex, *TOLLIP* common variant status, and *MUC5B* rs35705950 status. Conditional inference tree is a predictive modeling and machine-learning technique used to construct a classification system through successive partitions

based on variables of interest <sup>(30)</sup>. The algorithm computes optimal cut-offs for the continuous variables and provides a classification tree to show the results graphically. The conditional inference tree algorithm was performed in the R software environment v.4.2.0 (<http://www.r-project.org/>) with the *rpart* package.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed in the R software environment v.4.2.0. The chi-square test was applied to compare the polymorphism allele frequencies between FPF and the population genome databases gnomAD and the Online Archive of Brazilian Mutations (ABraOM) <sup>(31)</sup>. Allele frequency graphs were plotted with the GraphPad Prism software v.9.3.0 (GraphPad). The overall survival was calculated using the Kaplan-Meier method, and the survival of groups was compared using the log-rank test. Analyses and graphs were performed with the *survival* v.3.4.0 and *survminer* v.0.4.9 packages in R, respectively.

## RESULTS

### Patient demographics

This retrospective study is based on 82 independent FPF index cases seen at two institutions (the University of São Paulo at Ribeirão Preto and the Federal University of Minas Gerais at Belo Horizonte, Brazil). The median age at diagnosis was 68 years (ranging from 36 to 93 years). Most were female (54%) and smokers (54%). Twenty patients were diagnosed with usual interstitial pneumonia (UIP), 17 as possible UIP, and 45 as inconsistent with UIP on high-resolution computed tomography (HRCT) scan. An additional 44 telomere-biology disease (TBD) patients with bone marrow failure (aplastic anemia) without any clinical evidence of lung disease (non-lung-TBD) were also studied as controls. Their median age at diagnosis was 15 years (1.4 to 49 years), 73% were males, and 6.7% were smokers (**Table 1**).

### Rare gene variants and telomere length in FPF

Rare germline pathogenic, likely pathogenic variants, deleterious VUS, or VUS in telomere- biology genes were found in 24 patients (30%), all heterozygous (**Table 2**). Five variants have not been previously described: two variants in *TERT* splicing regions (c.2131-2A>G and c.219+17T>G), two variants that lead to premature stop

codons in *RTEL1* (p.Arg743\* and p.Glu256Arg fs\*12), and one in a *PARN* canonical splicing region (c.840+2T>G) (**Table 2**). Five variants were previously described but in four genes not yet associated with FPF: *ZBTB48*, *WRAP53*, *CTC1*, and *SHQ1* (**Table 2**). The *ZBTB48* gene, also named telomeric zinc finger-associated protein (TZAP), binds to extended telomeres to stimulate trimming and prevent their aberrant elongation.<sup>(32)</sup> Its dysregulation is reported in cancer<sup>(33)</sup>. The *WRAP53* gene encodes TCAB1, involved in the telomerase trafficking.<sup>(34)</sup> *CTC1*, along with *STN1* and *TEN1*, compose the telomere-capping CST complex, playing a role in telomeric structural integrity.<sup>(35, 36)</sup> Both *WRAP53* and *CTC1* have been described in dyskeratosis congenita as autosomal recessive.<sup>(37-39)</sup> *SHQ1* is required for the functional assembly of H/ACA ribonucleoproteins, thus assisting in telomerase stabilization<sup>(40)</sup> Compound heterozygous variants in *SHQ1* were found in severe neurological disorders<sup>(41, 42)</sup>

Peripheral blood leukocyte samples from relatives of two FPF index cases harboring rare variants were available: FPF7 (*TERT* p.Arg577Gln) and FPF12 (the new *RTEL1* p.Arg743\* variant) (**Table 2**). Sanger sequencing of samples collected from relatives confirmed that the variants segregated with the disease phenotype (**Figure E1**, online data supplement). Low-frequency germline variants in telomere-biology genes were detected in 23 FPF patients, all in heterozygosity and classified as benign, likely benign, or VUS (**Table E2**, online data supplement). Eight patients carried more than one variant, either rare and/or low frequency (**Table 2** and **Table E2**).

None of the patients harbored a rare germline variant in the surfactant-related metabolism genes (*ABCA3*, *SFTPA1*, *SFTPA2*, *SFTPB*, and *SFTPC*). Distinct low-frequency germline variants were detected in two FPF patients in the surfactant *SFTPA2* gene, both heterozygous and classified as VUS (**Table E2**).

Among the 24 patients carrying rare telomere-biology gene variants, 18 also had short-for-age telomeres (<20th percentile) (22% of the FPF cohort) (**Figure 1A**). The FPF cohort was then divided into two groups: the telomere-related (TR)-FPF, composed of those 18 patients who had both short telomeres and a rare variant, and the non-TR-FPF, comprised of the remaining 64 patients (78%) who did not meet the previous criteria. TR-FPF patients were diagnosed at a younger age than non-TR-FPF (median age, 63 years [range, 36-79] vs. 69 [42-93], respectively;  $P=0.006$ ). Telomeres were shorter in the TR-FPF group than in non-TR-FPF ( $P<0.0001$ ). There was no difference

in gender, smoking status, or lung involvement (assessed by HRCT scan and spirometry) between the two groups (**Table 1**).

### **Common gene variants associated with FPF.**

Common gene variants in *MUC5B* (rs35705950), *TERT* (rs2736100), and *TOLLIP* (rs5743890, rs5743894, and rs111521887), previously described as risk factors for IPF, were investigated in the FPF cohort. The *MUC5B* rs35705950 and *TOLLIP* rs5743894 and rs111521887 (the last two in linkage disequilibrium) variants were more common in the FPF cohort compared to the population genomic databases ABraOM and gnomAD ( $P < 0.003$ , **Figure 1B, upper panel**).

Of note, the *TOLLIP* common variants rs5743894 and rs111521887 were enriched in the non-TR-FPF group only (VAF, 0.22 vs. 0.12 and 0.11 in the gnomAD and ABraOM, respectively;  $P < 0.0007$ ), but not in the TR-FPF (VAF, 0.11). On the other hand, the *MUC5B* rs35705950 was enriched in both TR-FPF (VAF, 0.33;  $P < 2E-07$ ) and non-TR-FPF (VAF, 0.44;  $P < 2E-10$ ) groups compared to the ABraOM (AF, 0.07) and gnomAD (AF, 0.08) databases (**Figure 1B, lower panel**). These results indicate that rare telomere-biology genes interact with *MUC5B* (but not with *TOLLIP*) to develop lung disease.

### **Gene-gene interactions in FPF**

We then asked whether the association of short telomeres, rare telomere-biology gene variants, and the *MUC5B* rs35705950 was specific for TBD patients with the FPF phenotype. To address this question, we genotyped 44 unrelated non-lung-TBD patients, mostly with bone marrow failure or dyskeratosis congenita. The *MUC5B* rs35705950 allele frequency was similar between the non-lung-TBD patients (VAF, 0.09) and the ABraOM (VAF, 0.07) and gnomAD (VAF, 0.08) databases. Of note, the *TOLLIP* common variant allele frequency was also comparable between the non-lung-TBD patients (VAF, 0.17) and the population databases (VAF, 0.11 and 0.12 for ABraOM and gnomAD, respectively) (**Figure 1B, lower panel**). Taken together, these results indicate that the combination of rare telomere-biology gene variants and the *MUC5B* rs35705950 is more prevalent in telomeropathy patients with FPF phenotype, indicating that the resulting phenotypes of each gene variant cooperate for the development of lung disease.



### Clinical outcomes

Telomere length alone had no statistically significant direct impact on survival (median, 83.1 [95% confidence interval, 42.6 - 115.4] months for short vs. 128.8 [47.8 - 331] months for normal telomeres;  $P=0.1$ ; **Figure 2A**). On the other hand, the patients carrying rare variants in telomere-biology genes had an unfavorable overall survival (47.8 [24.4 - 83.1] months) in comparison to non-carriers (115.5 [71.9 - 179.7] months;  $P=0.002$ ; **Figure 2B**). TR-FPF patients had poorer overall survival than non-TR-FPF (61.2 [13.1 - 83.1] vs. 115.5 [71.9 - 179.7] months, respectively;  $P=0.0006$ ; **Figure 2C**). Additionally, the patients with UIP had unfavorable overall survival compared to the others (35.6 [24.5 - 83.1] vs. 115.5 [71.9 - 179.7] months, respectively;  $P=0.01$ ; **Figure 2D**).

### Classification using clinical and genetic data by conditional inference tree

Given the gene-gene interactions observed in FPF patients, we investigated whether the combination of clinical and genetic information could predict the likelihood of FPF being related to telomere dysfunction and, within TBD patients, to develop FPF. For this purpose, patients were labeled as TR-FPF, non-TR-FPF, and non-lung-TBD, and a conditional inference tree model was applied using five variables: age, sex, telomere length, *TOLLIP* variant status, and *MUC5B* rs35705950 status.

We first applied the model using the entire patient cohort, including the FPF and non-lung-TBD patients ( $n=126$ ). In the analysis of the entire dataset, only two variables were significant predictors: age and telomere length (**Figure 3A**). Based on these two predictors, the model partitioned into three groups and correctly classified patients in 91% of cases (**Figure 3B**). These results suggest that age and telomere length combination may help distinguish TR-FPF from non-TR-FPF.

Next, we addressed whether the model could predict the lung phenotype using the same variables among patients with telomeropathy (TR-FPF and non-lung-TBD;  $n=62$ ). In this scenario, the *MUC5B* variant status was the only variable that served as a predictor (**Figure 3C**). For this dataset of patients, the *MUC5B* variant status correctly predicted lung involvement in 76% of cases, further indicating that the combination of short telomeres, rare telomere-biology variants, and the *MUC5B* risk allele interact for the development of lung disease in this group of patients.

## DISCUSSION

The present study demonstrates the cooperation between rare telomere-biology gene variants, short telomeres, and the *MUC5B* rs35705950 risk allele in developing pulmonary fibrosis in individuals with telomeropathies. Rare pathogenic germline variants in telomere-biology genes have a high – but incomplete – penetrance and variable phenotypes<sup>(12, 19, 43)</sup>. Whereas some patients develop bone marrow failure and dyskeratosis congenita in the first decades of life, others develop pulmonary fibrosis in older ages, and some individuals remain asymptomatic through life<sup>(12)</sup>. Within the same family carrying the same pathogenic variant, the phenotype may be polymorphic between family members<sup>(44, 45)</sup>. In part, the variability and incomplete penetrance may be explained by disease anticipation<sup>(46, 47)</sup> but it does not explain the pleiotropy in many kindred.<sup>(5, 48)</sup> Other genetic, epigenetic, and environmental factors are likely to contribute to pleiotropism and incomplete penetrance. For instance, cigarette smoking is strongly associated with lung disease in telomere diseases<sup>(49)</sup>, including in the present cohort. On the other hand, the *MUC5B* rs35705950 risk allele is the most common risk factor for IPF, but it only increases the risk of IPF by 7-fold, indicating the necessity of additional factors<sup>(13)</sup>.

The present study demonstrates that gene epistasis between common and rare variants is essential for the pulmonary phenotype and that the *MUC5B* rs35705950 risk allele modulates the risk of developing FPF in patients carrying rare telomere-biology gene variants and short telomeres. To the best of our knowledge, this study is the first to investigate gene-gene interaction between rare and common pathogenic variants and telomere length in FPF compared to non-lung-TBD patients. In our cohort the *MUC5B* rs35705950 and *TOLLIP* common variants were enriched in FPF compared to public databases. The *MUC5B* rs35705950 was enriched in both TR-FPF and non-TR-FPF, whereas in non-lung TBD patients, its frequency was comparable to public databases, suggesting the *MUC5B* rs35705950 influence in developing pulmonary fibrosis. On the other hand, the *TOLLIP* common variants were enriched only in the non-TF-FPF patients.

These findings have biological and clinical implications. First, they contribute to dissecting the mechanisms promoting lung fibrosis in telomere-biology patients, which is still poorly understood. In conditional deletion mouse models lacking a telomere-binding protein, short telomeres of type 2 alveolar epithelial cells (AEC2s) appear to impair their regenerative capacity *in vitro*, drive alveolar stem cell failure, and may

provoke lung inflammation <sup>(50)</sup>. In the same model, bronchoalveolar lavage shows increased numbers of macrophages and lymphocytes, similar to what is found early in humans carrying rare telomere-biology gene variants <sup>(5)</sup>. However, these mice do not display restrictive or interstitial lung disease signs. Instead, they show increased total lung capacity and air space enlargement. When challenged with bleomycin-induced injury, these mice develop acute epithelial injury and eventually die, but no obvious sign of fibrosis. Thus, these cellular and molecular mechanisms do not completely explain how short telomeres eventually lead to fibrosis. Other mechanisms likely interact.

The *MUC5B* rs35705950 variant increases mucin 5B (MUC5B) secretion in the distal airways <sup>(51)</sup>. MUC5B is vital for adequate mucociliary clearance and innate defense by removing pathogens and chemicals from the airways. Also, in mouse models, increased Muc5b secretion impairs mucociliary clearance and facilitates lung fibrosis <sup>(52)</sup>. Higher Muc5b concentrations in the distal airways cause mucociliary stasis and, thus, more chronic exposure to inflammatory triggers, such as particles and pathogens. Our present findings on gene-gene interaction suggest that the alveolar stem cell failure, epithelial cell injury, and inflammation caused by short telomeres cooperate with defective mucociliary clearance of fibrogenic agents in the distal airways caused by excessive MUC5B to promote lung fibrosis.

On the other hand, *TOLLIP* common variants are associated with reduced Toll-interacting protein (TOLLIP) expression, mainly in lung macrophages and epithelial cells <sup>(53)</sup>. TOLLIP suppresses Toll-like receptor (TLR) activation, mainly TLR2 and TLR4, which are triggered by microbial signals <sup>(3)</sup>. In murine lungs, dysregulated microbiota can promote fibrosis via TLR2 and TLR4 <sup>(54)</sup>. Low TOLLIP expression also associates with increased pro-inflammatory cytokine secretion, such as IL-6 and TNF <sup>(55)</sup>. Thus, *TOLLIP* common variants promote a pro-fibrotic TLR signaling pathway prompted by bacterial signaling. However, the pro-inflammatory environment promoted by *TOLLIP* common variants in response to pathogen signals does not appear to cooperate with short telomeres for pulmonary fibrogenesis. These observations suggest that chemicals (e.g., cigarette smoking) may be more important than abnormal microbiota to the development of TBD patients' pro-fibrotic inflammation in the distal airways.

The proximity between the *MUC5B* and *TOLLIP* genes at chromosome 11p15.5 has suggested that these polymorphisms are in linkage disequilibrium<sup>(56)</sup>. Our findings do not support this hypothesis. Instead, they indicate that these genes contribute to IPF by independent mechanisms.

The clinical implications are also relevant. First, using age and telomere length, the conditional inference tree model correctly classified patients as TR-FPF, non-TF-FPF, or non-lung TBD in 91% of cases. This model may be further explored in future clinical studies. Second, *MUC5B* genotyping may help to identify TBD patients at higher risk of developing lung fibrosis. The *MUC5B* rs35705950 absence in a patient may reduce the need for frequent lung evaluation during follow-up. The *MUC5B* variant status among TBD patients was the only variable to predict lung involvement using the conditional inference tree, and this approach should be addressed and confirmed in future studies.

Our study has limitations. It is an observational retrospective study, which may be biased upon data registration. Information on comorbidities and therapies was not available for all patients. Given the disease's rarity, we could not validate the conditional inference tree findings in an independent cohort. Another limitation is the absence of imaging in patients with non-lung TBD, since interstitial abnormalities are known to be present in asymptomatic patients.

In conclusion, our findings indicate that rare telomere-biology gene variants, short telomeres, and the *MUC5B* rs35705950 allele cooperate in the development of interstitial lung disease. *TOLLIP* variants increase the risk of lung fibrosis in non-TR-FPF patients only. The combination of genotyping may help identify the subset of TBD patients more likely to develop lung disease and may be helpful as a screening tool in relatives of patients with IPF.

## **ACKNOWLEDGEMENT**

The authors thank Sandra Bresciani for her artwork assistance.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: (A)** Telomere length of FPF and telomeropathy patients without lung disease (non-lung-TBD) in kilobases (kb) as a function of age (years, y). The curves represent percentiles adjusted from age-matched telomere lengths of a reference cohort comprising 301 healthy individuals assessed by Southern blot. Telomeres <20th percentile were considered short. FPF patients with short telomeres and harboring rare variants in telomere-biology genes are represented as colored circles. Low-frequency and common variants in FPF, as well as variants in non-lung-TBD patients are not represented. **(B)** Upper panel: allele frequencies of five common variants (in *TERT*, *TOLLIP*, and *MUC5B*) described in previous studies as risk factors for idiopathic PF are displayed for the FPF cohort (n=82), as well as for the ABraOM (n=1,170) and gnomAD (n>75,000) databases; \* $P < 0.003$  vs. databases. Lower panel: allele frequencies of the three common variants enriched in the FPF cohort, here divided into telomere-related (TR)-FPF (n=18), and non-TR-FPF (n=64); frequencies are also displayed for the non-lung-TBD patients (n=44), as well as the ABraOM (n=1,170) and gnomAD (n>75,000) databases; \* $P < 0.0007$  vs. databases.

**Figure 2. Overall survival in familial pulmonary fibrosis (FPF).** The overall survival was calculated for the patients divided into **(A)** short-for-age and normal telomere length, **(B)** carriers and non-carriers of rare variants in telomere-biology genes, **(C)** TR- and non-TR-FPF, and **(D)** with or without the usual interstitial pneumonia (UIP) pattern, then represented as a survival probability against the time (in months).

**Figure 3. Conditional inference trees to predict the likelihood of familial pulmonary fibrosis (FPF).** **(A)** The inference tree was first modeled including the FPF and telomeropathy patients without lung disease (non-lung-TBD) (n=126), and using five variables - age, sex, telomere length (TL), *TOLLIP*, and *MUC5B* variant status - but only age and TL were significant predictors in the final model. **(B)** Space partitioning based on predictors (age and TL). **(C)** Inference tree to predict lung phenotype in telomeropathies (TR-FPF and non-lung-TBD, n=62); *MUC5B* variant status was the significant predictor.

**Supplementary Figure E1. Pedigrees of familial pulmonary fibrosis (FPF).** The occurrence of rare variants in telomere-biology genes, adjusted-for-age telomere

length (TL), and clinical manifestation are represented for individuals of two unrelated families: Family 1, for the *RTEL1* p.Arg743\* (proband: FPF12), and Family 2 for the *TERT* p.Arg577Gln (proband: FPF7).

## REFERENCES

- 1 - Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018; 198(5): e44-e68.
- 2 - Sgalla G, Iovene B, Calvello M, Ori M, Varone F and Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respir Res*. 2018; 19(1): 32.
- 3 - Michalski JE and Schwartz DA. Genetic Risk Factors for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Insights into Immunopathogenesis. *J Inflamm Res*. 2020; 13(1305-18).
- 4 - Garcia CK, Talbert JL. Pulmonary Fibrosis Predisposition Overview. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA); 1993.
- 5 - El-Chemaly S, Ziegler SG, Calado RT, Wilson KA, Wu HP, Haughey M, et al. Natural History of Pulmonary Fibrosis in Two Subjects With the Same Telomerase Mutation. *Chest*. 2011; 139(5): 1203-09.
- 6 - Mac MJ. Familial pulmonary fibrosis. *Dis Chest*. 1951; 20(4): 426-36.
- 7 - Bitterman PB, Rennard SI, Keogh BA, Wewers MD, Adelberg S and Crystal RG. Familial idiopathic pulmonary fibrosis. Evidence of lung inflammation in unaffected family members. *N Engl J Med*. 1986; 314(21): 1343-7.

- 8 - Garcia-Sancho C, Buendia-Roldan I, Fernandez-Plata MR, Navarro C, Perez-Padilla R, Vargas MH, et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2011; 105(12): 1902-7.
- 9 - Loyd JE. Pulmonary fibrosis in families. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 29(3 Suppl): S47-50.
- 10 - Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(18): 7552-7.
- 11 - Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007; 356(13): 1317-26.
- 12 - Calado RT and Young NS. Mechanisms of Disease: Telomere Diseases. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361(24): 2353-65.
- 13 - Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2011; 364(16): 1503-12.
- 14 - Noth I, Zhang Y, Ma SF, Flores C, Barber M, Huang Y, et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med*. 2013; 1(4): 309-17.
- 15 - Fingerlin TE, Murphy E, Zhang W, Peljto AL, Brown KK, Steele MP, et al. Genome-wide association study identifies multiple susceptibility loci for pulmonary fibrosis. *Nat Genet*. 2013; 45(6): 613-20.
- 16 - Dressen A, Abbas AR, Cabanski C, Reeder J, Ramalingam TR, Neighbors M, et al. Analysis of protein-altering variants in telomerase genes and their association with MUC5B common variant status in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a candidate gene sequencing study. *Lancet Respir Med*. 2018; 6(8): 603-14.

17 - Van Der Vis JJ, Van Der Smagt JJ, Hennekam FaM, Grutters JC and Van Moorsel CHM. Pulmonary Fibrosis and a TERT Founder Mutation With a Latency Period of 300 Years. *Chest*. 2020; 158(2): 612-19.

18 - Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022; 205(9): e18-e47.

19 - Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, et al. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(9): 1146-52.

20 - Hortense AB, Santos MKD, Wada D, Fabro AT, Lima M, Rodrigues S, et al. Familial pulmonary fibrosis: a heterogeneous spectrum of presentations. *J Bras Pneumol*. 2019; 45(5): e20180079.

21 - Gutierrez-Rodrigues F, Santana-Lemos BA, Scheucher PS, Alves-Paiva RM and Calado RT. Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans. *Plos One*. 2014; 9(11):

22 - Alder JK, Hanumanthu VS, Strong MA, Dezern AE, Stanley SE, Takemoto CM, et al. Diagnostic utility of telomere length testing in a hospital-based setting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(10): E2358-E65.

23 - Yang H and Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc*. 2015; 10(10): 1556-66.

24 - Kircher M, Witten DM, Jain P, O'roak BJ, Cooper GM and Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014; 46(3): 310-5.



25 - Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020; 581(7809): 434-43.

26 - Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1): D941-D47.

27 - Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5): 405-24.

28 - Nykamp K, Anderson M, Powers M, Garcia J, Herrera B, Ho YY, et al. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med*. 2017; 19(10): 1105-17.

29 - McCreynolds LJ, Rafati M, Wang Y, Ballew BJ, Kim J, Williams VV, et al. Genetic testing in severe aplastic anemia is required for optimal hematopoietic cell transplant outcomes. *Blood*. 2022; 140(8): 909-21.

30 - Breiman L, Friedman J, Stone CJ, Olshen R. *Classification and Regression Trees*. CRC Press; 1984.

31 - Naslavsky MS, Yamamoto GL, De Almeida TF, Ezquina SaM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat*. 2017; 38(7): 751-63.

32 - Li JS, Miralles Fuste J, Simavorian T, Bartocci C, Tsai J, Karlseder J, et al. TZAP: A telomere-associated protein involved in telomere length control. *Science*. 2017; 355(6325): 638-41.

- 33 - Dos Santos GA, Viana NI, Pimenta R, De Camargo JA, S TR, Moreira Leite KR, et al. Telomeric zinc-finger associated protein (TZAP) in cancer biology: friend or foe? *Mol Biol Res Commun*. 2021; 10(3): 121-29.
- 34 - Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, Mccann KE, Terns RM, Veenstra TD, et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*. 2009; 323(5914): 644-8.
- 35 - Miyake Y, Nakamura M, Nabetani A, Shimamura S, Tamura M, Yonehara S, et al. RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Mol Cell*. 2009; 36(2): 193-206.
- 36 - Surovtseva YV, Churikov D, Boltz KA, Song X, Lamb JC, Warrington R, et al. Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. *Mol Cell*. 2009; 36(2): 207-18.
- 37 - Zhong F, Savage SA, Shkreli M, Giri N, Jessop L, Myers T, et al. Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes Dev*. 2011; 25(1): 11-6.
- 38 - Walne AJ, Bhagat T, Kirwan M, Gitiaux C, Desguerre I, Leonard N, et al. Mutations in the telomere capping complex in bone marrow failure and related syndromes. *Haematologica*. 2013; 98(3): 334-8.
- 39 - Keller RB, Gagne KE, Usmani GN, Asdourian GK, Williams DA, Hofmann I, et al. CTC1 Mutations in a patient with dyskeratosis congenita. *Pediatr Blood Cancer*. 2012; 59(2): 311-4.
- 40 - Grozdanov PN, Roy S, Kittur N and Meier UT. SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs. *RNA*. 2009; 15(6): 1188-97.

41 - Bizarro J and Meier UT. Inherited SHQ1 mutations impair interaction with NAP57/dyskerin, a major target in dyskeratosis congenita. *Mol Genet Genomic Med.* 2017; 5(6): 805-08.

42 - Sleiman S, Marshall AE, Dong X, Mhanni A, Alidou-D'anjou I, Frosk P, et al. Compound heterozygous variants in SHQ1 are associated with a spectrum of neurological features, including early-onset dystonia. *Hum Mol Genet.* 2022; 31(4): 614-24.

43 - Armanios M. The Role of Telomeres in Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2022; 23(363-81).

44 - Chiang YJ, Calado RT, Hathcock KS, Lansdorp PM, Young NS and Hodes RJ. Telomere length is inherited with resetting of the telomere set-point. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010; 107(22): 10148-53.

45 - Winkler T, Hong SG, Decker JE, Morgan MJ, Wu CF, Hughes WM, et al. Defective telomere elongation and hematopoiesis from telomerase-mutant aplastic anemia iPSCs. *Journal of Clinical Investigation.* 2013; 123(5): 1952-63.

46 - Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ and Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet.* 2004; 36(5): 447-9.

47 - Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, Griffin CA, et al. Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(44): 15960-4.

48 - Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, Schrupp DS, Peterson NR, Pons V, et al. A Spectrum of Severe Familial Liver Disorders Associate with Telomerase Mutations. *Plos One.* 2009; 4(11):

49 - Diaz De Leon A, Cronkhite JT, Katzenstein AL, Godwin JD, Raghu G, Glazer CS, et al. Telomere lengths, pulmonary fibrosis and telomerase (TERT) mutations. *PLoS One*. 2010; 5(5): e10680.

50 - Alder JK, Barkauskas CE, Limjunyawong N, Stanley SE, Kembou F, Tuder RM, et al. Telomere dysfunction causes alveolar stem cell failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(16): 5099-104.

51 - Fahy JV and Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med*. 2010; 363(23): 2233-47.

52 - Hancock LA, Hennessy CE, Solomon GM, Dobrinskikh E, Estrella A, Hara N, et al. Muc5b overexpression causes mucociliary dysfunction and enhances lung fibrosis in mice. *Nat Commun*. 2018; 9(1): 5363.

53 - Zhang G and Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem*. 2002; 277(9): 7059-65.

54 - Yang D, Chen X, Wang J, Lou Q, Lou Y, Li L, et al. Dysregulated Lung Commensal Bacteria Drive Interleukin-17B Production to Promote Pulmonary Fibrosis through Their Outer Membrane Vesicles. *Immunity*. 2019; 50(3): 692-706 e7.

55 - Didierlaurent A, Brissoni B, Velin D, Aebi N, Tardivel A, Kaslin E, et al. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(3): 735-42.

56 - Moore C, Blumhagen RZ, Yang IV, Walts A, Powers J, Walker T, et al. Resequencing Study Confirms That Host Defense and Cell Senescence Gene Variants Contribute to the Risk of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200(2): 199-208.

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of patients with familial pulmonary fibrosis

	FPF (n=82)		<i>P</i> value**	non-lung-TBD	<i>P</i> value** (vs. TR-FPF)
	non-TR-FPF	TR-FPF			
<i>n</i>	64	18		44	
Age at diagnosis, <i>median (range)</i> , years	69 (42-93)	63 (36-79)	0.006	15 (1.4-49)	<0.0001
Female %	57.8	38.9	ns	27	ns
Ever smoker %	56.2	44.4	ns	6.7	0.02
Telomere length, <i>mean (S.D.)</i> , kb	5.8 (0.8)	4.7 (0.6)	<0.0001	4.1 (1.1)	ns
FVC % predicted, <i>mean (S.D.)</i>	76.5 (18.5)	76.6 (18.4)	ns	98.5 (14.1)*	0.02
DLCO % predicted, <i>mean (S.D.)</i>	57.2 (16.7)	53.7 (18.8)	ns	86.2 (28.5)*	0.0006
HRCT pattern			ns	n/a	
UIP, <i>n</i>	13	7			
Possible UIP, <i>n</i>	15	2			
Inconsistent with UIP, <i>n</i>	36	9			

\* data available for 8 patients.

\*\* ANOVA and Fisher's exact test for quantitative and categorical variables, respectively.

FPF, familial pulmonary fibrosis; TR-FPF, telomere-related familial pulmonary fibrosis; non-TF-FPF, non-telomere-related familial pulmonary fibrosis; non-lung-TBD, non-lung telomere-biology disease. S.D., standard deviation; kb, kilobases; FVC, forced vital capacity; DLCO, diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide; HRCT, high-resolution computed tomography; UIP, usual interstitial pneumonia; ns, not significant; n/a, not applicable.

**Table 2.** Rare variants (frequency  $\leq 0.1\%$ ) in telomere-biology genes in patients with familial pulmonary fibrosis (n=25).

ID	Age	TL, kb (%)	Rare variant	Region	Class	dbSNP
<b>FPF1</b>	61.1	3.2 (<1%)	<i>RTEL1</i> c.765delG p.Glu256Arg fs*12	exonic	P	none <sup>§</sup>
FPF2	36.0	3.7 (<1%)	<i>TERT</i> c.2146G>A p.Ala716Thr	exonic	P	none
FPF3	35.5	4.6 (<10%)	<i>TERT</i> c.2594G>A p.Arg865His	exonic	P	rs121918666
FPF4	65.5	4.7 (<10%)	<i>TERT</i> c.2911C>T p.Arg971Cys	exonic	P	none
FPF5	64.8	3.5 (<10%)	<i>TERT</i> c.2131-2A>G	can splicing	LP	none <sup>§</sup>
FPF6	62.7	4.9 (<10%)	<i>PARN</i> c.840+2T>G	can splicing	LP	none <sup>§</sup>
FPF7	78.6	5.2 (<20%)	<i>TERT</i> c.1730G>A p.Arg577Gln	exonic	LP	rs1311034283
FPF8	63.6	4.4 (<10%)	<i>TERT</i> c.1639T>G p.Trp547Gly	exonic	dVUS	rs1223467172
FPF9	61.6	4.6 (<10%)	<i>TERT</i> c.2368G>A p.Val790Ile	exonic	dVUS	rs371413388
FPF10	53.5	5.0 (10%)	<i>RTEL1</i> c.394C>T p.Arg132Trp	exonic	dVUS	rs769533935
FPF11	55.9	5.1 (<20%)	<i>PARN</i> c.863A>G p.Asn288Ser	exonic	dVUS	rs1970311758
FPF12	51.5	5.5 (<20%)	<i>RTEL1</i> c.2227C>T p.Arg743*	exonic	dVUS	none <sup>§</sup>
FPF13	56.7	5.4 (<20%)	<i>ZBTB48</i> c.1643G>A p.Arg548Gln	exonic	dVUS	rs151110060
FPF14	63.9	4.9 (<10%)	<i>RTEL1</i> c.3505T>C p.Ser1169Pro	exonic	VUS	rs143248833
FPF15	72.4	4.6 (<10%)	<i>TERT</i> c.219+17T>G	splicing	VUS	none <sup>§</sup>
<b>FPF16</b>	65.3	4.8 (<10%)	<i>WRAP53</i> c.415G>A p.Glu139Lys	exonic	VUS	rs766610610
<b>FPF17</b>	74.7	4.6 (10%)	<i>NHP2</i> c.352G>A p.Ala118Thr	exonic	VUS	rs139588879
FPF18	67.7	5.0 (<20%)	<i>RTEL1</i> c.1800+3C>T	splicing	VUS	rs764757029
FPF19	59.9	7.1 (50-60%)	<i>TERT</i> c.3268G>A p.Val1090Met	exonic	dVUS	rs121918664
<b>FPF20</b>	74.1	6.6 (50-60%)	<i>NAF1</i> c.532C>T p.Leu178Phe	exonic	dVUS	rs562985037
<b>FPF21</b>	74.2	5.5 (20-30%)	<i>CTC1</i> c.1241G>A p.Gly414Glu	exonic	dVUS	rs62624978
FPF22	66.2	6.1 (30-40%)	<i>ACD</i> c.1220C>T p.Ser407Leu	exonic	VUS	rs374925782
FPF23	75.9	6.0 (30-40%)	<i>CTC1</i> c.1051C>T p.Arg351Trp	exonic	VUS	rs374781255
<b>FPF24</b>	55.7	6.6 (40-50%)	<i>SHQ1</i> c.828_831del p.Asp277Ser fs*27	exonic	VUS	rs571329853
FPF25	85.5	7.8 (85-90%)	<i>WRAP53</i> c.1558dupG p.Ala522Gly fs*8	exonic	VUS	rs755116516

Age presented in years. TL, telomere length; kb, kilobases; %, percentiles adjusted from curves of age-matched telomere lengths of a reference cohort comprising 301 healthy individuals assessed by Southern blot. Patients with short telomeres (<20<sup>th</sup> percentile) are highlighted in grey.

Variants annotated in the following isoforms from the NCBI RefSeq database: *ACD* NM\_001082486.2, *CTC1* NM\_025099.6, *NAF1* NM\_138386.3, *NHP2* NM\_017838.4, *PARN* NM\_002582.4, *RTEL1* NM\_016434.4, *SHQ1* NM\_018130, *TERT* NM\_198253.3, *WRAP53 (TCAB1)* NM\_001143992.2, and *ZBTB48 (TZAP)* NM\_005341.4. All variants are heterozygous.

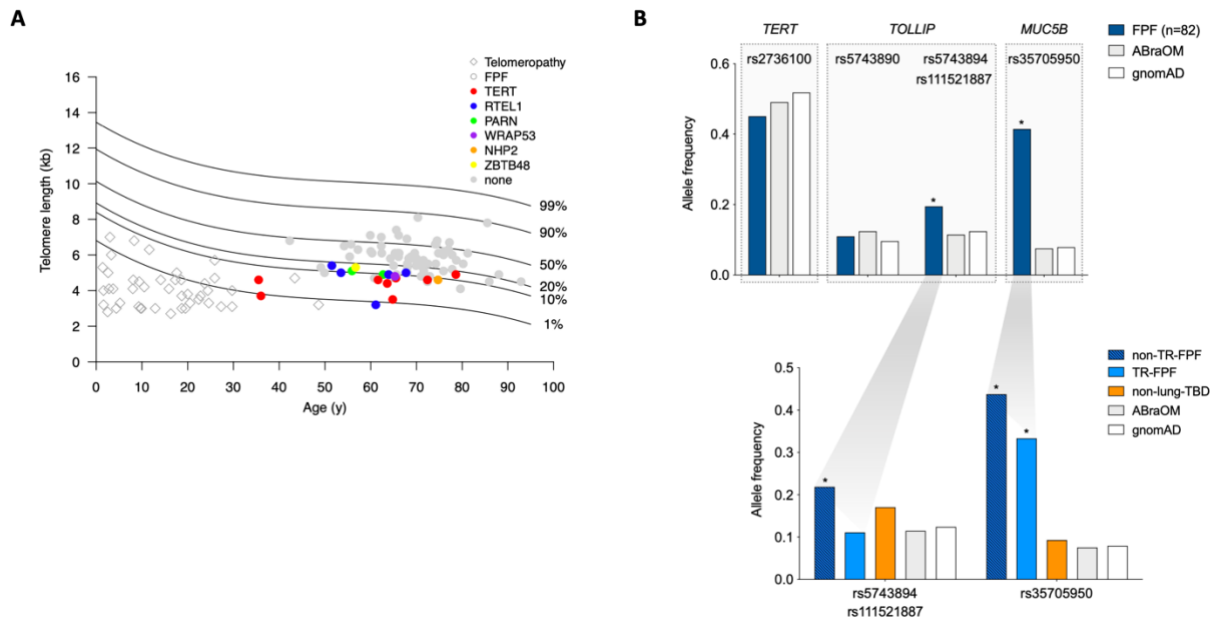
can splicing, canonical splicing.

Class, classification. P, pathogenic; LP, likely pathogenic; VUS, variant of uncertain significance; dVUS, deleterious VUS.

dbSNP: identification in the NCBI Single Nucleotide Polymorphism Database.

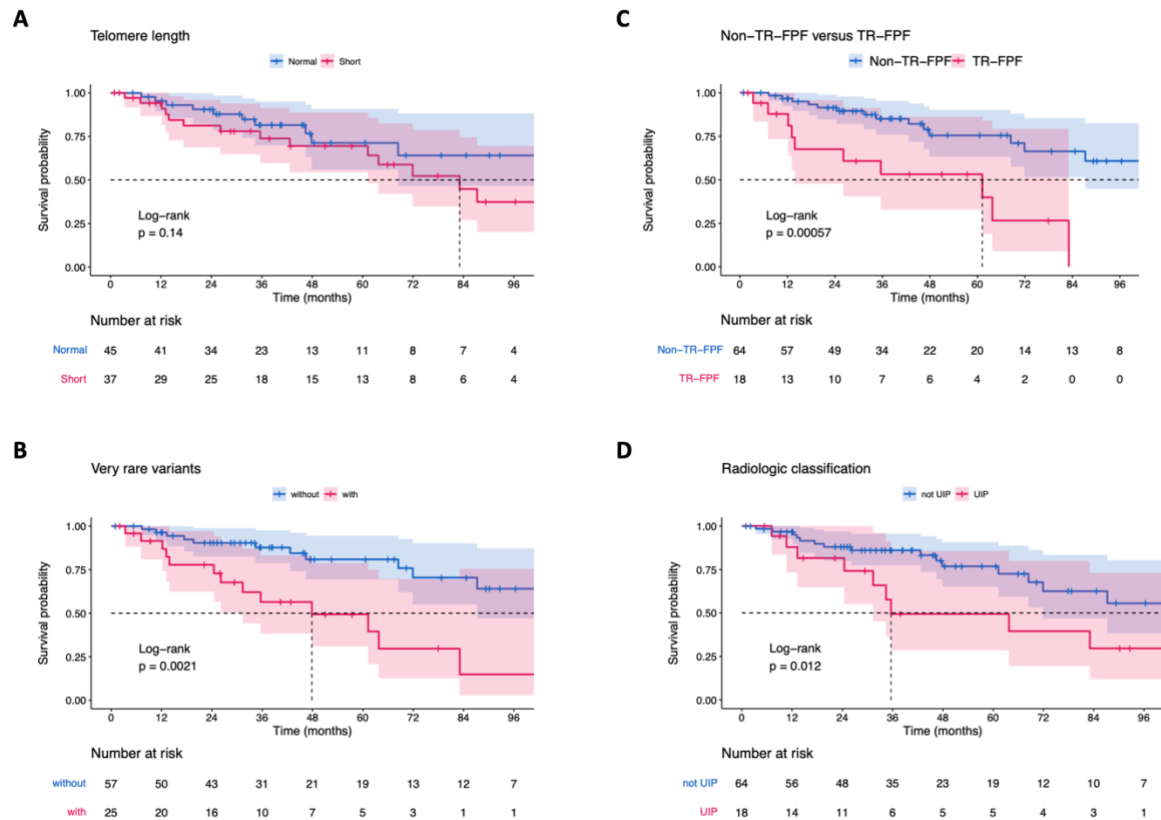
§ new variant.

Identifiers ('ID' column) in bold represent patients harboring more than one variant (either rare or low frequency).

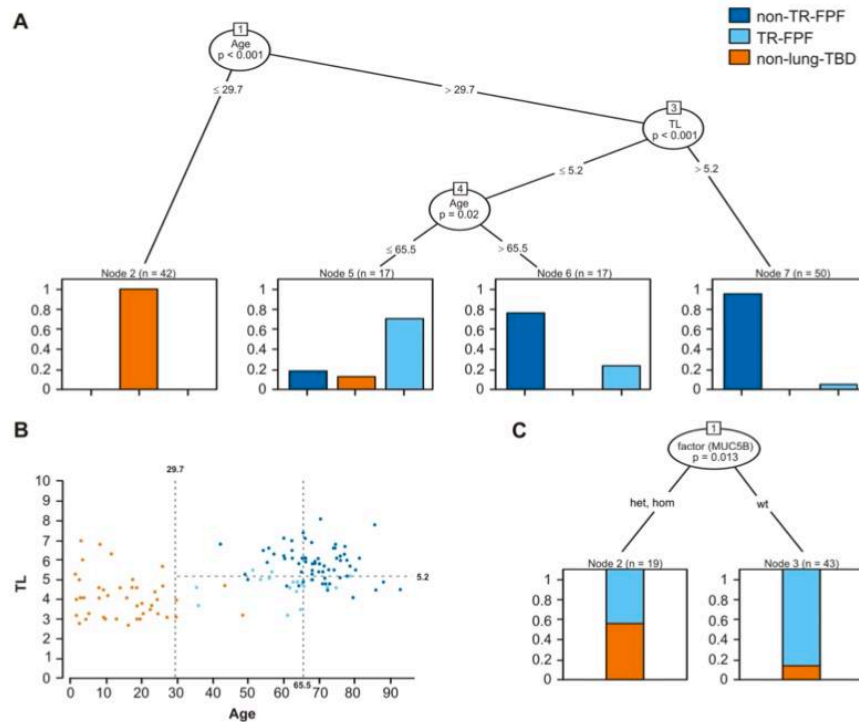


**Figure 1: (A)** Telomere length of FPF and telomeropathy patients without lung disease (non-lung-TBD) in kilobases (kb) as a function of age (years, y). The curves represent percentiles adjusted from age-matched telomere lengths of a reference cohort comprising 301 healthy individuals assessed by Southern blot. Telomeres <20th percentile were considered short. FPF patients with short telomeres and harboring rare variants in telomere-biology genes are represented as colored circles. Low-frequency and common variants in FPF, as well as variants in non-lung-TBD patients are not represented. **(B)** Upper panel: allele frequencies of five common variants (in *TERT*, *TOLLIP*, and *MUC5B*) described in previous studies as risk factors for idiopathic PF are displayed for the FPF cohort (n=82), as well as for the ABraOM (n=1,170) and gnomAD (n>75,000) databases; \* $P < 0.003$  vs. databases. Lower panel: allele frequencies of the three common variants enriched in the FPF cohort, here divided into telomere-related (TR)-FPF (n=18), and non-TR-FPF (n=64); frequencies are also displayed for the non-lung-TBD patients (n=44), as well as the ABraOM (n=1,170) and gnomAD (n>75,000) databases; \* $P < 0.0007$  vs. databases.





**Figure 2. Overall survival in familial pulmonary fibrosis (FPF).** The overall survival was calculated for the patients divided into **(A)** short-for-age and normal telomere length, **(B)** carriers and non-carriers of rare variants in telomere-biology genes, **(C)** TR- and non-TR-FPF, and **(D)** with or without the usual interstitial pneumonia (UIP) pattern, then represented as a survival probability against the time (in months).



**Figure 3. Conditional inference trees to predict the likelihood of familial pulmonary fibrosis (FPF). (A)** The inference tree was first modeled including the FPF and telomeropathy patients without lung disease (non-lung-TBD) ( $n=126$ ), and using five variables - age, sex, telomere length (TL), *TOLLIP*, and *MUC5B* variant status - but only age and TL were significant predictors in the final model. **(B)** Space partitioning based on predictors (age and TL). **(C)** Inference tree to predict lung phenotype in telomeropathies (TR-FPF and non-lung-TBD,  $n=62$ ); *MUC5B* variant status was the significant predictor.

## **Common and rare genetic variant interaction in familial pulmonary fibrosis**

Flávia S. Donaires,<sup>1,\*</sup> André L. Pinto,<sup>1,\*</sup> Ana Beatriz Hortense,<sup>2</sup> Fernanda Gutierrez-Rodrigues,<sup>3</sup> Barbara A. Santana,<sup>1</sup> Luiz Fernando B. Catto,<sup>1</sup> Diego V. Clé,<sup>1</sup> Eliane V. Mancuzo,<sup>4</sup> Ricardo de Amorim Correa,<sup>4</sup> Edson Z. Martinez,<sup>5</sup> José Baddini-Martinez,<sup>2,6</sup> Deborah R. Estrella,<sup>4</sup> and Rodrigo T. Calado<sup>1</sup>

### **Online Data Supplement**

#### **Supplemental methods Sanger sequencing**

Polymerase chain reactions (PCR) were prepared with total DNA from peripheral blood leukocytes, the HotStarTaq Kit (Qiagen), and primers (sequences are available upon request). PCR products were cleaned with the ExoSAP-IT reagent (Applied Biosystems), and used to prepare sequencing reactions with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Reactions were run on an ABI 3500 XL equipment (Applied Biosystems), and analyzed in the Sequencher software v5 (Gene Codes Corporation). All kits were used following the manufacturers' recommendations.

**Supplementary Table S1.** Customized panel for massively parallel targeted sequencing comprising the exons of 154 genes (surfactant-related metabolism, telomere biology, ribosome biology, DNA repair, hematopoiesis, and immune response) and intronic/regulatory regions frequently polymorphic in FPF (in *TERT*, *TOLLIP*, and *MUC5B*).

<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>RTEL1</i>	<i>TERT</i> gene
<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>	

**Supplementary Table S2.** Low frequency (>0.1% and ≤5%) variants in telomere-biology and surfactant genes in patients with familial pulmonary fibrosis.

ID	Age	TL, kb (%)	Low-frequency variant	Region	Class	dbSNP
<b>Telomere-biology genes</b>						
FPF26	49.9	5.0 (<10%)	<i>NAF1</i> c.1478A>C p.Tyr493Ser	exonic	LB	rs143001503
<b>FPF27</b>	64.3	4.7 (<10%)	<i>NAF1</i> c.1478A>C p.Tyr493Ser	exonic	LB	rs143001503
<b>FPF21</b>	74.2	5.5 (20-30%)	<i>NAF1</i> c.1478A>C p.Tyr493Ser	exonic	LB	rs143001503
<b>FPF21</b>	74.2	5.5 (20-30%)	<i>NHP2</i> c.302G>A p.Arg101Gln	exonic	B	rs145890370
<b>FPF24</b>	55.7	6.6 (40-50%)	<i>TINF2</i> c.721C>T p.Pro241Ser	exonic	B	rs17102311
FPF28	74.5	6.8 (50-60%)	<i>CTC1</i> c.1307G>A p.Arg436His	exonic	B	rs75790638
<b>FPF1</b>	61.1	3.2 (<1%)	<i>RTEL1</i> c.2051G>A p.Arg684Gln	exonic	B	rs35640778
FPF29	71.0	4.8 (<20%)	<i>RTEL1</i> c.2051G>A p.Arg684Gln	exonic	B	rs35640778
FPF30	65.6	4.9 (<20%)	<i>RTEL1</i> c.2051G>A p.Arg684Gln	exonic	B	rs35640778
FPF31	62.3	6.5 (40-50%)	<i>RTEL1</i> c.2051G>A p.Arg684Gln	exonic	B	rs35640778
FPF32	81.2	6.1 (40-50%)	<i>RTEL1</i> c.2051G>A p.Arg684Gln	exonic	B	rs35640778
<b>FPF16</b>	65.3	4.8 (<10%)	<i>CTC1</i> c.1241G>C p.Gly414Ala	exonic	B	rs62624978
<b>FPF27</b>	64.3	4.7 (<10%)	<i>CTC1</i> c.1241G>C p.Gly414Ala	exonic	B	rs62624978
FPF33	65.9	6.1 (30-40%)	<i>CTC1</i> c.1241G>C p.Gly414Ala	exonic	B	rs62624978
<b>FPF17</b>	74.7	4.6 (10%)	<i>ZBTB48</i> c.679G>A p.Gly227Ser	exonic	B	rs72634778
FPF34	60.0	6.2 (30-40%)	<i>ZBTB48</i> c.679G>A p.Gly227Ser	exonic	B	rs72634778
FPF35	75.9	6.2 (40-50%)	<i>ZBTB48</i> c.679G>A p.Gly227Ser	exonic	B	rs72634778
FPF36	74.8	6.1 (40-50%)	<i>CTC1</i> c.248G>C p.Ser83Thr	exonic	B	rs78870822
<b>FPF20</b>	74.1	6.6 (50-60%)	<i>CTC1</i> c.248G>C p.Ser83Thr	exonic	B	rs78870822
FPF37	65.6	7.4 (70-80%)	<i>CTC1</i> c.248G>C p.Ser83Thr	exonic	B	rs78870822
FPF38	68.3	5.8 (20-30%)	<i>PARN</i> c.1690G>A p.Val564Ile	exonic	B	rs35722504
FPF39	92.9	4.5 (20-30%)	<i>PARN</i> c.1690G>A p.Val564Ile	exonic	B	rs35722504
FPF40	71.5	5.7 (20-30%)	<i>PARN</i> c.1690G>A p.Val564Ile	exonic	B	rs35722504
FPF41	70.9	5.4 (<20%)	<i>SHQ1</i> c.215T>G p.Phe72Cys	exonic	B	rs78491606
<b>FPF42</b>	68.8	5.8 (20-30%)	<i>SHQ1</i> c.215T>G p.Phe72Cys	exonic	B	rs78491606
<b>FPF42</b>	68.8	5.8 (20-30%)	<i>DKC1</i> c.1491_1492insAAG p.Lys505_Ala506insLys	exonic	B	rs797045523
<b>Surfactant genes</b>						
FPF43	55.4	5.9 (20-30%)	<i>SFTPA2</i> c.-26-2G>T	splicing	VUS	rs1650232
FPF44	62.3	7.0 (50-60%)	<i>SFTPA2</i> c.253C>T p.Arg85Cys	exonic	VUS	rs150273659

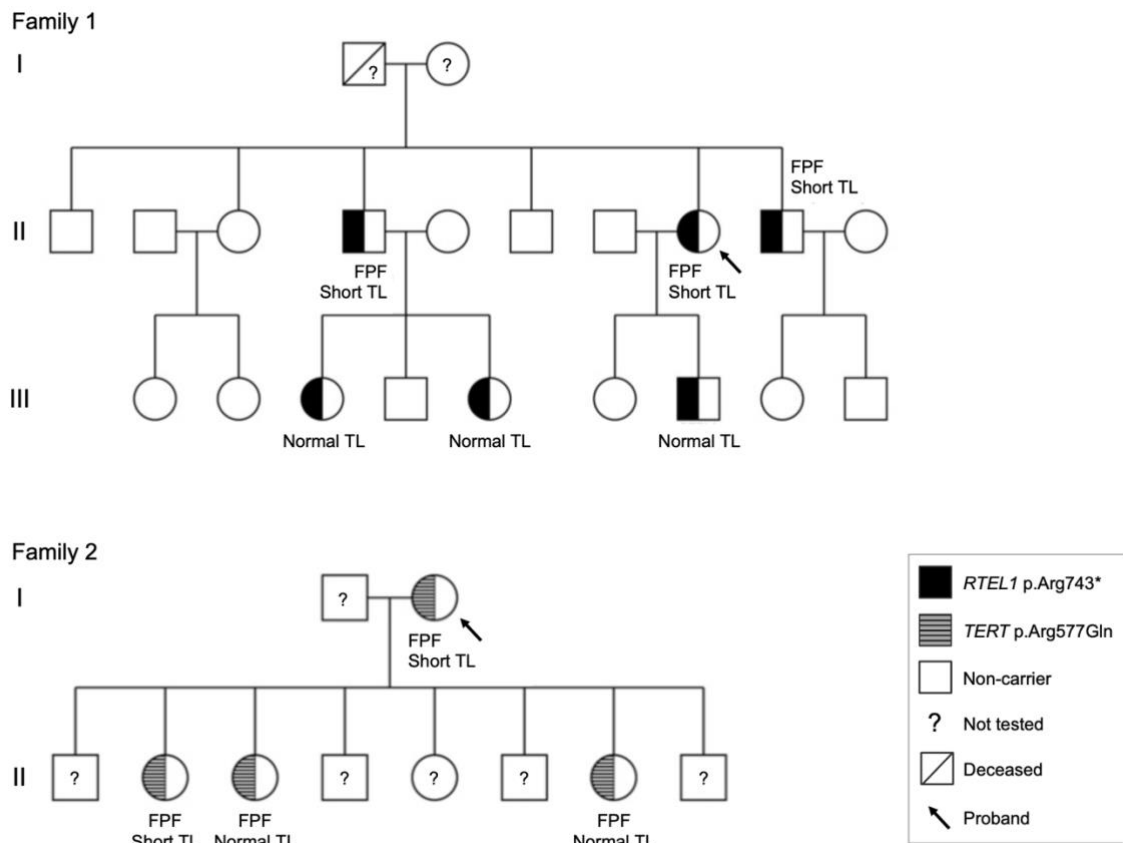
Age presented in years. TL, telomere length; kb, kilobases; %, percentiles adjusted from curves of age-matched telomere lengths of a reference cohort comprising 301 healthy individuals assessed by Southern blot. Telomere lengths <20<sup>th</sup> percentile were considered short.

Variants annotated in the following isoforms from the NCBI RefSeq database: *CTC1* NM\_025099.6, *DKC1* NM\_001363.5, *NAF1* NM\_138386.3, *NHP2* NM\_017838.4, *PARN* NM\_002582.4, *RTEL1* NM\_016434.4, *SFTPA2* NM\_001320813, *SHQ1* NM\_018130, *TINF2* NM\_001099274, and *ZBTB48 (TZAP)* NM\_005341.4. All variants are heterozygous.

Class, classification. B, benign; LB, likely benign; VUS, variant of uncertain significance.

dbSNP: identification in the NCBI Single Nucleotide Polymorphism Database.

Patients harboring the same variants are presented in consecutive rows. Identifiers ('ID' column) in bold represent patients harboring more than one variant (either rare or low-frequency).



**Supplementary Figure E1. Pedigrees of familial pulmonary fibrosis (FPF).** The occurrence of rare variants in telomere-biology genes, adjusted-for-age telomere length (TL), and clinical manifestation are represented for individuals of two unrelated families: Family 1, for the *RTEL1* p.Arg743\* (proband: FPF12), and Family 2 for the *TERT* p.Arg577Gln (proband: FPF7).

## 7.2 Artigo 02

**Title: Survival in familial idiopathic pulmonary fibrosis and fibrotic hypersensitivity pneumonitis.**

Authors: Deborah R. Estrella<sup>1</sup>, Eliane V. Mancuzo<sup>1</sup>, Maria Raquel Soares<sup>2</sup>, Regina T<sup>2</sup>, Carlos Alberto C Pereira<sup>2</sup>, Ricardo A. Corrêa<sup>1</sup>.

1.Department of Internal Medicine, Federal University of Minas Gerais. Belo Horizonte/MG, Brazil

2.Department of Pneumology, Federal University of Sao Paulo. Sao Paulo/SP, Brazil.

Corresponding Author:

Deborah R Estrella, MD, PhD.

Federal University of Minas Gerais

Avenue Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia, Belo Horizonte/MG - Brazil,

Zip code: 30130-100.

[drdeborahestrella@gmail.com](mailto:drdeborahestrella@gmail.com)

Authors contributions: D.R.E., E.V.M. and R.A.C. designed the study. D.R.E., E.V.M., M.R.S., R.T and C.A.C.P. contributed with data collection and intellectual input. C.A.C.P. helped with statistical analysis. D.R.E., E.V.M., M.R.S., R.T and C.A.C.P. and R.A.C wrote the manuscript.

Funding support: none

Word count: 994 words

Target Journal: *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine- Research Letter*



## INTRODUCTION

Familial pulmonary fibrosis (FPF) is defined as the presence of two or more family members, first to the second degree, with interstitial lung disease (ILD) of any etiology.<sup>(1,2)</sup> The most frequent phenotype of FPF is idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); however, others diseases can be familial, such as fibrotic hypersensitivity pneumonitis (FHP), connective tissue disease-associated ILD (CTD-ILD), and unclassifiable ILD (UILD).<sup>(2-4)</sup> The etiology may be discordant between family members.<sup>(3)</sup>

FPF has an earlier age onset than sporadic forms of ILD, equal gender distribution, and a pattern of progressive disease.<sup>(5,6)</sup> However, few studies compare survival in different phenotypes of FPF.<sup>(3,4)</sup>

The present study aimed to compare the survival of the phenotypes of familial-idiopathic pulmonary fibrosis (F-IPF) and familial-fibrotic hypersensitivity pneumonitis (F-FHP) and their sporadic forms.

## METHODS

This is a retrospective study involving three Brazilian outpatient clinics for the care of ILD patients. Adult patients with diagnosis of F-IPF and F-FHP were consecutively enrolled and compared to their sporadic forms. Patients with other ILD were excluded. Participants were followed from January 1<sup>st</sup> 2007 to death or May 31<sup>st</sup> 2022. FPF was defined according to current criteria.<sup>(1,2)</sup>

All cases were submitted to a multidisciplinary discussion. HRCT findings were classified according to current guidelines.<sup>(7)</sup> Functional pulmonary data included spirometry and lung diffusion capacity for carbon monoxide (DLCO).

IPF diagnosis was defined according to ATS/ERS/JPS/ALAT 2018 guidelines.<sup>(7)</sup> FHP diagnosis was established when patients had an identified exposure and typical pattern on HRCT, the presence of lymphocytosis in the bronchoalveolar lavage, or when histopathology showed findings of FHP.<sup>(8)</sup>

Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies and the chi-square test was used to compare frequencies between groups. Continuous

variables were reported as means with standard deviation and compared using a t-student test or ANOVA. Variables related to survival were estimated using univariate and multivariate Cox regression. The variables that showed a statistical difference ( $p < 0.05$ ) between the familial and non-familial groups were controlled before estimating the survival curves. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier and compared using Log-Rank. The significance level adopted was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The median follow-up time was 37 (3-1200) months. 198 participants were included, 88 with IPF and 110 with FHP. Table 1 shows the participants characteristics.

Patients with IPF were more frequently male, older, smokers or former smokers, had *Velcro* crackles on lung auscultation, an UIP pattern on HRCT, and were more frequently treated with antifibrotics ( $p < 0.05$ ). Among the 88 IPF participants, 35% were treated with antifibrotic drugs, and 13% from the FHP group were treated with nintedanib ( $p < 0.001$ ; data not shown). FVC was greater in the IPF group ( $p = 0.02$ ), especially in the F-IPF. Gas exchange (expressed by SpO<sub>2</sub> in rest and DLCO%) did not differ between the groups.

By univariate Cox proportional hazards analysis for mortality, age [(hazard ratio (HR), 1.03; 95% CI 1.01 to 1.06;  $p = 0.01$ )], FVC% (HR, 0.96; 95% CI 0.94 to 0.98;  $p < 0.01$ ), SpO<sub>2</sub>% (HR, 0.86; 95% CI 0.76 to 0.97;  $p < 0.02$ ) and family history of pulmonary fibrosis (HR, 1.79; 95% CI 1.09 to 2.93;  $p = 0.02$ ) were associated to mortality. After adjusting for these four covariates, patients with F-IPF and F-FHP had similar survival curves but worse than the ones of the counterpart sporadic forms (Figure 1). The median survival for the FPF group was 46 months compared to 75 months of the non-familial presentation group ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSION

The present study shows that patients with familial presentations of IPF and FHP have similar and lower survival than patients with sporadic forms (46 *versus* 75 months).

FPF can present different phenotypes, even within the same family.<sup>(3, 4)</sup> The frequency of FHP in Brazil is high (19%) and there are gaps regarding survival in F-FHP.<sup>(9)</sup> Cutting et al., evaluating 1262 patients with ILD with different phenotypes, showed a lower survival rate in those with FPF, regardless of the underlying etiology.<sup>(3)</sup> Participants with F-IPF showed an 80% increased risk of death or lung transplantation compared to those with sporadic IPF (HR, 1.8; 95% CI 1.37 to 2.37;  $p < 0.001$ ), while those with familial non-IPF ILD showed a two-fold increased risk compared with non-IPF ILD without a family history (HR, 2.08; 95% CI 1.46 to 2.96;  $p < 0.001$ ).<sup>(3)</sup> In a smaller cohort, Newton et al. found no difference in patient survival when categorized by diagnosis: the sample's median survival rate was 2.75 years (95% CI 1.64–4.61) for IPF and for 3.11 years (95% CI 2.56 to 4.82) for non-IPF ILD.<sup>(4)</sup> In their sample, among the 77 evaluated, 12% were diagnosed with FHP.<sup>(4)</sup> Unlike our findings, the two other studies included several etiologies in the analysis of non-IPF ILD which may have influenced the final results. We evaluated only IPF and FHP due to the high prevalence of FHP in Brazil and to avoid bias related to other diagnoses that could be influenced by immunosuppression treatment.

The median survival described in FPF varies between 2.9 and 4.2 years.<sup>(1,3,4,10)</sup> However, the studies used different methodologies, which makes comparisons difficult. In our results, the median survival was less than 4 years in familial diseases and there was no difference between F-FHP and F-IPF, suggesting that an interaction between genetics and environmental exposure may confer greater severity and shorter survival in F-FHP as well.

This study has limitations. It is a retrospective observational study. However, a significant number of patients were followed-up for a long period, justifying the robustness of the findings. Not all patients were using antifibrotics. This group of medication was only approved in 2014 in Brazil and access is still difficult due to the lack of public protocols and the high cost of the medication. And, finally, we do not have routine genetic tests for familial ILD.

In conclusion, patients with IPF and FHP in familial presentations have significantly lower survival in comparison to patients with the same diseases, but with non-familial presentations. In clinical practice in several countries, genetic tests are not widely available, so family history should always be investigated.

## REFERENCES

- 1 - Borie R, Kannengiesser C, Antoniou K, et al. European Respiratory Society statement on familial pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2023; 61: 2201383.
- 2 - Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, et al. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(9): 1146-52.
- 3 - Cutting C, Bowman WS, Dao N, Pugashetti JV, Garcia CK, Oldham JM, et al. Family History of Pulmonary Fibrosis Predicts Worse Survival in Patients with Interstitial Lung Disease. *Chest*. 2021; 159(5):1913-1921.
- 4 - Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS, Aravena C, et al. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *Eur Respir J*. 2016; 48(6): 1710-20.
- 5 - Bennett D, Mazzei MA, Squitieri NC, Bargagli E, Refini RM, Fossi A, et al. Familial pulmonary fibrosis: Clinical and radiological characteristics and progression analysis in different high resolution-CT patterns. *Respir Med*. 2017; 126: 75-83.
- 6 - Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2011; 364(16): 1503-12.
- 7 - Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183(6): 788-824.
- 8 - Raghu G, Remy-Jardin M, Ryerson CJ, Myers JL, Kreuter M, Vasakova M, et al. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 202(3): e36-e69.
- 9 - Soares M, Pereira C, Botelho A, Gimenez A, Beraldo B, Ferraz C et al. Multicenter Registry of Interstitial Lung Diseases in Adults in Brazil [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 201: A3352.

10 - Borie R, Tabeze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, et al. Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2016; 48(6): 1721-31.

**Table 1: Sample clinical, functional and tomography findings.**

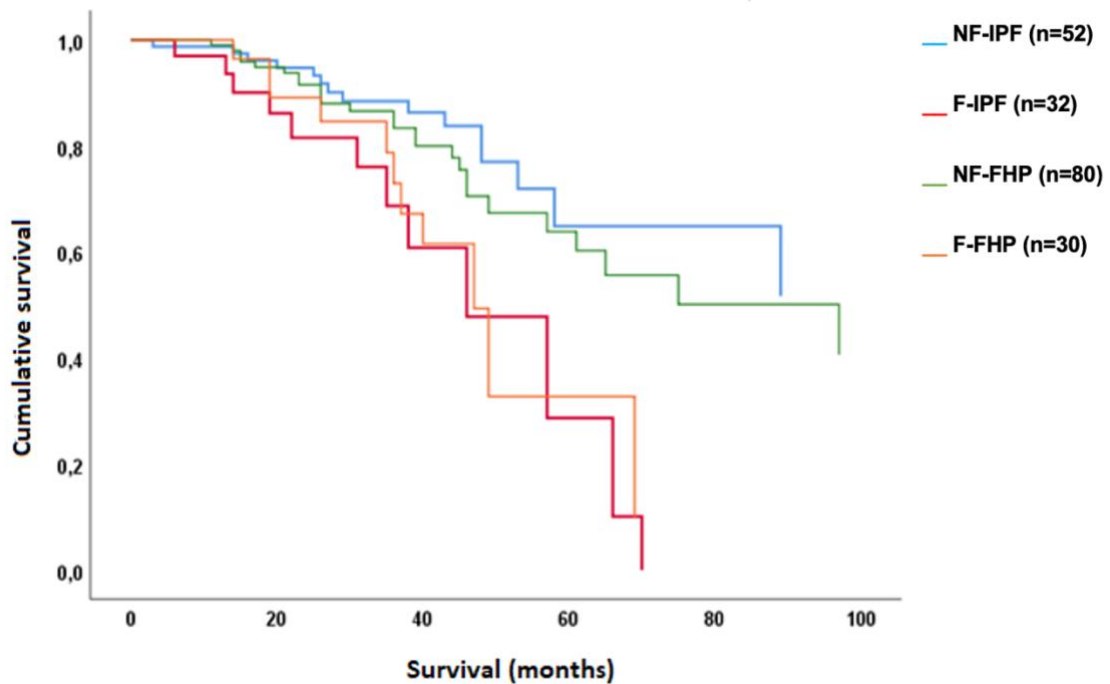
Final Diagnosis				
Variables	IPF (n=88)		FHP (n=110)	
Family history	NF-IPF n=52	F-IPF n=36	NF-FHP n=80	F-FHP n=30
Age, years ( $\pm$ SD) #	70 $\pm$ 8	70 $\pm$ 8	63 $\pm$ 12	64 $\pm$ 9
Female, n (%) #	12 (23.0%)	11 (31.0%)	39 (49.0%)	16 (53.0%)
Smokers/former smokers, n (%) #	34 (65.0%)	24 (67.0%)	45 (56.0%)	17 (57.0%)
Dyspnea (mMRC), n (%) #				
O mMRC	4 (7.7%)	11 (30.5%)	6 (7.6%)	4 (13.4%)
I mMRC	27 (51.9%)	19 (52.7%)	28 (35.0%)	15 (50.0%)
II mMRC	15 (28.9%)	6 (16.8%)	37 (46.2%)	9 (30.0%)
III mMRC	6 (11.5%)	0 (0%)	8 (10.0%)	1 (3.3%)
IV mMRC	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.2%)	1 (3.3%)
Velcro crackles#	45 (87.0%)	26 (72.0%)	51 (64.0%)	20 (67.0%)
FVC% (x $\pm$ SD), n=196#	75 $\pm$ 15	82 $\pm$ 19	70 $\pm$ 15	72 $\pm$ 16
DLCO% (x $\pm$ SD), n=103	58 $\pm$ 15	61 $\pm$ 19	55 $\pm$ 17	61 $\pm$ 16
SpO <sub>2</sub> (x $\pm$ SD), n=194	94.7 $\pm$ 1,8	94.7 $\pm$ 2,2	94.8 $\pm$ 2,1	95.0 $\pm$ 1.8

HRCT pattern, n (%)#				
UIP	38	16	10	7
	(73.0%)	(44.4%)	(12.5%)	(23.3%)
Probable UIP	11	19	30	9
	(21.2%)	(52.7%)	(37.5%)	(30.0%)
Alternative diagnosis	3	1	40	14
	(5.8%)	(2.9%)	(50.0%)	(46.7%)
Antifibrotics treatment#	8	23	7	7
	(15.0%)*	(64.0%)	(9.0%)*	(23.0%)

#:  $p < 0.05$  between the four groups (t- student test or ANOVA).

\*:  $p < 0.05$  between the groups with and without family history

F-IPF: familial idiopathic pulmonary fibrosis; NF-IPF: non familial idiopathic pulmonary fibrosis; F-FHP: familial fibrotic hypersensitivity pneumonitis; NF-FHP: non familial fibrotic hypersensitivity pneumonitis; SD: standard deviation; mMRC: modified medical research council dyspnea scale; FVC%: forced vital capacity percent predicted; DLCO%: lung diffusion capacity for carbon monoxide percent predicted; SpO<sub>2</sub>: peripheral oxygen saturation; HRCT: high resolution computed tomography; UIP: usual interstitial pneumonia.



**Figure 1: Survival in the idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and fibrotic hypersensitivity pneumonitis (FHP) groups, separated by diagnosis and family history, considering covariates with significant differences between groups. Kaplan–Meier analysis, Log-rank test  $p < 0.05$ .**

NF-IPF: non-familial idiopathic pulmonary fibrosis; F-IPF= familial idiopathic pulmonary fibrosis; NF-FHP: non-familial fibrotic hypersensitivity pneumonitis; F-FHP: familial fibrotic hypersensitivity pneumonitis.



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As doenças pulmonares intersticiais trazem grande impacto na qualidade de vida dos pacientes acometidos, e a despeito dos tratamentos disponíveis, ainda apresentam sobrevida reduzida quando comparada à outras doenças crônicas. A identificação de formas familiares aumentou ao longo dos anos, principalmente após as décadas de 90 - 00, com a expansão de tomografias com cortes de alta resolução e ferramentas de sequenciamento genético e genotipagem.

Nossos achados trazem novas informações sobre genética e interação gene-gene e o impacto de variantes, raras e comuns, na evolução da FPF. A presença da associação de variantes raras dos genes associados a biologia dos telômeros, comprimento telomérico e polimorfismo *MUC5Brs35705950* cooperam entre si para o desenvolvimento de fibrose pulmonar. Além disso, a presença de variantes raras também contribuiu para pior evolução da FPF. Esses resultados indicam que essas variantes e a medida de comprimento dos telômeros podem se comportar como marcadores de prognóstico e ferramentas de rastreio em familiares de pessoas com DPI, principalmente no grupo de pacientes com diagnóstico prévio de alguma telomeropatia.

Os achados desse estudo confirmam ainda o prognóstico reservado da fibrose pulmonar familiar e sua sobrevida limitada. Os resultados apresentados reiteram a importância da investigação rotineira de história familiar na avaliação de pessoas com DPI, já que mostram que FPF nas etiologias de FPI e PHf tem sobrevida 2,5 anos inferior que pacientes com o mesmo diagnóstico, porém em apresentações esporádicas.

Portanto, esse trabalho adiciona à literatura médica dados que confirmam a forma progressiva de comportamento da FPF e reforçam a urgência em se encontrar um marcador, seja este clínico ou genético, que permita identificar mais precocemente familiares que potencialmente podem evoluir com doença intersticial. É fundamental que esse grupo seja individualizado na condução de estudos randomizados futuramente para que seja avaliado início de tratamento precoce, como o uso de drogas antifibróticas já precocemente e não apenas quando se confirmar o comportamento de fibrose pulmonar progressiva

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Cutting C, Bowman WS, Dao N, Pugashetti JV, Garcia CK, Oldham JM, et al. Family History of Pulmonary Fibrosis Predicts Worse Survival in Patients with Interstitial Lung Disease. *Chest*. 2021; 159(5): 1913-1921.
- 2 - Kolb M and Vasakova M. The natural history of progressive fibrosing interstitial lung diseases. *Respir Res*. 2019; 20(1): 57.
- 3 - Baldi BG, Pereira CA, Rubin AS, Santana ANC, Costa AN and Carvalho CRR. Diretrizes de Doenças Pulmonares Intersticiais da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2012; 38(supl. 2): S1-S133.
- 4 - Raghu G, Remy-Jardin M, Richeldi L, Thomson CC, Inoue Y, Johkoh T, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (an Update) and Progressive Pulmonary Fibrosis in Adults: An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2022; 205(9): e18-e47.
- 5 - Peabody JW, Peabody JW, Jr., Hayes EW and Hayes EW, Jr. Idiopathic pulmonary fibrosis; its occurrence in identical twin sisters. *Dis Chest*. 1950; 18(4): 330-44.
- 6 - Bonanni PP, Frymoyer JW and Jacox RF. A Family Study of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. A Possible Dysproteinemic and Genetically Determined Disease. *Am J Med*. 1965; 39:411-21.
- 7 - Steele MP, Speer MC, Loyd JE, Brown KK, Herron A, Slifer SH, et al. Clinical and pathologic features of familial interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 172(9): 1146-52.
- 8 - Bennett D, Mazzei MA, Squitieri NC, Bargagli E, Refini RM, Fossi A, et al. Familial pulmonary fibrosis: Clinical and radiological characteristics and progression analysis in different high resolution-CT patterns. *Respir Med*. 2017; 126:75-83.

9 - Newton CA, Batra K, Torrealba J, Kozlitina J, Glazer CS, Aravena C, et al. Telomere-related lung fibrosis is diagnostically heterogeneous but uniformly progressive. *Eur Respir J.* 2016; 48(6): 1710-20.

10 - Kropski JA, Blackwell TS and Loyd JE. The genetic basis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2015; 45(6): 1717-27.

11 - Garcia-Sancho C, Buendia-Roldan I, Fernandez-Plata MR, Navarro C, Perez-Padilla R, Vargas MH, et al. Familial pulmonary fibrosis is the strongest risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2011; 105(12): 1902-7.

12 - Kropski JA. Familial Interstitial Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med.* 2020; 41(2): 229-37.

13 - Borie R, Kannengiesser C, Antoniou K, Bonella F, Crestani B, Fabre A, et al. European Respiratory Society Statement on Familial Pulmonary Fibrosis. *Eur Respir J.* 2023;61: 2201383.

14 - Wijsenbeek M and Cottin V. Spectrum of Fibrotic Lung Diseases. *N Engl J Med.* 2020; 383(10): 958-68.

15 - Cottin V, Wollin L, Fischer A, Quaresma M, Stowasser S and Harari S. Fibrosing interstitial lung diseases: knowns and unknowns. *Eur Respir Rev.* 2019; 28: 180100.

16 - Muller NL, Miller RR, Webb WR, Evans KG and Ostrow DN. Fibrosing alveolitis: CT-pathologic correlation. *Radiology.* 1986; 160(3): 585-8.

17 - Meziane MA, Hruban RH, Zerhouni EA, Wheeler PS, Khouri NF, Fishman EK, et al. High resolution CT of the lung parenchyma with pathologic correlation. *Radiographics.* 1988; 8(1): 27-54.

18 - Liebow, A. and Carrington, C.B. (1969) The Interstitial Pneumonias. In: Simon, M., Potchen, E.J. and LeMay, M., Eds., *Frontiers of Pulmonary Radiology*, Grune & Stratton, New York, 102-141.

19 - Katzenstein AL and Fiorelli RF. Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis. Histologic features and clinical significance. *Am J Surg Pathol.* 1994; 18(2): 136-47.

20 - Muller NL and Coiby TV. Idiopathic interstitial pneumonias: high-resolution CT and histologic findings. *Radiographics.* 1997; 17(4): 1016-22.

21 - Katzenstein AL and Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157(4): 1301-15.

22 - American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(2): 277-304.

23 - Travis WD, Costabel U, Hansell DM, King TE, Lynch DA, Nicholson AG, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: Update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 188(6): 733-48.

24 - Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183(6): 788-824.

25 - Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, et al. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018; 198(5): e44-e68.

26 - Gagliardi M, Berg DV, Heylen CE, Koenig S, Hoton D, Tamirou F, et al. Real-life prevalence of progressive fibrosing interstitial lung diseases. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 23988.

27 - Thomeer MJ, Costabe U, Rizzato G, Poletti V and Demedts M. Comparison of registries of interstitial lung diseases in three European countries. *Eur Respir J Suppl.* 2001; 32:114-18.

28 - Singh S, Collins BF, Sharma BB, Joshi JM, Talwar D, Katiyar S, et al. Interstitial Lung Disease in India. Results of a Prospective Registry. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; 195(6): 801-13.

29 - Soares M, Pereira C, Botelho A, Gimenez A, Beraldo B, Ferraz C et al. Multicenter Registry of Interstitial Lung Diseases in Adults in Brazil [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 201: A3352.

30 - Fischer A and Du Bois R. Interstitial lung disease in connective tissue disorders. *Lancet.* 2012; 380(9842): 689-98.

31 - Spagnolo P, Grunewald J and Du Bois RM. Genetic determinants of pulmonary fibrosis: evolving concepts. *Lancet Respir Med.* 2014; 2(5): 416-28.

32 - Mathai SC and Danoff SK. Management of interstitial lung disease associated with connective tissue disease. *BMJ.* 2016; 352:6819.

33 - Maher TM and Wuyts W. Management of Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *Adv Ther.* 2019; 36(7): 1518-31.

34 - Raghu G, Remy-Jardin M, Ryerson CJ, Myers JL, Kreuter M, Vasakova M, et al. Diagnosis of Hypersensitivity Pneumonitis in Adults. An Official ATS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 202(3): 36-69.

35 - Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, Cormier YF, Fan LL, Franks TJ, et al. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171(7): 792-8.

- 36 - Fernandez Perez ER, Travis WD, Lynch DA, Brown KK, Johannson KA, Selman M, et al. Diagnosis and Evaluation of Hypersensitivity Pneumonitis: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest*. 2021; 160(2): e97-e156.
- 37 - Gimenez A, Storrer K, Kuranishi L, Soares MR, Ferreira RG and Pereira CaC. Change in FVC and survival in chronic fibrotic hypersensitivity pneumonitis. *Thorax*. 2018; 73(4): 391-92.
- 38 - Hamblin M, Prosch H and Vasakova M. Diagnosis, course and management of hypersensitivity pneumonitis. *Eur Respir Rev*. 2022; 31(163): 210164.
- 39 - Morisset J, Johannson KA, Vittinghoff E, Aravena C, Elicker BM, Jones KD, et al. Use of Mycophenolate Mofetil or Azathioprine for the Management of Chronic Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*. 2017; 151(3): 619-25.
- 40 - Fiddler CA, Simler N, Thillai M and Parfrey H. Use of mycophenolate mofetil and azathioprine for the treatment of chronic hypersensitivity pneumonitis-A single-centre experience. *Clin Respir J*. 2019; 13(12): 791-94.
- 41 - Terras Alexandre A, Martins N, Raimundo S, Melo N, Catetano Mota P, Novais EBH, et al. Impact of Azathioprine use in chronic hypersensitivity pneumonitis patients. *Pulm Pharmacol Ther*. 2020; 60:101878.
- 42 - Flaherty KR, Wells AU, Cottin V, Devaraj A, Walsh SLF, Inoue Y, et al. Nintedanib in Progressive Fibrosing Interstitial Lung Diseases. *N Engl J Med*. 2019; 381(18): 1718-27.
- 43 - Lederer DJ and Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*. 2018; 379(8): 797-98.
- 44 - Tibana RCC, Soares MR, Storrer KM, De Souza Portes Meirelles G, Hidemi Nishiyama K, Missrie I, et al. Clinical diagnosis of patients subjected to surgical lung biopsy with a probable usual interstitial pneumonia pattern on high-resolution computed tomography. *BMC Pulm Med*. 2020; 20(1): 299.

45 - Marinescu DC, Hague CJ, Muller NL, Murphy D, Churg A, Wright JL, et al. Integration and Application of Radiologic Patterns From Clinical Practice Guidelines on Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Fibrotic Hypersensitivity Pneumonitis. *Chest*. 2023; S0012-3692(23)01106-6.

46 - Richeldi L, Du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014; 370(22): 2071-82.

47 - King TE, Jr., Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glaspole I, Glassberg MK, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2014; 370(22): 2083-92.

48 - Noble PW, Albera C, Bradford WZ, Costabel U, Glassberg MK, Kardatzke D, et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet*. 2011; 377(9779): 1760-9.

49 - Petnak T, Lertjitbanjong P, Thongprayoon C and Moua T. Impact of Antifibrotic Therapy on Mortality and Acute Exacerbation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest*. 2021; 160(5): 1751-63.

50 - Mooney J, Reddy SR, Chang E, Broder MS, Gokhale S and Corral M. Antifibrotic therapies reduce mortality and hospitalization among Medicare beneficiaries with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Manag Care Spec Pharm*. 2021; 27(12): 1724-33.

51 - Wu W, Qiu L, Wu J, Liu X and Zhang G. Efficacy and safety of pirfenidone in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis patients: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2021; 11(12): e050004.

52 - Crestani B, Huggins JT, Kaye M, Costabel U, Glaspole I, Ogura T, et al. Long-term safety and tolerability of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: results from the open-label extension study, INPULSIS-ON. *Lancet Respir Med*. 2019; 7(1): 60-68.

53 - Costabel U, Albera C, Lancaster LH, Lin CY, Hormel P, Hulter HN, et al. An Open-Label Study of the Long-Term Safety of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis (RECAP). *Respiration*. 2017; 94(5): 408-15.

54 - Olson AL, Gifford AH, Inase N, Fernandez Perez ER and Suda T. The epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis and interstitial lung diseases at risk of a progressive-fibrosing phenotype. *Eur Respir Rev*. 2018; 27(150): 180077.

55 - Krauss E, Gehrken G, Drakopanagiotakis F, Tello S, Dartsch RC, Maurer O, et al. Clinical characteristics of patients with familial idiopathic pulmonary fibrosis (f-IPF). *BMC Pulm Med*. 2019; 19(1): 130.

56 - Van Der Vis JJ, Snetselaar R, Kazemier KM, Ten Klooster L, Grutters JC and Van Moorsel CH. Effect of Muc5b promoter polymorphism on disease predisposition and survival in idiopathic interstitial pneumonias. *Respirology*. 2016; 21(4): 712-7.

57 - Lee HL, Ryu JH, Wittmer MH, Hartman TE, Lymp JF, Tazelaar HD, et al. Familial idiopathic pulmonary fibrosis: clinical features and outcome. *Chest*. 2005; 127(6): 2034-41.

58 - Panagopoulos P, Goules A, Hoffmann-Vold AM, Matteson EL and Tzioufas A. Natural history and screening of interstitial lung disease in systemic autoimmune rheumatic disorders. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2021; 13: 1759720X211037519.

59 - Salisbury ML, Hewlett JC, Ding G, Markin CR, Douglas K, Mason W, et al. Development and Progression of Radiologic Abnormalities in Individuals at Risk for Familial Interstitial Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020; 201(10): 1230-39.

60 - Borie R, Kannengiesser C, Sicre De Fontbrune F, Gouya L, Nathan N and Crestani B. Management of suspected monogenic lung fibrosis in a specialised centre. *Eur Respir Rev*. 2017; 26(144): 160122.



61 - Alonso-Gonzalez A, Tosco-Herrera E, Molina-Molina M and Flores C. Idiopathic pulmonary fibrosis and the role of genetics in the era of precision medicine. *Front Med (Lausanne)*. 2023; 10:1152211.

62 - Juge PA, Lee JS, Ebstein E, Furukawa H, Dobrinskikh E, Gazal S, et al. MUC5B Promoter Variant and Rheumatoid Arthritis with Interstitial Lung Disease. *N Engl J Med*. 2018; 379(23): 2209-19.

63 - Ley B, Newton CA, Arnould I, Elicker BM, Henry TS, Vittinghoff E, et al. The MUC5B promoter polymorphism and telomere length in patients with chronic hypersensitivity pneumonitis: an observational cohort-control study. *Lancet Respir Med*. 2017; 5(8): 639-47.

64 - Borie R, Tabeze L, Thabut G, Nunes H, Cottin V, Marchand-Adam S, et al. Prevalence and characteristics of TERT and TERC mutations in suspected genetic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2016; 48(6): 1721-31.

65 - Platenburg M, Wiertz IA, Van Der Vis JJ, Crestani B, Borie R, Dieude P, et al. The MUC5B promoter risk allele for idiopathic pulmonary fibrosis predisposes to asbestosis. *Eur Respir J*. 2020; 55(4): 1902361.

66 - Hunninghake GM, Hatabu H, Okajima Y, Gao W, Dupuis J, Latourelle JC, et al. MUC5B promoter polymorphism and interstitial lung abnormalities. *N Engl J Med*. 2013; 368(23): 2192-200.

67 - Kim SY, Diggans J, Pankratz D, Huang J, Pagan M, Sindy N, et al. Classification of usual interstitial pneumonia in patients with interstitial lung disease: assessment of a machine learning approach using high-dimensional transcriptional data. *Lancet Respir Med*. 2015; 3(6): 473-82.

68 - Pankratz DG, Choi Y, Imtiaz U, Fedorowicz GM, Anderson JD, Colby TV, et al. Usual Interstitial Pneumonia Can Be Detected in Transbronchial Biopsies Using Machine Learning. *Ann Am Thorac Soc*. 2017; 14(11): 1646-54.

69 - Choi Y, Liu TT, Pankratz DG, Colby TV, Barth NM, Lynch DA, et al. Identification of usual interstitial pneumonia pattern using RNA-Seq and machine learning: challenges and solutions. *BMC Genomics*. 2018; 19(Suppl 2): 101.

70 - Lasky JA, Case A, Unterman A, Kreuter M, Scholand MB, Chaudhary S, et al. The Impact of the Envisia Genomic Classifier in the Diagnosis and Management of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2022; 19(6): 916-24.

71 - Chaudhary S, Weigt SS, Ribeiro Neto ML, Benn BS, Pugashetti JV, Keith R, et al. Interstitial lung disease progression after genomic usual interstitial pneumonia testing. *Eur Respir J*. 2023; 61(4): 2201245.

72 - Hughes EW. Familial Interstitial Pulmonary Fibrosis. *Thorax*. 1964; 19(6): 515-25.

73 - Swaye P, Van Ordstrand HS, McCormack LJ and Wolpaw SE. Familial Hamman-Rich syndrome. Report of eight cases. *Dis Chest*. 1969; 55(1): 7-12.

74 - Solliday NH, Williams JA, Gaensler EA, Coutu RE and Carrington CB. Familial chronic interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1973; 108(2): 193-204.

75 - Beaumont F, Jansen HM, Elema JD, Ten Kate LP and Sluiter HJ. Simultaneous occurrence of pulmonary interstitial fibrosis and alveolar cell carcinoma in one family. *Thorax*. 1981; 36(4): 252-8.

76 - Leslie KO, Cool CD, Sporn TA, Curran-Everett D, Steele MP, Brown KK, et al. Familial idiopathic interstitial pneumonia: histopathology and survival in 30 patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136(11): 1366-76.

77 - Hodgson U, Laitinen T and Tukiainen P. Nationwide prevalence of sporadic and familial idiopathic pulmonary fibrosis: evidence of founder effect among multiplex families in Finland. *Thorax*. 2002; 57(4): 338-42.

78 - Marshall RP, Puddicombe A, Cookson WO and Laurent GJ. Adult familial cryptogenic fibrosing alveolitis in the United Kingdom. *Thorax*. 2000; 55(2): 143-6.

79 - Fernandez BA, Fox G, Bhatia R, Sala E, Noble B, Denic N, et al. A Newfoundland cohort of familial and sporadic idiopathic pulmonary fibrosis patients: clinical and genetic features. *Respir Res.* 2012; 13(1): 64.

80 - Lawson WE and Loyd JE. The genetic approach in pulmonary fibrosis: can it provide clues to this complex disease? *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3(4): 345-9.

81 - Caro F, Buendia-Roldan I, Noriega-Aguirre L, Alberti ML, Amaral A, Arbo G, et al. Latin American Registry of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (REFIPI): Clinical Characteristics, Evolution and Treatment. *Arch Bronconeumol.* 2022; 58(12): 794-801.

82 - Kropski JA, Young LR, Cogan JD, Mitchell DB, Lancaster LH, Worrell JA, et al. Genetic Evaluation and Testing of Patients and Families with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017; 195(11): 1423-28.

83 - Hunninghake GM, Quesada-Arias LD, Carmichael NE, Martinez Manzano JM, Poli De Frias S, Baumgartner MA, et al. Interstitial Lung Disease in Relatives of Patients with Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 201(10): 1240-48.

84 - Noth I, Zhang Y, Ma SF, Flores C, Barber M, Huang Y, et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study. *Lancet Respir Med.* 2013; 1(4): 309-17.

85 - Seibold MA, Wise AL, Speer MC, Steele MP, Brown KK, Loyd JE, et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med.* 2011; 364(16): 1503-12.

86 - Borie R, Kannengiesser C, Nathan N, Tabeze L, Pradere P and Crestani B. Familial pulmonary fibrosis. *Rev Mal Respir.* 2015; 32(4): 413-34.

87 - Newton CA, Oldham JM, Applegate C, Carmichael N, Powell K, Dilling D, et al. The Role of Genetic Testing in Pulmonary Fibrosis: A Perspective From the Pulmonary Fibrosis Foundation Genetic Testing Work Group. *Chest.* 2022; 162(2): 394-405.

88 - Calado RT and Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med*. 2009; 361(24): 2353-65.

89 - Whitsett JA, Wert SE and Weaver TE. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease. *Annu Rev Med*. 2010; 61:105-19.

90 - Coghlan MA, Shifren A, Huang HJ, Russell TD, Mitra RD, Zhang Q, et al. Sequencing of idiopathic pulmonary fibrosis-related genes reveals independent single gene associations. *BMJ Open Respir Res*. 2014; 1(1): e000057.

91 - Dressen A, Abbas AR, Cabanski C, Reeder J, Ramalingam TR, Neighbors M, et al. Analysis of protein-altering variants in telomerase genes and their association with MUC5B common variant status in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a candidate gene sequencing study. *Lancet Respir Med*. 2018; 6(8): 603-14.

92 - Van Moorsel CH, Van Oosterhout MF, Barlo NP, De Jong PA, Van Der Vis JJ, Ruven HJ, et al. Surfactant protein C mutations are the basis of a significant portion of adult familial pulmonary fibrosis in a dutch cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(11): 1419-25.

93 - Mahler DA and Wells CK. Evaluation of clinical methods for rating dyspnea. *Chest*. 1988; 93(3): 580-6.

94 - Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, Burgos F, Casaburi R, Coates A, et al. Standardisation of spirometry. *Eur Respir J*. 2005; 26(2): 319-38.

95 - Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, Barjaktarevic IZ, Cooper BG, Hall GL, et al. Standardization of Spirometry 2019 Update. An Official American Thoracic Society and European Respiratory Society Technical Statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200(8): e70-e88.

96 - Stanojevic S, Kaminsky DA, Miller MR, Thompson B, Aliverti A, Barjaktarevic I, et al. ERS/ATS technical standard on interpretive strategies for routine lung function tests. *Eur Respir J*. 2022; 60(1): 2101499.

97 - Pereira CA, Sato T and Rodrigues SC. New reference values for forced spirometry in white adults in Brazil. *J Bras Pneumol*. 2007; 33(4): 397-406.

98 - Duarte AA, Pereira CA and Rodrigues SC. Validation of new brazilian predicted values for forced spirometry in caucasians and comparison with predicted values obtained using other reference equations. *J Bras Pneumol*. 2007; 33(5): 527-35.

99 - Graham BL, Brusasco V, Burgos F, Cooper BG, Jensen R, Kendrick A, et al. 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J*. 2017; 49(1): 1600016.

100 - Guimaraes VP, Miranda DM, Reis MaS, Andrade TL, Matos RL, Soares MR, et al. Reference values for the carbon monoxide diffusion (transfer factor) in a brazilian sample of white race. *J Bras Pneumol*. 2019; 45(5): e20180262.

101 - Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12): 5463-7.

102 - Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5): 405-24.

103 - Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020; 581(7809): 434-43.

104 - Gutierrez-Rodrigues F, Santana-Lemos BA, Scheucher PS, Alves-Paiva RM and Calado RT. Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PLoS One*. 2014; 9(11): e113747.

105 - Alter BP, Baerlocher GM, Savage SA, Chanock SJ, Weksler BB, Willner JP, et al. Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. *Blood*. 2007; 110(5): 1439-47.

106 - Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2005; 352(14): 1413-24.

107 - Yang H and Wang K. Genomic variant annotation and prioritization with ANNOVAR and wANNOVAR. *Nat Protoc*. 2015; 10(10): 1556-66.

108 - Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016; 536(7616): 285-91.

109 - Breiman L, Friedman J, Stone CJ, Olshen R. *Classification and Regression Trees*. CRC Press; 1984.

## 10. APÊNDICES

### APÊNDICE 01 QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO AMBIENTAL

1. Mora em fazenda e tem silos? Sim\_\_ Não\_\_
2. Pássaros em casa? Sim\_\_ Não\_\_  
a) Pombo; b) Periquito; c) Papagaio; d) Canários; e) Calopsita.
3. Coelhos? Sim\_\_ Não\_\_
4. Aparelhos de ar condicionado em casa ou no trabalho? Sim\_\_ Não\_\_
5. Umidificador ou vaporizador em casa ou no trabalho? Sim\_\_ Não\_\_
6. Acúmulo de fungos ou bolor em casa ou no trabalho (paredes, assoalhos, móveis, colchão)? Sim\_\_ Não\_\_
7. Cheiro de mofo em casa ou no trabalho? Sim\_\_ Não\_\_
8. Vazamentos em casa? Sim\_\_ Não\_\_
9. Frequenta saunas de água quente? Sim\_\_ Não\_\_
10. Piscina em casa? Sim\_\_ Não\_\_
11. Fonte de água interna em casa? Sim\_\_ Não\_\_
12. Travesseiros ou acolchoados ou almofadas de penas? Sim\_\_ Não\_\_
13. Decoração com penas? Sim\_\_ Não\_\_
14. Trabalha/trabalhou com tintas ou vernizes? Sim\_\_ Não\_\_
15. Trabalha/trabalhou com madeiras/serrarias? Sim\_\_ Não\_\_
16. Trabalha/trabalhou com fluidos metálicos? Sim\_\_ Não\_\_
17. Trabalha/trabalhou com sprays de espuma? Sim\_\_ Não\_\_
18. Trabalha/trabalhou com alimentos para peixes ou aves? Sim\_\_ Não\_\_
19. Trabalha/trabalhou com farinha de trigo? Sim\_\_ Não\_\_
20. Tem plantas e manipula terra e adubos? Sim\_\_ Não\_\_
21. Alguma exposição à inseticida ou sulfato de cobre? Sim\_\_ Não\_\_
22. Toca instrumentos de sopros? Sim\_\_ Não\_\_
23. Usou algumas dessas medicações? Sim\_\_ Não\_\_  
a) Amiodarona; b) Nitrofurantoína; c) Bleomicina; d) Metrotrexate; e) Carbamazepina.
24. Já realizou tratamento com radioterapia? Sim\_\_ Não\_\_

## APÊNDICE 02 PARECER CONSUBSTANCIADO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Características clínicas, funcionais, moleculares e sobrevida de pacientes com doenças pulmonares intersticiais (DPIs) do ambulatório de Doenças Pulmonares Intersticiais do HC/UFMG

**Pesquisador:** ELIANE VIANA MANCUZO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 44843215.5.0000.5149

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da UFMG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.563.421

#### Apresentação do Projeto:

Mesma apresentação do parecer 1.114.306 de 18/06/2015

#### Objetivo da Pesquisa:

Mesmo objetivo do parecer 1.114.306 de 18/06/2015

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mesma avaliação do parecer 1.114.306 de 18/06/2015

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora solicita inclusão de nova metodologia ao estudo que é a análise molecular dos pacientes com Fibrose Pulmonar Familiar.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Novo TCLE e novo projeto foram submetidos.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SMJ, sou favorável à aprovação da emenda.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 2.563.421

desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1082677_E1.pdf	26/02/2018 15:55:54		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao_2.pdf	26/02/2018 08:59:32	ELIANE VIANA MANCUZO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Doencas_Pulmonares_Intersticiais_26_02_2019.pdf	26/02/2018 08:59:17	ELIANE VIANA MANCUZO	Aceito
Outros	448432155parecerrelassinado.pdf	08/02/2018 11:10:00	Vivian Resende	Aceito
Outros	448432155relparcialassinado.pdf	08/02/2018 11:09:52	Vivian Resende	Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	03/05/2015 10:58:55		Aceito
Outros	parecer Pneumo.pdf	28/04/2015 19:53:11		Aceito
Outros	parecer Bias.pdf	28/04/2015 19:52:47		Aceito
Outros	Parecer Camara.pdf	28/04/2015 19:52:19		Aceito
Outros	parecer GEP.pdf	28/04/2015 19:50:43		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE projeto DID.doc	28/04/2015 19:49:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de pesquisa - DPI.docx	28/04/2015 19:49:03		Aceito
Outros	448432155emendaassinada.pdf	26/03/2018 10:50:26	Vivian Resende	Aceito
Outros	448432155pareceremassinado.pdf	26/03/2018 10:50:40	Vivian Resende	Aceito

**Situação do Parecer:**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.563.421

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 26 de Março de 2018

---

**Assinado por:**  
**Vivian Resende**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

### **APÊNDICE 03 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Esta pesquisa seguirá os Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução número 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Nome: \_\_\_\_\_

Nós estamos convidando você ou seu responsável legal a participar de um projeto de pesquisa que se chama: Características clínicas, funcionais, moleculares e sobrevida de pacientes com doença pulmonar intersticial

Este Termo de Consentimento pode conter palavras que o(a) senhor(a) não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

1- Pesquisador principal e outros pesquisadores: Profa. Eliane Viana Mancuzo, professora do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Telefone de contato: (31) 9814-7691 e (31) 3409-9542.

Deborah dos Reis Estrella, mestranda do programa de ciências de saúde do adulto. Telefone de contato: (31) 996122960.

Prof. Ricardo de Amorim Correa, professor do Departamento de Clínica Médica da UFMG. Telefone de contato: (31) 999589575

2- Justificativa do projeto: O conhecimento das características clínicas, da função pulmonar e dos fatores associados ao risco de morte dos pacientes poderá servir de base para o melhor entendimento da doença em nosso meio e para o estabelecimento de políticas públicas mais adequadas à realidade desta população.

3- Objetivos da pesquisa: Verificar como os pacientes com Fibrose Pulmonar Familiar evoluem ao longo do tempo após diagnóstico. Descrever as características clínicas, a espirometria, a difusão de monóxido de carbono e o teste de caminhada destes pacientes.

4- Procedimentos da pesquisa: Caso aceite participar da pesquisa, seus dados contidos em prontuários e exames que já foram e são realizados durante seu acompanhamento serão coletados pelo pesquisador.

5- Benefícios: Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir para compreender melhor o impacto da sua doença respiratória na vida de pacientes como você.

6- Riscos e desconfortos: você se submeterá à coleta de 4 mL de sangue periférico para análise molecular em sangue periférico. O único risco é o do desconforto da punção venosa que será manejado individualmente. Entretanto, sabe-se que o risco de sangramento é mínimo e será realizado por uma equipe qualificada. Você será conduzido em seu acompanhamento individualizado no Ambulatório de DPI-HC/UFMG sem nenhuma modificação do seu tratamento. O estudo será realizado por meio de consulta ao seu prontuário. As informações obtidas pelo questionário serão confidenciais, com o propósito apenas para a realização desta pesquisa.

7- Direito de recusa: você tem todo o direito de recusar a participar, em qualquer momento da pesquisa, sem nenhum prejuízo em seu atendimento e tratamento.

8- Garantia de esclarecimento: em qualquer momento da pesquisa, você tem direito de receber todas as informações acerca da pesquisa.

9- Garantia de sigilo: toda a informação pessoal obtida nesta pesquisa é confidencial. Os resultados da pesquisa serão apresentados em congressos e poderão ser publicados em revistas médicas, sem nenhuma forma de identificação individual dos participantes.

10- Ressarcimento e indenização: você não receberá nenhuma compensação financeira para sua inclusão neste estudo, caracterizando o seu envolvimento como participação voluntária.

11- Contato com os pesquisadores:

Profa. Eliane Viana Mancuzo, professora do Departamento de Clínica Médica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Telefone de contato: (31) 9814-7691 e (31) 3409-9542.

Deborah dos Reis Estrella, doutoranda do programa de ciências de saúde do adulto.  
Telefone de contato: (31) 996122960.

Prof. Ricardo de Amorim Correa, professor do Departamento de Clínica Médica da UFMG. Telefone de contato: (31) 999589575.

## 12- Consentimento:

Li ou alguém leu para mim as informações contidas neste documento antes de assinar o termo de consentimento. Declaro que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia deste TCLE. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo em qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar deste estudo.

Belo Horizonte, \_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura do participante ou responsável

---

Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvidas sobre aspectos éticos dessa pesquisa, contatar: Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP- UFMG): Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2o andar - Sala 2005, Campus Pampulha - Belo Horizonte, MG – Brasil, CEP: 31270-901 Tel: 3409-4592 Email: coep@prpq.ufmg.br

## 11. ANEXOS

### ANEXO 01 FORMULÁRIO DO ESTUDO (Fornecido pelo doutor Carlos Alberto de Castro Pereira e adaptado por doutora Eliane Viana Mancuzo)

Nome \_\_\_\_\_ RH \_\_\_\_\_

Telefone (DDD) \_\_\_\_\_ email \_\_\_\_\_

Sexo: Fem  Masc  Idade: \_\_\_\_ anos. Fumante: Não  Atual  Ex

Hospedeiro comprometido Não  Sim  Qual \_\_\_\_\_

Tempo história: \_\_\_\_ meses

Tosse ausente  presente

Dispnéia: ausente ; grandes esforços  moderados esforços  pequenos  repouso  prejudicada  ou MRC \_\_\_\_\_

História familiar de DPI Não  Sim

DTC: Não  Esclero  AR  LES  Dmista  Sjogren  Dermatopolio  PIAAI  SAAS

DRGE não  passado  atual

DRGE exames: não  esofagite  hipotonia distal  pHmetria

Drogas: Não  Amiodarona  Bleomicina  Minociclina  MTX ; Nitrofurantoina

Carbamazepina  Radiação  Outras  \_\_\_\_\_

Exposição PH- Pássaros- pombos, periquitos, papagaios, canários, calopsitas Não  Sim ; mofo  tintas  travesseiro de pena

Exposição ocupacional- Não  silicose  asbestose  poeira mista  beriliose  metais  gases/vapores  produtos químicos

**Exame físico** Normal  Hipocratismo digital  Lesões de pele  \_\_\_\_\_

Raynaud  Mãos de mecânico  Artrite  lesões oculares  Linfonodos  Cardiopatia  Estertores em velcro  Grasnidos

Hepatomegalia  Esplenomegalia  Outros \_\_\_\_\_

Prova funcional: 1: ao diagnóstico

CVF% \_\_\_ VEF<sub>1</sub>% \_\_\_ VEF<sub>1</sub>/CVF \_\_\_ DCO% \_\_\_

SpO<sub>2</sub> rep \_\_\_ SpO<sub>2</sub> Ex \_\_\_

Prova funcional 2: aos 12 meses

Prova funcional 3: aos 24 meses

Autoanticorpos: FAN \_\_\_ FR \_\_\_ Outros \_\_\_\_\_

BTB  ou CRIO  Diagnóstica ; achados histológicos compatíveis ; Anormalidades inespecíficas  Achados normais/negativos

LBA MØ% \_\_\_ N% \_\_\_ Li% \_\_\_ Eo% \_\_\_

Biópsia cirúrgica Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ \_\_\_\_\_

Biópsia de outro local \_\_\_\_\_

Diagnóstico

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Indefinido (0) ; FPI (1) ; Sarcoidose (20) ; PH (3)  BOOP (4) ; PINE (5) ; BRDIP/PID (6) ; PIA (7) ; Pneumoconiose (8) ; LAM (9) ; HX (10) ; Proteinose (11) ; Pneumonia eosinofílica (12) ; Bronquiolite (13) ; Vasculite (14) ;

DTC (15): Esclero ; AR ; LES  Dmista ; Sjogren ; Dermatopolio ; PIAAI ; SAAS . ; FBC=16 ; Carcinomatose=17 ; Drogas=18 ; outros=19 ;

Qual \_\_\_\_\_

Pulmão terminal (20) ; Microaspiração (21) ; FPF (22)

Discussão multidisciplinar Não  Sim

Diagnóstico \_\_\_\_\_

Padrão TCAR ATS:

PIU típica  Provável PIU  Indeterminada para PIU  Diagnósticos alternativos

TCAR DATA:			
Alterações TCAR	SIM	Alterações TCAR	SIM
<b>Distribuição Craniocaudal</b>		<b>Opacidade aumentada</b>	
Predominante LLSS		Possível dependente	
Predominante LLII		Vidro fosco	
Difusa		Sem fibrose	
<b>Distribuição Axial</b>		Com achados de fibrose	
Central /peribroncovascular		Consolidação	
Periférica/subpleural		Ao acaso	
Central e periférica		Peribrônquica	
Predomínio unilateral		Periférica	
<b>Redução de volume LLSS</b>		<b>Hipertransparências</b>	
<b>Redução volume LLII</b>		Faveolamento	
<b>Opacidades reticulares</b>		Cistos	
<b>Reticular não septal (irregular)</b>		Enfisema	
<b>Reticular septal</b>		Bronquioloectasias Bronquiectasias tração	
<b>Linhas subpleurais</b>		Bronquiectasias não de tração	
<b>Bandas parenquimatosas</b>		Perfusão em mosaico	
<b>Nódulos-Tamanho</b>		Alçapamento de ar expiratório	
Pequenos (abaixo de 1 cm)		<b>Pleura</b>	
Grandes (acima de 1 cm)		Espessamento/Placas/Calcificações	
Grandes- conglomerados/massas		Derrame pleural	
Escavados		Pneumotórax	
<b>Distribuição:</b>		<b>Diâmetro artéria pulmonar &gt; aorta</b>	
Miliares		<b>Linfonodos</b>	
Centrolobulares		Hilares	
Peribroncovasculares		Mediastinais	
Subpleurais		Calcificações	



## ANEXO 02 PARECER CONSUBSTANCIADO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (RIBEIRÃO PRETO)

Portal do Governo Brasileiro

plataformabrasil.saude.gov.br

Plataforma Brasil

principal sair

Público Pesquisador Alterar Meus Dados

DEBORAH DOS REIS ESTRELLA - IV3.8.2  
Sua sessão expira em: 38min 12

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

### CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:  Número do Parecer:

*Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.*

#### DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:

Número do CAAE: <input type="text" value="93617018.0.0000.5440"/>	Número do Parecer: <input type="text" value="4940397"/>	
Quem Assinou o Parecer: <input type="text" value="MARCIA GUILMARÃES VILLANOVA"/>	Pesquisador Responsável: <input type="text" value="Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues"/>	
Data Início do Cronograma: <input type="text" value="02/07/2018"/>	Data Fim do Cronograma: <input type="text" value="29/12/2023"/>	Contato Público: <input type="text" value="Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues"/>

Suporte a sistemas: 136 - opção 8

GOVERNO FEDERAL

### **ANEXO 03 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (RIBEIRÃO PRETO)**

Título da pesquisa: Correlação entre genótipo, comprimento telomérico e fenótipo nas telomeropatias

Pesquisadores responsáveis: Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição. Nós estudamos doenças que afetam sangue, pele, pulmão e/ou fígado. Essas doenças podem ser causadas por vários motivos: uso de substâncias tóxicas, medicamentos ou por defeitos no nosso DNA (mutações).

O objetivo da pesquisa é identificar mutações genéticas que causam redução na produção de células do sangue, doenças dos pulmões ou do fígado. Alguns desses defeitos genéticos provocam o encurtamento rápido das pontas do nosso DNA, conhecidas como telômeros. Direta ou indiretamente, o encurtamento dos telômeros leva ao desenvolvimento de problemas no sangue, no pulmão, no fígado e pode aumentar as chances do surgimento de alguns tipos de cânceres. Esse estudo é do tipo caso- controle, ou seja, vamos comparar pacientes afetados com essas doenças (casos) com indivíduos saudáveis (controles).

Caso concorde em participar, o(a) senhor(a) deverá doar amostra de sangue. A coleta será feita por punção de veia do braço. Caso o(a) senhor(a) queira, poderá ser convidado a doar também uma amostra de pele uma única vez, retirada da região interna do braço ou na região posterior do quadril (onde é feita a biópsia de medula óssea) por meio de uma “biópsia por punch”. A biópsia é realizada, com anestesia local, utilizando-se uma pinça parecida com um canudinho que faz uma pequena perfuração na pele do braço, de onde a amostra é coletada.

Os riscos e desconfortos da pesquisa são mínimos e estão relacionados à coleta da amostra de sangue, de pele, ao estoque temporário dessas amostras e de

informações clínicas. Na coleta de sangue, o desconforto que você pode sentir é apenas da picada da agulha e um potencial hematoma (vermelhidão) que possa se formar no local da picada (cerca de 10% dos casos). Na “biópsia por punch”, o procedimento é realizado com anestesia local e é necessário a sutura (dar um ponto). O desconforto que você pode sentir é mínimo e somente em decorrência do furo que se faz, como um beliscão. Infecção no local da coleta (de sangue e de pele) acontece muito raramente, pois o material utilizado em ambos os procedimentos é estéril e o local da picada ou da biópsia é bem higienizado.

Todas as informações obtidas nos testes realizados serão mantidas em sigilo e apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso às suas amostras guardadas no freezer e às informações obtidas. As amostras guardadas no freezer serão numeradas e não conterão nenhuma informação que possa identificar o doador.

Não há nenhum benefício imediato para o(a) senhor(a) por participar do estudo. No entanto, essa pesquisa pode nos ajudar a esclarecer quais trechos do DNA (genes) são importantes para manter a integridade das células do sangue, do pulmão e do fígado, por exemplo. Com isso, podem ser estabelecidos mecanismos que explicam as doenças que acometem esses órgãos, melhorando o diagnóstico e possibilitando novos tratamentos no futuro.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade de deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar o seu tratamento no Hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o senhor(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório Falência Medular e Telomeropatias criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ou na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de soro, de células, de DNA, de RNA e de proteínas extraídos a partir do sangue e da biopsia de pele de pacientes acometidos com falência da medula óssea, telomeropatias ou indivíduos saudáveis. As amostras devem ser armazenadas, pois não é possível realizarmos todas as análises no mesmo momento da extração do material. São necessárias diversas técnicas que demandam tempo, para medirmos o comprimento telomérico, investigarmos as mutações genéticas e o impacto delas nas doenças estudadas. Gostaríamos de convidá-lo(a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano de sangue e biopsia de pele para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante preferencialmente junto com os exames de sangue que serão realizados de rotina ou durante o atendimento ambulatorial. Utilizaremos suas amostras para fazer teste de comprimento telomérico, investigação as mutações genéticas e expressão gênica. Após coletado, o material será guardado em biorrepositório no Laboratório de Hematologia Translacional, bloco G, Hospital das Clínicas na FMRP-USP, Campus Universitário s/n, CEP 14048-900, Ribeirão Preto-SP, telefone (16) 3602-2294. As amostras serão armazenadas num prazo máximo de 10 anos. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a suas amostras de sangue e de pele serão identificada por meio de números e letras.

Quanto ao material, será coletada uma amostra de sangue (20 mililitros, o equivalente a duas colheres de sopa) e/ou uma pequena amostra de pele (com o diâmetro de um canudinho e um profundidade de 1 centímetro). Em decorrência da coleta existe um pequeno risco de infecção no local, por isso são utilizados materiais estéril e descartável. O desconforto da biopsia de pele é amenizado com anestesia local.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) senhor(a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado ao final do estudo.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o senhor(a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

### **Assentimento do menor de idade**

Nós estudamos doenças que geram sérios problemas na produção de sangue, na pele, no funcionamento do pulmão e/ou do fígado. Elas podem ser causadas por vários motivos, como por exemplo, o uso de substâncias tóxicas, medicamentos ou por defeitos no nosso DNA (mutações). Algumas mutações genéticas levam ao encurtamento exagerado das pontas do nosso DNA (os telômeros) trazendo graves consequências para a saúde. Ainda conhecemos pouco sobre essas doenças, o que justifica estudarmos mais e para isso precisamos de sua ajuda. Nesse estudo vamos comparar um grupo de pessoas saudáveis com um grupo de pessoas afetadas com problemas no sangue, na pele, no pulmão e/ou no fígado. Você não terá nenhum benefício direto nessa pesquisa, mas contribuirá para que os cientistas possam futuramente para melhorar o diagnóstico dessas doenças e descobrir novos

tratamentos. Nós apenas precisamos de um pouquinho do seu sangue (duas colheres de sopa) e, caso você permita, coletaremos também um pequeno pedaço da sua pele, do tamanho da ponta de uma caneta. Quase não dói e os riscos são mínimos. O seu material será armazenado sobre sigilo e ao final dessa pesquisa descartaremos tudo. Sua participação não é obrigatória e mesmo que você aceite, poderá desistir a qualquer momento. Você concorda em participar dessa pesquisa? Se a resposta for sim preencha (ou peça ao seu responsável que preencha) os dados abaixo.

Dados do participante:

Nome: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_,

Endereço: \_\_\_\_\_,  
no \_\_\_\_\_,

Bairro \_\_\_\_\_, Cidade \_\_\_\_\_, Telefone  
(\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente:

Dr. Rodrigo do Tocantins Calado - Telefone (16) 3602-2294 ou (16) 3602-1000 bipe 7103 (Hematologia)

Laboratório de Hematologia Translacional, Bloco G, Hospital das Clínicas na FMRP-USP, Campus Universitário s/n, 14048-900, Ribeirão Preto-SP.

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

data: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

data: \_\_\_\_\_

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

data: \_\_\_\_\_