

AVANÇOS DA GENÉTICA NA FIBROSE CÍSTICA

GISELDA M. K. CABELLO

RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva determinada por mutações no gene *CFTR*. Este gene foi identificado em 1989 e passadas pouco mais de duas décadas mais de 1800 mutações já foram caracterizadas. A proteína codificada por este gene foi denominada cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) que devido a sua estrutura composta por domínios transmembranares e domínios de ligação com ATP funciona como um canal responsável pelo transporte de íons Na^+ , K^+ e Cl^- através das membranas epiteliais. A mutação predominante é a DF508, cuja frequência varia em diferentes populações, podendo alcançar valores próximos de 90% entre fibrocísticos do norte Europeu. A grande maioria das mutações se distribui em diferentes regiões geográficas, em geral com frequências muito baixas, sobretudo em países fora do eixo europeu cuja composição étnica não tem predominância caucasóide. A FC se caracteriza por sua grande variabilidade na frequência e gravidade das manifestações clínicas, que afetam milhares de indivíduos no mundo. O extraordinário progresso na compreensão da patogênese

da FC tem contribuído para o desenvolvimento de novos tratamentos e drogas que tem como alvo o transporte defeituoso de íons, que embora não promovam a cura da doença, melhoram a qualidade e a expectativa de vida dos pacientes.

PALAVRAS-CHAVES: *Fibrose Cística; Gene CFTR; Novas Terapias.*

INTRODUÇÃO

A fibrose cística (FC), também denominada mucoviscidose, é uma doença genética autossômica recessiva que se caracteriza principalmente por repetidas infecções das vias respiratórias inferiores, que resultam na gradual destruição dos tecidos pulmonares, podendo culminar com a morte precoce do paciente.

Além do comprometimento pulmonar, a FC pode afetar outros órgãos como o pâncreas exócrino, cujo mau funcionamento (insuficiência pancreática) provoca má digestão, má absorção e conseqüente desnutrição. Uma fração menor de pacientes apresenta pâncreas funcional, um quadro clínico mais brando da doença e uma sobrevida maior que aqueles com insuficiência pancreática.

Outras manifestações da FC são a obstrução

intestinal, que ao nascimento é conhecida como condição íleo-meconial, alta concentração de íons (Cl^- e Na^+) no suor e infertilidade, principalmente masculina. Esta última é resultante de azoospermia provocada pela ausência dos vasos deferentes. A infertilidade feminina é menos frequente, e em geral é devido à anormalidade do muco cervical e ao atraso do desenvolvimento.

A etiologia da doença é determinada por mais de 1800 mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) cuja proteína está envolvida, principalmente, no transporte de íons cloreto através das membranas apicais das células epiteliais¹.

A FC é considerada uma doença própria de populações de origem européias, raras em populações africanas e muito raras nos asiáticos. Entretanto, muito provavelmente grande parte das mortes pela FC em países onde a assistência médica é precária não é devidamente diagnosticada, por conseguinte, a frequência da doença em populações não caucasóides deve estar subestimada.

Até o momento ainda não foi encontrada a cura para a doença. As terapias para o tratamento dos sintomas incluem agentes que promovam o movimento e a desobstrução do muco nos pulmões, antibióticos para o tratamento das infecções, dieta e reposição de enzimas pancreáticas para melhorar o status nutricional. O transplante de pulmão é uma opção para pacientes adultos, uma vez que em crianças sua utilidade não está muito bem definida.

O diagnóstico precoce através da triagem neonatal é importante para aumentar a possibilidade do tratamento e redução da morbidade e mortalidade. As mais recentes terapias dirigidas para a correção do defeito básico que estão sendo testadas em pacientes dependem do conhecimento prévio da mutação responsável e representam um marco para o tratamento efetivo da FC e outras doenças genéticas. Esta revisão tenta colocar os recentes avanços científicos e tecnológicos no contexto histórico da Fibrose Cística, desde a descoberta do gene *CFTR* e da compreensão da função de seu produto, a

proteína de mesmo nome, até as novas terapias baseadas no conhecimento produzido por quase três décadas de investigação.

BREVE HISTÓRIA DA FIBROSE CÍSTICA

Esta doença já era mencionada pelo folclore norte europeu que dizia “amaldiçoada a criança que quando beijada na testa tivesse o gosto salgado, pois era enfeitiçada e morreria cedo”².

A primeira descrição da FC como uma entidade patológica foi publicada nos Estados Unidos em 1938, pela patologista Dorothy Andersen. Seu artigo intitulado “Fibrose cística do pâncreas e sua relação com a doença celíaca” definia a fibrose cística do pâncreas como uma desordem diferente da doença celíaca. Nos anos de 1940 os médicos compreenderam que os sistemas de ductos e outros transportes nos órgãos afetados pela FC eram obstruídos com secreções espessas e viscosas, quando então a doença foi denominada mucoviscidose por Farber em 1945³. Quase uma década depois foi feita a conexão entre o transporte do sal e a FC, quando em 1951 Kessler e Andersen observaram que crianças admitidas no hospital da Universidade de Columbia sofriam de prostração no calor, com sintomas de vômitos e sinais de choque sem evidência de infecção e que respondiam rapidamente à rehidratação⁴. Achados laboratoriais, nas análises de eletrólitos, mostraram concentrações baixas de cloreto (Cl^-) e bicarbonato (HCO_3^-). Estes achados levaram a hipótese de que a etiologia estava associada a anormalidades nas glândulas epiteliais⁴. Baseado nestas observações Paul Sant'Agnese, também da Universidade de Columbia, fez um estudo prospectivo do nível de eletrólitos em pacientes fibrocísticos e em controles sadios, demonstrando que os íons de Cl , Na e K tinham uma concentração significativamente maior no suor dos pacientes FC. Estes achados levaram Gibson e Cooke em 1959 a desenvolver o teste de suor como um teste de diagnóstico da fibrose cística⁴ considerado até hoje como teste padrão ouro da FC.

Compreendendo que a anormalidade estava relacionada ao transporte de íons cloro através das células epiteliais, as pesquisas então voltaram seu interesse para a procura do gene afetado. Em 1985 dois pesquisadores, Knowlton e Wainwright de instituições diferentes, através de análises de ligação, e usando diferentes marcadores genéticos localizaram o gene candidato no braço longo do cromossomo 7⁴. Em 1989, num esforço colaborativo internacional, Tsui, Collins, Riordan e colaboradores identificaram um gene de 250 Kb responsável pela FC⁵ e observaram que na maioria dos pacientes com fibrose cística o gene tinha uma alteração de três nucleotídeos que resultavam na deleção *in-frame* de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da proteína (DF508)⁵. A proteína codificada por este gene foi denominada pelo grupo de pesquisadores como “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator” (*CFTR*); em seguida reconheceram que se a *CFTR* não era um canal de íons cloro, ela certamente tinha a função reguladora da atividade de um canal de Cl⁻ ⁶.

BASES MOLECULARES DA DISFUNÇÃO DO CANAL DE CLORO (PROTEÍNA *CFTR*)

A proteína CFTR consiste de dois domínios transmembranares - MSDs (membrane spanning domains), cada um contendo 6 segmentos hidrofóbicos, que provavelmente formam um poro para a passagem dos íons; possui também dois domínios de ligação de nucleotídeos, denominados NBF1 e NBF2 (*nucleotide-binding fold*), que igualmente participam do transporte de íons; e de um domínio regulador, R, que parece funcionar como uma porta que regula a abertura do poro⁶.

Estes domínios da proteína são importantes do ponto de vista funcional e estrutural. Mutações de todos os tipos têm sido encontradas ao longo da região codificante, bem como na região promotora do gene, e foram classificadas de acordo com a alteração que produzem²:

a. Mutações de Classe I (alteração da bios-

síntese) produzem uma proteína defeituosa (inclui muitos alelos nulos e os fenótipos mais graves, por exemplo, G542X);

b. Mutações de Classe II (alteração na maturação) provocam o processamento defeituoso da proteína, por exemplo, DF508. Esta é a principal mutação em fibrocísticos e ocorre no primeiro domínio que liga ATP (NBF1). É resultante de uma deleção de três pares de bases que causa a perda de um resíduo de fenilalanina na posição 508 da proteína. Provavelmente uma proteína parcialmente glicosilada é produzida, mas é reconhecida como anormal por um mecanismo de controle celular e é conseqüentemente degradada.

c. Mutações de Classe III (alteração na regulação) produzem regulação defeituosa do canal. A proteína não responde a estimulação pelo AMP cíclico, como é o caso da G551D;

d. Mutações de Classe IV (alteração da condutância) provocam a condução defeituosa através do canal (incluem numerosos alelos brandos, por exemplo, R117H);

e. Mutações que afetam a estabilidade da proteína é uma classe adicional proposta por Haardt e colaboradores em 1999. Esta nova classe inclui proteínas que perdem resíduos da região C terminal ou que são resultantes de deleções de grandes resíduos de aminoácidos, que às vezes não são essenciais, mas que levam a redução drástica da estabilidade da proteína e potencialmente levam a fenótipos graves como no caso da mutação Q1412X⁴.

CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A FC se caracteriza por sua grande variabilidade na frequência e gravidade das manifestações clínicas e complicações. A possibilidade diagnóstica de FC não deve ser descartada porque o paciente aparenta estar bem⁷. Com

a disponibilidade da análise molecular da FC, foi confirmado que a FC não-clássica ou não detectada pelo teste do suor pode ocorrer na presença de testes do suor limítrofes ou negativos⁸. Um dos dilemas enfrentados pelos clínicos é motivado pelos pacientes que apresentam características clínicas compatíveis, testes de suor normais ou frequentemente limítrofes e uma ou nenhuma mutação da FC^{8,9}. A recomendação para estes casos é a realização de uma extensa avaliação clínica, fisiológica e genética para que se defina melhor o fenótipo e outras causas similares a FC (discinesia ciliar, imunodeficiência, síndrome de Shwachman-Diamond ou síndrome de Young). O diagnóstico de asma, pneumonia ou tosse crônica por si só não é suficiente para sustentar o diagnóstico de FC⁸.

Avanços nas técnicas de análise molecular têm levado não apenas à identificação de 1871 mutações *CFTR*¹, mas também no reconhecimento de um amplo espectro de doenças associadas às mutações no gene *CFTR*. Destas mais de 1800 mutações reportadas, as mutações de falso sentido correspondem a 41% do total de mutações depositadas, 17% são as que provocam a mudança na matriz de leitura, 12% são produzidas pela alteração no sítio de excisão-junção dos introns/exons, 8,6% correspondem as mutações que levam a perda do sentido produzindo finalização precoce da leitura do DNA, 2% são representadas pelas inserções/deleções sem perda da matriz de leitura, 3% são produzidas por grandes inserções/deleções, 1% ocorrem na região promotora e 14,4% são variações de sequências que não são preditivas de causarem doença¹. Apesar do grande número de defeitos na sequência do DNA apenas uma pequena percentagem das mutações identificadas é realmente causadora da FC clássica; a maioria tem consequências funcionais desconhecidas, outras conferem doenças mais brandas e um pequeno número é considerado como polimorfismos benignos⁴. Por esta razão não é surpreendente que diversas condições que se assemelham com a FC a nível órgão-específico, tais como as denominadas pancreatite “idiopática”, infertilidade mas-

culina devido a azoospermia obstrutiva e uma variedade de doenças sinopulmonares, estão associadas em alta frequência com mutações no gene *CFTR*. A forte associação entre as mutações *CFTR* e a pancreatite crônica foi reconhecida há mais de uma década. Nos estudos iniciais eram realizados rastreamentos de um pequeno número de mutações e a maioria dos pacientes era reportada como portador de apenas um alelo mutante. Nos estudos subsequentes o sequenciamento completo da região codificante do gene *CFTR* revelou uma alta percentagem de mutações *CFTR* de um ou de ambos os alelos entre os pacientes com pancreatite crônica e aguda recorrente¹⁰.

Enquanto o genótipo é altamente preditivo para o status do pâncreas exócrino, a influência do genótipo no curso das doenças pulmonares tem sido menos clara. Todos os estudos têm demonstrado extraordinária variação da função pulmonar entre pacientes portadores de FC com o mesmo genótipo, incluindo homozigotos DF508. Heterozigotos compostos pela associação de DF508 e qualquer uma das mutações graves do gene FC (tais como G551D, G542X, R553X, W1282X, N1303K, 1717-1G-A e 621+1G-T) não apresentam diferenças fenotípicas significantes dos homozigotos DF508. Alguns pacientes que são homozigotos ou heterozigotos para duas mutações sem sentido têm doença pulmonar leve, porém severo envolvimento pancreático. Uma possível explicação para este fenótipo é que no pulmão, a ausência da proteína *CFTR* deve ser menos prejudicial do que a proteína defeituosa^{7,8,11}.

A grande variabilidade da expressão da doença entre indivíduos com o mesmo genótipo sugere que, além da variação da gravidade produzida pelos efeitos das diferentes mutações (tipo ou localização da mutação, mecanismos moleculares, etc) e de polimorfismos intragênicos (alelos complexos) no gene *CFTR*, outros elementos genéticos, tais como polimorfismos em genes mediadores inflamatórios ou responsáveis pela resposta inata, estariam modulando a expressão da doença¹¹. Adicionalmente, fatores

ambientais, tais como a exposição ao estresse oxidativo e as infecções bacterianas (como infecção cruzada com *Burkholderia cepacia*), levam à exacerbação dos danos pulmonares¹².

DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DAS MUTAÇÕES DO GENE *CFTR*

Atualmente as estatísticas do CFMDB (2011)¹ reportam a existência de mais de 1800 mutações dentro do gene *CFTR*. Dentre estes mutantes, o mais freqüente em praticamente em todas as populações é o DF508, uma deleção de três nucleotídeos no exon 10 do gene que resulta numa perda do aminoácido Fenilalanina na posição 508 da proteína *CFTR*. A distribuição da mutação DF508 se apresenta como um cline com baixas frequências no Sudeste da Europa (30% na Turquia) até frequências muito altas no Noroeste europeu (88% na Dinamarca)¹³. Embora a freqüência da mutação DF508 seja relativamente alta em populações caucasóides, sua freqüência varia consideravelmente entre as diferentes regiões européias. Em populações do sul da Europa, onde a incidência de FC varia em torno de 1/3500 nascimentos, a freqüência desta mutação varia entre 40 e 60% dos afetados pela doença; já nas populações do norte europeu a variação da freqüência da mutação é de 70 a 90% entre os fibrocísticos e a incidência da FC varia desde 1/1700 (Irlanda do Norte) até 1/5600 (Suécia) nascidos vivos^{13,14}.

Além da grande variabilidade da freqüência da principal mutação causadora da FC (a DF508) em diferentes etnias e regiões geográficas, onde pode ser observada em baixas frequências como na Tunísia (17,7%), em judeus Askhenazi (30%)¹⁵ e no Norte da África (29,6%)¹⁶, a incidência da doença também varia entre diferentes grupos étnicos, como foi observada em Afro-Americanos (1/15300), Judeus Ashkenazi (1/3300); Judeus Marroquinos (1/15000) e Asiático-Americanos (1/31000)¹⁵. Embora as mutações variem grandemente em suas frequências e distribuições, a grande maioria são particulares ou limitadas a um pequeno número de indivíduos. No entanto, algumas

mutações podem alcançar altas frequências em uma população particular devido ao efeito do fundador, como é o caso da M1101K comum em huteritas¹⁷; a deriva genética, como no caso da G551D na história dos Celtas¹⁵; e de outras mutações que são recorrentes e que explicam suas presenças em populações não relacionadas, como a presença da R1162X em populações Zuni e Italiana¹⁸.

Mais de 43.000 cromossomos FC de diferentes países e continentes foram analisados no CFGAC (*Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*)¹⁹ onde foi observado que somente cinco mutações tinham frequências relativas maiores que 1% entre os pacientes portadores de FC: D com freqüência relativa igual a 66%; G542X com 2,4%; G551D com 1,6%; N1303K com 1,3% e W1282X com 1,2%. Outras 19 mutações foram encontradas em menos de 1% dos cromossomos, mas com variada distribuição geográfica, entre as quais se encontram as mutações: 1717-1G→A com freqüência de 0,83%; R553X com 0,75%; 621+1G→T com 0,54%; R1162X com 0,51% e 2183AA→G com 0,36%. Embora se possa observar que as frequências relativas das mutações não-DF508 sejam muito baixas, elas variam significativamente entre diferentes populações, como também entre diferentes regiões geográficas. A mutação G542X, por exemplo, é mais comum na região Mediterrânea, com uma freqüência média de 12% e a W1282X que tem alta freqüência em Israel (32,6%), é também comum em muitos países do Mediterrâneo e no norte da África (10,3% dos fibrocísticos na Tunísia)¹⁶.

Particularmente, no Rio de Janeiro a freqüência do mutante DF508 é relativamente baixa (31,5%) e pode-se observar um número apreciável de mutantes comuns à região Mediterrânea, entre as quais a G542X (2,1%), a G85E (4,73%) e a S549R (0,53%)²⁰. Em estudos anteriores realizados com pacientes FC nesta cidade a incidência foi estimada em 1/6902 nascimentos²¹. Neste mesmo estudo foram rastreados cerca de 300 indivíduos sadios e a freqüência observada de portadores da mutação DF508 foi de 1/93 indivíduos.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA FIBROSE CÍSTICA

O enorme número de outros alelos mutantes no gene *CFTR* constitui-se num desafio muito interessante para populações onde não exista predominância de grupos étnicos de origem europeia. Isto por que a distribuição mundial destes mutantes é extremamente heterogênea e com frequências locais geralmente raras. Em populações etnicamente miscigenadas como a brasileira, o diagnóstico molecular é dificultado pelo desconhecimento do painel de mutações próprias da população. Em geral os testes de diagnósticos são baseados no conjunto de mutações mais frequentes em populações europeias ou norteamericanas, que certamente não são as adequadas para uma triagem de mutantes entre pacientes fibrocísticos de outras etnias.

Os testes moleculares do *CFTR* baseiam-se principalmente na análise direta do gene, isto é, na detecção de mutações causadoras da doença, que por sua vez depende de ferramentas moleculares capazes de detectar mutações. Uma ampla variedade de técnicas é usada na identificação das variações de sequências e não há um padrão ouro na rotina de testes. Todos os métodos disponíveis requerem habilidade e experiência para executar e interpretar. Não existe nenhum método padrão ou preferido, mas os laboratórios devem ficar atentos as limitações dos métodos de sua escolha e devem conhecer que muitas mutações não podem ser identificadas, quer as técnicas estejam disponíveis comercialmente ou foram desenvolvidas no próprio laboratório. Isto quer dizer que o laboratório pode escolher um método que seja condizente com sua experiência, com a carga de trabalho e o escopo do teste.

Laboratórios de diagnóstico clínico continuam usando ensaios baseados na ligação de sequências específicas de curtas sondas de DNA complementar (oligonucleotídeos) ao DNA dos pacientes com o fim de detectar mutações associadas a doenças monogénicas. Em geral, estes ensaios baseiam-se na reação em cadeia da

polimerase (PCR) para amplificar regiões de interesse no DNA do paciente; o produto de PCR é então analisado para a presença ou ausência da mutação. Novas abordagens, inclusive o uso de chips de genes e sequenciamento, estão rapidamente substituindo estes métodos tradicionais de detecção de variações e mutações genéticas.

Os métodos usados no teste do *CFTR* podem ser divididos em dois grupos: aqueles dirigidos a mutações conhecidas (isto é, testes de amostras de DNA para identificar a presença ou ausência de mutações específicas) e os métodos de varredura (isto é, rastreamento de amostras para qualquer desvio do padrão de sequência). Estes incluem pesquisa de grandes rearranjos incluindo grandes deleções, inserções e duplicações, através de PCR semiquantitativo, ou seja, amplificação de múltiplas sondas ligadas (*multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) ou PCR quantitativo múltiplo por fluorescência (*quantitative fluorescent multiplex PCR*)²².

Até hoje mais de 1800 mutações no gene *CFTR*, junto com suas variações étnicas e geográficas em sua distribuição e frequência, já foram descritas^{6,13}. Destas variações 99% consistem de mutações pontuais e micro-deleções/inserções, embora contribuam entre 33-98% dos alelos FC, dependendo da população⁶. Um grande número de casos permanece sem solução após extensivo e laborioso rastreamento dos 27 exons do gene, tornando difícil o aconselhamento genético tanto para os pacientes quanto para sua família, particularmente quando o diagnóstico é incerto.

Mutações FC não identificadas podem encontrar-se nos introns ou nas regiões regulatórias que não são rotineiramente investigadas ou correspondem a rearranjos do gene tais como grandes deleções no status de heterozigoto que escapam das usuais técnicas baseadas no PCR²³. Em muito poucas situações tem-se suspeitado das deleções: nas falhas de amplificação de um exon-alvo particular quando a deleção está presente em pacientes homozigotos ou em casos de segregação anormal de uma mutação ou

polimorfismo em uma família²³.

Estes rearranjos, que podem escapar da detecção por ensaios de amplificação convencional, tem ocorrido em mais de 2% dos alelos em pacientes FC²² e 1% dos pacientes com agenesia bilateral congênita de vasos deferentes (CBAVD)²⁴. O uso combinado de todas estas técnicas não garante a detecção das duas mutações causadoras da doença (em trans) em todos os pacientes; 1-5% dos alelos permanecem indeterminados em pacientes FC com a forma clássica da doença e em frequência muito maior em pacientes com apresentação atípica¹⁰.

Análises de grandes e heterogêneas populações usando ensaios de PCR semiquantitativo para *screening* dos 27 exons, baseados na técnica de fluorescência, têm permitido identificar grande número de anomalias e rearranjos no gene *CFTR*²³. Alguns estudos têm mostrado que em alguns pacientes com características clínicas de FC, inclusive com teste de suor positivo e infecções pulmonares, não foi encontrado defeito no gene *CFTR* mesmo depois do sequenciamento completo do mesmo. Estes achados sugerem heterogeneidade de loci, isto é, outros genes estariam envolvidos produzindo o fenótipo similar a FC^{25,26}. Mutações nos genes *SCNN1 A*, *B* ou *G*, que codificam subunidades de canais de sódio (ENaC), foram recentemente encontrados em pacientes com formas FC não clássica onde nenhuma mutação *CFTR* pode ser identificada após extensivas técnicas de varredura²⁶.

O cenário do diagnóstico molecular está mudando rapidamente. Na era pré genômica, o diagnóstico molecular estava focado principalmente nas condições provocadas pelas mutações de um único gene que requeria a detecção de exatamente uma ou algumas poucas mutações. Agora o foco é mudar para testes múltiplos que detectam milhares –até milhões – de variantes de uma só vez. Tecnologias que combinam chips de computadores com detecção através de microscopia de fluorescência permitem a construção em massa de chips de genes altamente eficientes e precisos.

A descoberta de mutações que determinam

o fenótipo é uma premissa fundamental da pesquisa genética e que serão extremamente facilitadas pelas novas abordagens de sequenciamento de última geração²⁷. As abordagens convencionais, focadas na descoberta de mutações que fazem uso da PCR para amplificação de sequências genômicas selecionadas, estão sendo amplamente facilitadas por estratégias de segunda geração, principalmente quando se trata de rastrear grandes deleções e inserções, como a técnicas de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) ou a PCR em Tempo-Real.

Por outro lado, a avaliação dos custos associados com a seleção, análise e tratamento da FC é um desafio porque a tecnologia e as modalidades do tratamento estão mudando rapidamente. No entanto, existe o consenso geral sobre a magnitude de muitos dos principais custos variáveis e o sentido provável da futura evolução destas despesas. Em termos de tratamento, opções de atendimento para muitos indivíduos com FC tem se expandido durante a última década, com implicações para o custo médio de atendimento. Embora o Instituto de Avaliação de Tecnologia estimasse em 1992, com base em dados de 1989, que o custo anual do tratamento foi de aproximadamente US\$ 10.000 por ano por indivíduo com FC, as estimativas atuais ultrapassam os US\$ 40.000 por ano em despesas médicas diretas e US\$ 9.000 por ano em despesas auxiliares²⁸. A tecnologia e o custo de testes de DNA para o diagnóstico de um paciente fibrocístico está mudando rapidamente. Atualmente, o custo de testes de DNA para o diagnóstico da FC nos Estados Unidos está entre US\$ 50 e \$295 por teste (para um conjunto que varia entre 6 e 100 mutações) e para o sequenciamento completo do gene em torno de US \$ 1500 em instituições sem fins lucrativos²⁸. Devido ao desenvolvimento de novas tecnologias e equipamentos de última geração, estes custos tendem baixar e o número de mutações a ser testado irá aumentar rapidamente.

BASES GENÉTICAS NA BUSCA DE NOVAS TERAPIAS

O extraordinário progresso na compreensão da patogênese da FC tem permitido diversas oportunidades terapêuticas da doença. Diversas terapias atualmente disponíveis, incluindo os mucolíticos, antimicrobianos inaláveis, anti-inflamatórios sistêmicos, tem aumentado a qualidade e a expectativa de vida, mas não tratam do defeito básico, ou seja, a ausência da proteína *CFTR* funcional^{4,29}. A descoberta do gene *CFTR* pelo grupo de Collins⁵, associado a compreensão da função do produto do gene e os novos tratamentos que tem como alvo o transporte defeituoso de íons estão em vários estágios de desenvolvimento e prometem dar suporte complementar às terapias disponíveis.

Os mais recentes progressos nas estratégias de tratamento estão focados na identificação de compostos que potencializem a atividade da *CFTR*, restaurando sua regulação endógena - o transporte de íons. As classes de mutações que resultam em uma *CFTR* não funcional, localizadas na membrana plasmática, incluem as mutações de Classe III, IV, V e VI que se apresentam como alvos potenciais para agentes ativadores da *CFTR*. A mutação G551D representa um arquétipo desta categoria de agentes. O alelo G551D, uma mutação de Classe III, produz uma proteína completa que alcança a superfície da célula, mas apresenta reduzida atividade de transporte de íons devido ao fechamento do canal provocado pela substituição de uma adenosina trifosfato (ATP) dentro do domínio de ligação de nucleotídeos (NBF1)²⁹.

Vários compostos flavonóides, como a genisteína, um inibidor da tirosina quinase, tem sido testados como possíveis potenciadores da abertura do canal⁴. Com o suporte e colaboração da *Cystic Fibrosis Foundation* (CFF) e da *Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics* (CFFT) a *Vertex Pharmaceuticals* (Cambridge, MA) fez um *screening* completo para identificar e caracterizar potenciadores e corretores da proteína *CFTR*⁴. O VX-770, desenvolvido pela *Vertex*

Pharmaceuticals (indústria farmacêutica dos Estados Unidos que colabora com instituições de pesquisas no desenvolvimento de novas terapias para doenças tais como a FC), é um agente que aumenta o tempo de fosforilação dos canais G551-*CFTR* defeituosos permitindo que eles permaneçam abertos, aumentando o fluxo de cloreto e bicarbonato através das membranas apicais³⁰. Esta droga foi liberada para testes em pacientes fibrocísticos que são portadores desta mutação.

Compostos que facilitam o movimento da proteína DF508-*CFTR*, ou outras mutações de Classe II, para fora do retículo endoplasmático encaminhando-a para as membranas apicais são chamados corretores. Esforços significativos estão sendo gastos no sentido de encontrar agentes que corrijam o dobramento da proteína DF508-*CFTR* restaurando sua atividade de canal de íons. Como os potenciadores, ferramentas de triagem completa (*high-throughput screening*) para a identificação de corretores estão sendo utilizadas e algumas classes de agentes estão sendo testadas. Resultados iniciais da fase II dos ensaios clínicos do agente VX-809 (*Vertex Pharmaceutical*) estão sendo obtidos e tem mostrado que a recuperação da DF508-*CFTR* em humanos é alcançada através da liberação de pequenas moléculas, embora nenhum efeito sobre o diferencial de potencial nasal (NDP) e na função pulmonar tenha sido observado nos primeiros ensaios^{4,29,30}.

Agentes que corrigem o defeito em combinação com os potenciadores também estão sendo avaliados como prováveis estabilizadores da proteína *CFTR* defeituosa, como é o caso do VX-770 combinado com o VX-889 que estão sendo testados em pessoas com duas cópias da mutação DF508^{4,29,30}.

A leitura sobre os códons de terminação prematuros (PTCs) representa outra abordagem dirigida para a restauração da causa básica da FC e de outras doenças genéticas (DMD, por exemplo) cujo defeito na sequência do DNA leva à parada precoce da tradução da proteína. Alguns aminoglicosídeos e outros agentes tem a capacidade de interagir com o rRNA de

eucariotos dentro das subunidades ribossomais reduzindo a fidelidade da tradução pela interrupção da função de correção do RNA. A inserção de um aminoácido quase cognato em um códon de parada prematura permite que a proteína seja traduzida normalmente, isto é, o códon de parada é suprimido e resulta na síntese completa de uma proteína funcional. A PTC Therapeutics, Inc. (South Plainfield, New Jersey) está rastreando e avaliando mais de 800.000 compostos para identificar novos agentes para a indução da leitura por cima do códon^{4,29}.

CONCLUSÕES

A descoberta do gene *CFTR* gerou uma grande expectativa para o desenvolvimento de terapia curativa da FC. Apesar dos avanços no cuidado clínico, as doenças pulmonares contribuem com a maior parcela da morbidade e mortalidade. As terapias atuais disponíveis contribuem para a melhora das obstruções das vias aéreas e minorar as infecções bacterianas, mas não promovem a cura e a maioria dos afetados vai a óbito devido a gravidade das doenças pulmonares. Claramente existe uma urgência para uma efetiva cura da doença e um grande esforço da comunidade científica tem se voltado para a solução deste desafio. Esta revisão tenta mostrar a evolução do conhecimento adquirido ao longo dos anos e as três principais estratégias que estão em desenvolvimento que visam a correção ou o restabelecimento da função da proteína *CFTR*. Alguns destes compostos estão sendo avaliados em estágios II e III de ensaios clínicos com resultados bastante encorajadores. Portanto, o panorama da pesquisa, levando em conta os avanços científicos e tecnológicos com o fim de gerar novas terapias genéticas e não genéticas direcionadas para a correção do defeito básico da FC é vasto e promissor e abre caminhos para terapias definitivas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Dr. Pedro H. Cabello (Laboratório de Genética Humana – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz) pela leitura crítica do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. CFMDDB (Cystic Fibrosis Mutation Database). <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr> (Data de acesso: 19/05/2011).
2. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, *et al.* Cystic Fibrosis. In Scriver *et al.* (eds): The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. New York, McGraw-Hill 2001. p. 5121-88.
3. Wine JJ and Joo NS. Submucosal Glands and Airway Defense. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 47-53.
4. Kreindler JL. Cystic fibrosis: Exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies. *Pharmacol Ther* 2010; 125:219-229.
5. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073-80.
6. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
7. Ahmed N, Corey M, Forstner G, *et al.* Molecular consequences of cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene mutations in the exocrine pancreas. *Gut* 2003; 52:1159-1164.
8. Rosenstein BJ. Nonclassic cystic fibrosis: a clinical conundrum. *Pediatr Pulmonol* 2003; 36(1):10-2.
9. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era. *Clin Biochem Rev* 2005; 26:135-153.
10. Ooi CY, Dorfman R, Cipolli M, *et al.* Type of CFTR mutation determines risk of pancreatitis in patients with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2011; 140:153-161.
11. Cutting GR. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1214:57-69.
12. Merlo CA, Boyle MP. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med* 2003; 141(4):237-241.
13. EWGCFG - European Working Group on Cystic Fibrosis Genetics. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet* 1990; 85:436-445.
14. Farrel PM. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros* 2008; 7:450-53.
15. Bobadilla JL, Macek Jr M, Fine JP, *et al.* Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19:575-606.

16. Lakeman P, Gille JJP, Dankert-Roelse JE, *et al.* CFTR Mutations in Turkish and North African Cystic Fibrosis Patients in Europe: Implications for Screening. *Genetic Testing* 2008; 12(1):25-35.
17. Zielenski J, Fujiwara TM, Markiewicz, D, *et al.* Identification of the M1101K mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene and complete detection of cystic fibrosis mutations in the Hutterite population. *Am J Hum Genet* 1993; 52:609-15.
18. Morral N, Llevadot R, Casals T, *et al.* Independent origins of cystic fibrosis mutations R334W, R347P, R1162X, and 3849+10KbC>T provide evidence of mutation recurrence in CFTR gene. *Am J Hum Genet* 1994; 55:890-98.
19. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 1994; 4:167-77.
20. Cabello GMK, Cabello PH, Llerena JC, *et al.* Polymorphic markers suggest a gene flow of CFTR gene from Sub-Saharan/Arabian and Mediterranean to Brazilian population. *J Hered* 2006; 97:313-17.
21. Cabello GMK, Moreira AF, Horovitz D, *et al.* Cystic Fibrosis: Low frequency of DF508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol* 1999; 71(2):189-196.
22. Hantash FM, Redman JB, Starn K, *et al.* Novel and recurrent rearrangements in the CFTR gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening. *Hum Genet* 2006; 119:126-36.
23. Svensson AM, Chou L-S, Miller CE, *et al.* Detection of Large Rearrangements in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay When Sequencing Fails to Detect Two Disease-Causing Mutations. *Genet Test Mol Biomarkers* 2010; 14(2): 171-4.
24. Ratbi I, Legendre M, Niel F, *et al.* Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling. *Hum Reprod* 2007; 22: 1285– 1291.
25. Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, *et al.* Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. *N Engl J Med* 2002; 347:401-7.
26. Sheridan MB, Fong P, Groman JD, *et al.* Mutations in the beta-subunit of the epithelial Na⁺ channel in patients with a cystic fibrosis-like syndrome. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3493– 8.
27. Mardis EL. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* 2008; 24(3):133-141.
28. Chandrasekharan S, Heaney C, James T, *et al.* Impact of gene patents and licensing practices on access to genetic testing for cystic fibrosis. *Genet Med* 2010; 12(4):S194-S211.
29. Sloane PA, Rowe SM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2010; 16:591–97.
30. Erlinger S. Molecular repair of a defective CFTR protein in cystic fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011; 35:254-56.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease determined by mutations in the CFTR gene. This gene was identified in 1989 and spent just over two decades more than 1800 mutations have been characterized. The protein encoded by this gene was termed “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), that due to its structure composed of transmembrane domains and ATP binding domains acts as a channel responsible for transport of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ through the epithelial cells. The predominant mutation is the DF508, whose frequency varies in different populations, reaching values close to 90% among CF patients of Northern European. The vast majority of mutations are distributed in different geographical regions, often with very low frequencies, especially in countries outside the European axis whose ethnic composition is not predominantly Caucasian. The CF is characterized by its great variability in the frequency and severity of clinical manifestations, affecting thousands of individuals worldwide. The extraordinary progress in understanding the pathogenesis of CF has contributed to the development of new treatments and drugs that target the defective transport of ions, although they do not promote the healing of disease, improve the quality and life expectancy of patients.

KEY WORDS: *Cystic Fibrosis; CFTR Gene; New Therapies.*

TITULAÇÃO DOS AUTORES

EDITORIAL

AGNALDO JOSÉ LOPES

Professor Adjunto da Disciplina de Pneumologia e Tisiologia da FCM/UERJ;

Coordenador do Ambulatório de Fibrose Cística da Policlínica Piquet Carneiro da UERJ.

MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA

Professora Assistente da disciplina de Pneumologia e Fisiologia da FCM/UERJ;

Médica do Ambulatório de Fibrose Cística da Policlínica Piquet Carneiro da UERJ.

MARCOS CÉSAR SANTOS DE CASTRO

Mestrando em Ciências Médicas pela Universidade Federal Fluminense (UFF);

Médico do Ambulatório de Fibrose Cística da Policlínica Piquet Carneiro da UERJ.

ARTIGO 1: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FIBROSE CÍSTICA.

MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA

(Vide Editorial)

AGNALDO JOSÉ LOPES

(Vide Editorial)

ARTIGO 2: PERFIL MICROBIOLÓGICO NA FIBROSE CÍSTICA.

ELIZABETH DE ANDRADE MARQUES

Professora Associada da Disciplina de Microbiologia da FCM/UERJ;

Chefe do Laboratório de Bacteriologia do HUPE/UERJ.

ARTIGO 3: Avanços da Genética na Fibrose Cística.

GISELDA MARIA KALIL DE CABELLO

Doutora em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz;

Pós-Doutorada em Nanociência e Nanotecnologia pelo Centro de Nanociência e Nanotecnologia/ Universidade de Brasília.

ARTIGO 4: Fisiopatologia e Manifestações Clínicas da Fibrose Cística.

MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA

(Vide Editorial)

BRUNA LEITE MARQUES

Residente de Pneumologia e Tisiologia do HUPE/UERJ.

CLÁUDIA HENRIQUE DA COSTA

Professora Adjunta da Disciplina de Pneumologia e Tisiologia da FCM/UERJ;

Coordenadora da Disciplina de Pneumologia e Tisiologia da FCM/UERJ.

ARTIGO 5: AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO DA FIBROSE CÍSTICA — VISÃO CRÍTICA.

TÂNIA WROBEL FOLESCU

Médica assistente do Departamento de Pneumologia Pediátrica do Instituto Fernandes Figueira – Fundação Oswaldo Cruz (IFF-FIOCRUZ);
Mestre em Ciências Médicas pela FCM/UERJ.

RENATA WROBEL FOLESCU COHEN

Residente de Pediatria do Instituto Fernandes Figueira – Fundação Oswaldo Cruz (IFF-FIOCRUZ).

ARTIGO 6: A Radiologia do Tórax na Fibrose Cística.

DOMENICO CAPONE

Professor Adjunto da Disciplina de Pneumologia e Tisiologia da FCM/UERJ.

RAQUEL E. B. SALLES

Médica do Serviço de Pneumologia e Tisiologia do HUPE/UERJ.

MAURÍCIO R. FREITAS

Médico Residente do Serviço de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do HUPE/UERJ.

LEONARDO AZEVEDO

Médico Residente do Serviço de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do HUPE/UERJ.

RODRIGO LUCAS

Médico Residente do Serviço de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do HUPE/UERJ.

OSWALDO MONTESSI

Médico Residente do Serviço de Radiologia e Diagnóstico por Imagem do HUPE/UERJ.

CARLA JUNQUEIRA

Médica Residente do Serviço de Radiologia e

Diagnóstico por Imagem do HUPE/UERJ.

ARTIGO 7: TESTES DE FUNÇÃO PULMONAR EM ADULTOS FIBROCÍSTICOS.

AGNALDO JOSÉ LOPES

(Vide Editorial)

ANAMELIA COSTA FARIA

Médica do Serviço de Pneumologia e Tisiologia do HUPE/UERJ.

THIAGO THOMAZ MAFORT

Residente de Pneumologia e Tisiologia do HUPE/UERJ.

RENATO DE LIMA AZAMBUJA

Residente de Pneumologia e Tisiologia do HUPE/UERJ.

ROGÉRIO RUFINO

Professor Adjunto da Disciplina de Pneumologia e Tisiologia da FCM/UERJ.

ARTIGO 8: O TRATAMENTO NA FIBROSE CÍSTICA E SUAS COMPLICAÇÕES

MARCOS CÉSAR SANTOS DE CASTRO

(Vide Editorial)

MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA

(Vide Editorial)

ARTIGO 9: TRANSPLANTE NA FIBROSE CÍSTICA.

MARCOS CÉSAR SANTOS DE CASTRO

(Vide Editorial)

MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA

(Vide Editorial)

AGNALDO JOSÉ LOPES

(Vide Editorial)

ARTIGO 10: O PAPEL DA FISIOTERAPIA NA FIBROSE CÍSTICA

SUELI TOMAZINE DO PRADO

Fisioterapeuta do Ambulatório de Fibrose Cística da Policlínica Piquet Carneiro da UERJ.

ARTIGO 11: CUIDADOS NA UTILIZAÇÃO E NA LIMPEZA DE NEBULIZADORES E COMPRESSORES PARA A REDUÇÃO DE INFECÇÕES RECORRENTES EM PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.

SAMÁRIA A. CADER

Doutora em Fisioterapia.

ADALGISA I. M. BROMERSCHENCKEL

Fisioterapeuta especialista em Pneumofuncional; Coordenadora da Divisão de Fisioterapia da UERJ; Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UERJ.

SUELI TOMAZINE DO PRADO

(Vide Artigo 10)

ARTIGO 12: FIBROSE CÍSTICA E SUPORTE NUTRICIONAL NO ADULTO

CAROLINA FRAGA DE OLIVEIRA

Nutricionista da ACAM/RJ.

MARIANA JORGE FAVACHO DOS SANTOS

Nutricionista do Ambulatório de Fibrose Cística da Policlínica Piquet Carneiro da UERJ.

ARTIGO 13: GESTAÇÃO NA PACIENTE COM FIBROSE CÍSTICA

MARCOS CÉSAR SANTOS DE CASTRO

(Vide Editorial)

MÔNICA DE CÁSSIA FIRMIDA

(Vide Editorial)

ARTIGO 14: AS REPRESENTAÇÕES SOCIAIS DA FIBROSE CÍSTICA EM PACIENTES ADULTOS

LUCINÉRI FIGUEIREDO DA MOTTA SANTOS

Assistente Social do Ambulatório de Fibrose Cística da Policlínica Piquet Carneiro da UERJ.

ARTIGO 15: O TRABALHO DA ASSOCIAÇÃO CARIOCA DE ASSISTÊNCIA A MUCOVISCIDOSE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

ROBERTA CRISTINA GUARINO

Assistente Social e especialista em Responsabilidade Social.

Coordenadora da ACAM/RJ.

TATIANE ANDRADE

Fisioterapeuta da ACAM/RJ;

Mestranda do Curso de Pós-graduação em Ciências do Cuidado da Saúde – EEAAC/UFF.

SOLANGE CUNHA

Assistente Social da ACAM/RJ e especialista em gestão de pessoas;

Coordenadora da ACAM/RJ.

ANA CAROLINA VICTAL

Psicóloga da ACAM/RJ.

CAROLINA FRAGA DE OLIVEIRA

Nutricionista da ACAM/RJ.

JOANA CARVALHO

Acadêmica de Serviço Social e estagiária da ACAM/RJ.

ELOÁ LOPES

Acadêmica de Fisioterapia e estagiária da ACAM/RJ.