

Celeste Barreto¹

Fibrose quística – Vinte anos após a localização do *locus* do gene

Recebido para publicação: 05.08.18

Em 1938, Dorothy Anderson descreveu, pela primeira vez, a doença como “*cystic fibrosis of the pancreas*”. Em 1946, definiu-se o carácter genético da doença e, no início dos anos 80, foi estabelecido que a principal anomalia, subjacente à fibrose quística (FQ), era um deficiente transporte de cloreto e água, a nível das células epiteliais.

Em 1985, foi finalmente localizado o *locus* do gene FQ no braço longo do cromossoma 7¹. Esta descoberta foi, sem dúvida, decisiva para o início de uma nova era, caracterizada por grandes avanços no esclarecimento da complexidade da doença e por perspectivas de novas terapêuticas, incluindo a cura². Nos últimos vinte anos, todos os que se têm dedicado a esta doença têm acompanhado, com grande expectativa, a intensa investigação na FQ, nomeadamente na área da biologia molecular.

Em 1989, três anos após a localização do *locus* do gene FQ, surgem as primeiras publicações da sua clonagem e sequenciação. O gene codifica a síntese da proteína designada *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR)³. Estudos posteriores definem o papel fundamental da CFTR no transporte transepitelial de iões e na composição do fluido das superfícies epiteliais dos órgãos com expressão do gene, nomeadamente a nível pulmonar⁴. Falta, no entanto, ainda, esclarecer muitos aspectos das suas biossíntese, degradação, tráfego e função, importantes para planeamento de novas estratégias terapêuticas, tais como a terapia génica e a modulação farmacológica da proteína^{2,5,6}.

O resultado final da disfunção da proteína CFTR, por perda total ou parcial da função de canal de cloreto, a nível da membrana apical dos órgãos com expressão do gene, são as manifestações clínicas

¹ Centro Especializado de Fibrose Quística
Hospital de Santa Maria, Lisboa.

da doença. Classicamente, a FQ é caracterizada por disfunção pancreática exócrina, obstrução-infecção pulmonar crónica e por valores de cloreto ≥ 60 mEq/L na prova de suor². Em mais de 90 % dos doentes, a doença respiratória é a causa primária de morte. O início da colonização das vias respiratórias por *Pseudomonas aeruginosa* constitui um ponto de viragem na evolução da doença, associando-se a um prognóstico mais desfavorável⁷. Apesar disso, não podemos esquecer a grande variabilidade fenotípica na apresentação da doença e na sua evolução clínica, as quais têm levantado problemas de diagnóstico, nem sempre de resolução fácil, mesmo com a hipótese de rastreio de um enorme número de mutações no gene².

A mutação mais comum, a F508del, encontra-se em cerca de 70 % dos alelos FQ, na população caucasiana do Norte da Europa e da América⁸. Na população portuguesa, a prevalência é semelhante (66 %). Este novo dado nacional foi actualizado, recentemente, pela Dr.^a Paula Pacheco, responsável pelo Diagnóstico de Fibrose Quística, no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Genética Humana, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), através da análise genética exaustiva de 509 doentes portugueses.

Após a identificação da mutação mais comum, o número de mutações e polimorfismos no gene CFTR não tem parado de aumentar, estando actualmente reportadas, na *Cystic Fibrosis Mutation Database*, 1392 mutações, as quais se presume serem patológicas⁸. A grande maioria destas mutações são consideradas raras, sendo algumas específicas de certas populações, e outras têm mesmo carácter familiar.

A detecção de novas mutações, para além das 24 mais comuns, deve-se ao desenvolvimento de novas técnicas de pesquisa de mutações, que se baseiam na amplificação do DNA por PCR (reacção em cadeia pela polimerase), as quais permitem detectar qualquer alteração da sequência genómica analisada. Estes novos métodos, já disponíveis entre nós, têm possibilitado identificar mutações raras nos nossos doentes. De acordo com a última publicação sobre a epidemiologia molecular da FQ em Portugal, datada de 2004, as mutações A561E e R1066C, as mais frequentes a seguir à F508del, são consideradas específicas da população portuguesa. Apesar de pouco comuns na população em geral, a sua frequência entre nós é de 3,7 % e 3,2 %, respectivamente, sendo por isso definidas como comuns (superior a 2 %)⁹.

As mutações mais raras têm sido encontradas, sobretudo, em doentes com apresentações clínicas menos graves e/ou “atípicas”, com diagnóstico muitas vezes tardio e por vezes difícil de confirmar. O estudo molecular nem sempre faz o diagnóstico definitivo e o valor da prova de suor pode ser *border-line* ou mesmo normal. Estudos *in vivo*, capazes de demonstrar as anormalidades do transporte iónico pela medição da secreção de cloreto, a nível de células epiteliais nasais e rectais, estão a ser desenvolvidos em vários centros especializados. No Centro do Hospital de Santa Maria e em colaboração com o Grupo de Investigação de FQ do INSA e investigadores do Instituto de Fisiologia da Universidade de Freiburg, foi possível realizar a medição das correntes de curto-circuito em biópsias rectais. Os resultados do estudo, realizado em 43 doentes, permitiram confirmar e excluir diagnósticos^{10,11}.

A identificação de mutações conduziu, naturalmente, a correlações genótipo/fenótipo e rapidamente foi estabelecida a associação entre a função pancreática e determinados genótipos. Insuficiência pancreática (IP) foi associada a fenótipos mais graves e a mutações mais severas. Por outro lado, a função pancreática normal foi associada a fenótipos menos graves e a mutações suaves. Identificou-se um terceiro grupo de doentes sem manifestações pulmonares mas com ausência bilateral dos canais deferentes congénita e genótipo CFTR, com perda parcial da função da CFTR (~ 90 %). Verificou-se, também, que enquanto os doentes com IP e doença pulmonar apresentam maior perda de função (~ 99 %), os doentes com função pancreática têm menor perda de função (~ 95 %)².

Para correlacionar genótipo/fenótipo, as mutações têm sido divididas em classes, de acordo com as características funcionais do respectivo produto génico. Contudo, só uma pequena fracção das mutações reportadas na base de dados está caracterizada sob o ponto de vista funcional. As mutações de classe I, II e III associam-se de modo consistente com insuficiência pancreática e consideram-se mais graves. As de classe I, que ainda produzem alguma proteína normal, associam-se a fenótipos suaves e função pancreática. As de classe IV associam-se a função pancreática e a fenótipos suaves². A mutação mais comum, a F508del, é uma mutação de classe II. A mutação 3272-26A > G, pela sua frequência em Portugal, ligeiramente superior a 1 %, foi caracterizada pelo Grupo de Investigação de Fibrose Quística do INSA. A análise comparativa entre os 62 doentes, de 6 países europeus, com a mutação e os homocigóticos para a F508del, demonstrou um fenotipo clínico mais ligeiro nos doentes com a mutação 3272-26A > G. A base molecular deste fenótipo deve-se à existência de uma certa quantidade de mRNA CFTR, normalmente processada, não sendo, todavia, suficiente para evitar a doença¹².

A associação entre genótipo e doença pulmonar continua mal definida e não é consistente. Alguns estudos identificaram genótipos, de alto e de baixo risco, para a aquisição de *Pseudomonas aeruginosa*. Num estudo populacional, envolvendo 27 703 doentes registados no *Cystic Fibrosis Foundation Registry*, verificou-se que os doentes homocigóticos para a F508del ou portadores de duas mutações severas, quando comparados com doentes heterocigóticos para a F508del e mutações suaves, estavam no grupo de alto risco¹³. Num estudo retrospectivo, realizado no nosso centro, num grupo de 84 doentes, seguidos regularmente, verificou-se igualmente que a colonização crónica por *Pseudomonas aeruginosa* teve início numa idade significativamente inferior nos doentes homocigóticos para a F508del, quando comparados com doentes heterocigóticos para a F508del.

Atendendo à importância que a doença pulmonar tem sobre a evolução e sobrevida dos doentes FQ, a identificação das mutações poderá contribuir para o estabelecimento do prognóstico da doença, devendo ter-se sempre presente, no entanto, que em alguns indivíduos não se verifica a evolução esperada, isto é, em conformidade com o grupo genotípico a que pertencem. A influência de genes modificadores e de outros factores são um outro campo de investigação importante⁴.

O Centro de Fibrose Quística do Hospital de Santa Maria, actualmente com 100 doentes em seguimento regular (69 na Pediatria e 31 no Serviço de Pneumologia), integra o projecto de investigação – liderado

pela Prof.^a Margarida Amaral (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e Centro de Genética Humana) e aprovado pela comissão de ética – que tem como objectivo identificar novos marcadores biológicos, os quais poderão vir a revelar novos mecanismos da base molecular e celular da FQ importantes para o desenvolvimento de novas terapias e, também, de grande utilidade para o diagnóstico de casos duvidosos e evoluções atípicas. Para a concretização do projecto estão a ser utilizadas metodologias de genómica funcional, nomeadamente proteómica e *microarrays*, usando como modelo biológico, para estudo da doença respiratória crónica, as células do epitélio nasal.

Para além de toda a investigação desenvolvida nestes últimos 20 anos para explicar a complexidade da FQ e desenvolver novos tratamentos, outros progressos são de referir. Com efeito, nestas últimas duas décadas, a sobrevida destes doentes aumentou significativamente na maioria dos países. Desde os anos 30, altura em que 70 % dos doentes morriam no primeiro ano de vida, tem-se observado uma melhoria gradual do prognóstico. Actualmente, para uma criança nascida nos anos 90 calcula-se uma sobrevida média previsível de 40 anos. Este número, evidentemente, varia de acordo com o tipo de acompanhamento. No nosso centro, por exemplo, num estudo de sobrevivência realizado em 1998 estimou-se uma sobrevida de 30 anos em 50 % dos doentes¹⁴.

Está sobejamente demonstrado que o seguimento destes doentes em centros de fibrose quística pediátricos e de adultos por equipa multidisciplinar tem sido a grande determinante para a maior sobrevida e melhor qualidade de vida¹⁵.

Perante esta evidência, no seio da *European Cystic Fibrosis Society* foram promovidas reuniões de consenso para elaboração de documento que estabelecesse orientações *standards*, para a avaliação periódica, a monitorização e o tratamento dos doentes com FQ, a nível da Europa. Pretende-se que este *Consenso Europeu* seja adoptado por todos os países, tendo em vista assegurar a qualidade e servir de instrumento de auditoria, em e para todos os centros de FQ. De referir que um centro deve ter, no mínimo, 50 doentes em seguimento permanente por equipa multidisciplinar com experiência nesta área e, preferencialmente, deve estar inserido num hospital universitário¹⁶.

Em 2005, decorridos 20 anos após a localização do gene da FQ e analisando a realidade portuguesa, verificaram-se mudanças muito positivas: 1) a sobrevida aumentou; 2) a qualidade de vida melhorou; 3) já se realizou um transplante pulmonar; e 4) criou-se uma equipa de investigadores internacionalmente credenciados.

Continuamos, no entanto, a constatar factos negativos, como, entre outros: 1) doentes diagnosticados não referenciados às consultas especializadas; 2) diagnósticos tardios; e 3) provas de suor incorrectamente realizadas.

Com a esperança e o optimismo de quem acompanha, há cerca de 20 anos, doentes com FQ, espera-se que, a curto prazo, se conjuguem esforços para a criação da base de dados nacional para a implementação das recomendações do *Consenso Europeu* e para a promoção do *screening* neonatal.

Bibliografia

1. Tsui el al. Cystic Fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985;230:1054-7.
2. Pamela, B., et al. "State of the Art, Cystic Fibrosis". *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1229-56).
3. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-73.
4. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 2004; 23:146-158.
5. Brennan A, Geddes D. Bringing New Treatments to the Bedside in Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol*; 2004;37:87-98.
6. Amaral MD. Processing of CFTR: Traversing the Cellular Maze-How Much CFTR Needs to Go Through to Avoid Cystic Fibrosis? *Pediatr Pulmonol*; 2005; 39:479-491.
7. Hoiby N, Doring G, Shiotz PO. The role of immune complex in the pathogenesis of bacterial infection. *Annu Rev Microbiol* 1986;40:29-53.
8. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium - The CFTR mutation database (2005); <http://www.genet.sickkids.on.ca>.
9. Pacheco P. Contributed with the Detection rate of CF-causing CFTR mutations in Portugal. World Health Organization (2004) The Molecular Genetic Epidemiology of Cystic Fibrosis; <http://www.who.int/genomics/publications/en/>.
10. Barreto C, Pereira L Como interpretar as Provas de Suor com valores borderline no diagnóstico de Fibrose Quística. *Acta Pediatr Port* 35 (3): 261-266.
11. Stephanie Hirtz, Tanja Gonska, Hans H Seydewitz, Jorg Thomas, Peter Greiner, Joachim Kuehr, Matthias Brandis, Irmgard Eichler, Herculano Rocha, Ana Isabel Lopes, Celeste Barreto, Anabela Ramalho, Margarida Amaral, Karl Kunzelmann, Marcus Mall. CFTR Cl- Cannel Function in Native Human Colon Correlates With the Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Gastroenterology* 2004;127:1085-95.
12. Amaral MD et al. Cystic Fibrosis patients with the 3272-26A!A spicing mutation have milder disease than F508del homozygotes: a large European study. *J Med Genet* 2001; 38(11):777-783.
13. Lai HuiChuan et al. Association between Initial Disease Presentation, Lung disease Outcomes, and Survival in Patients with Cystic Fibrosis. *Am J Epidemiol* 2004;159:537-546 of *Cystic Fibrosis* 2002;1:13-29.
14. Pereira L, Bandeira T, Amaral I, Barreto C. Aumento da esperança média de vida nos doentes com Fibrose Quística: experiência do Centro de Fibrose Quística da Unidade de Pneumologia do Serviço de Pediatria do Hospital de Santa Maria. *Rev Port Pneumol* 1998 IV (6): 599-609.
15. Mahadeva R, et al. Clinical outcome in relation to care in centres specialising in cystic fibrosis: cross sectional study. *BMJ* 1998; 316:1771-75.
16. Kerem E, Conway S, Elborn S, Heijerman. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *Journal of Cystic Fibrosis* 2005;4:7-26.