

## ARTIGO DE REVISÃO

## A GENÉTICA NA FIBROSE CÍSTICA

## GENETICS OF CYSTIC FIBROSIS

Maria Luiza Saraiva-Pereira<sup>1,2,3</sup>, Mariana Fitarelli-Kiehl<sup>1</sup>, Maria Teresa Vieira Sanseverino<sup>2</sup>

## RESUMO

A fibrose cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais comum em euro-descendentes, com uma incidência estimada de 1 caso a cada 2.500 nascimentos. A FC é uma doença multissistêmica, caracterizada principalmente por doença pulmonar progressiva, disfunção pancreática exócrina e concentração elevada de eletrólitos no suor. O gene associado a essa doença é denominado *CFTR* e se localiza no cromossomo 7, sendo dividido em 27 éxons. Até o momento, mais de 1.800 variações de sequência foram identificadas no gene *CFTR*, sendo que a mutação p.Phe508del é a mais frequente entre os pacientes de FC. No Brasil, a frequência dessa mutação não é tão elevada, devido provavelmente à miscigenação e, conseqüentemente, o *locus CFTR* apresenta maior heterogeneidade alélica. A probabilidade de um filho afetado com FC é de 1 em 4, ou 25%, para filhos de um casal em que ambos são portadores de uma mutação. O risco de um indivíduo com FC ter filhos afetados depende de seu parceiro – se o parceiro for portador da doença o risco será de 50%. Para casais em risco de terem filhos com FC e com mutação ou mutações identificadas, é possível oferecer diagnóstico pré-natal (DPN) e diagnóstico genético pré-implantacional (DPI). Considerando a complexidade da informação genética relacionada à FC e das alternativas reprodutivas que estão surgindo, é muito importante a disponibilização do aconselhamento genético para o paciente e sua família.

**Palavras-chave:** Fibrose cística; gene *CFTR*; aconselhamento genético; análise molecular; diagnóstico pré-natal; diagnóstico pré-implantacional

## ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disease in European-derived populations, with an estimated incidence of 1/2,500 live births. CF is a multisystem disease, mainly characterized by progressive obstructive pulmonary disease, pancreatic insufficiency, and high electrolyte levels in sweat. The gene responsible for CF (*CFTR*) is located on chromosome 7, which comprises 27 exons. More than 1,800 sequence variations have been reported in the *CFTR* gene so far, and the p.Phe508del mutation is the most frequent among patients with CF. In Brazil, the frequency of p.Phe508del is lower than in other countries probably because of population admixture. This indicates that the *CFTR locus* may be more heterogeneous. For a couple with both parents carrying CF mutations, the probability of having a child with CF is 1 in 4, or 25%. The risk of having a child with CF for a CF patient depends on his/her partner – if the partner is a carrier of a CF mutation, the risk is 50%. For couples at risk of having a child with CF and with known CF mutations, it is possible to offer prenatal diagnosis (PND) and preimplantation genetic diagnosis (PGD). Considering the complexity of the genetic information related to CF and the reproductive alternatives that are emerging, it is very important to offer genetic counseling for patients and their families.

**Keywords:** Cystic fibrosis; *CFTR* gene; genetic counseling; molecular analysis; prenatal diagnosis; preimplantation genetic diagnosis

Rev HCPA 2011;31(2):160-167

A fibrose cística (FC, OMIM 219700) é a doença genética de herança autossômica recessiva mais comum em euro-descendentes, com incidência estimada em 1:2.500 nascidos-vivos (1). Entretanto, essa incidência pode variar entre populações diferentes. Por exemplo, ela varia entre 1:4.000-1:10.000 em latino-americanos a 1:350.000 no Japão (2).

## GENÉTICA MOLECULAR DA FIBROSE CÍSTICA

O gene responsável pela FC foi localizado no braço longo do cromossomo 7 (*locus* 7q31) e identificado por técnicas de clonagem posicional em 1989, sendo denominado *Cystic Fibrosis*

*Transmembrane Regulator* (*CFTR*). O gene *CFTR* abrange aproximadamente 190 kb de DNA genômico e está dividido em 27 éxons. Esse gene é transcrito em um mRNA maduro de 6,5 kb cuja tradução dá origem a uma proteína composta por 1.480 aminoácidos, com peso molecular de 168 kDa (3-5).

O gene *CFTR* apresenta um padrão de expressão altamente regulado temporal e espacialmente. Análises dos níveis de mRNA por hibridização *in situ* demonstraram que o *CFTR* é altamente expresso no epitélio do ducto pancreático e no epitélio intestinal. Além disso, os padrões de expressão de *CFTR* no feto são mantidos após o nascimento, exceto no sistema respiratório, em que altos níveis de expressão são

1. Laboratório de Identificação Genética, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

2. Serviço de Genética Médica, HCPA.

3. Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Contato:** Maria Luiza Saraiva-Pereira. E-mail: [mlpereira@hcpa.ufrgs.br](mailto:mlpereira@hcpa.ufrgs.br) (Porto Alegre, RS, Brazil).

encontrados nos pulmões de fetos em contraposição à relativa baixa expressão detectada em pulmões de adultos (6).

A expressão de CFTR em células epiteliais está bem descrita, e a função do CFTR nestas células está relacionada à fisiopatologia da FC. Porém, mais recentemente, a expressão de CFTR foi descrita em células neuronais do hipotálamo, fornecendo uma possível explicação para alguns sintomas neurológicos encontrados em pacientes com FC (7).

A proteína codificada pelo gene CFTR funciona como um canal direto na membrana epitelial que realiza o transporte do íon cloro através da membrana apical e o interior da célula, sendo regulado por cAMP (1).

A proteína CFTR é uma glicoproteína, integrante da família de transportadores de membrana acoplados a ATP (ABC – *ATP-binding cassette*), que se localiza na membrana apical de células epiteliais das vias aéreas, do intestino, dos tecidos reprodutivos e das glândulas exócrinas (8).

A proteína CFTR é composta por dois domínios transmembrânicos hidrofóbicos (MSD – *membrane-spanning domain*), cada um com 6 subunidades, dois domínios de ligação a nucleotídeo (NBD – *nucleotide binding domains*) e um domínio regulatório citoplasmático que contém múltiplos sítios-alvo para fosforilação por proteínas cinases. As caudas amino e carboxi-terminal são orientadas para o citoplasma e atuam como mediadores da interação entre CFTR e uma ampla variedade de proteínas ligantes (8,9).

As subunidades dos domínios MSDs contribuem para a formação do poro do canal de cloro, uma vez que mutações em sítios específicos dentro dos MSDs alteram sua seletividade a ânions. Os domínios NBD são responsáveis pela ligação e pela hidrólise de ATP e fornecem a energia necessária para a atividade do canal. O domínio regulatório modula a atividade de CFTR e pode ter um efeito inibitório ou estimulatório (1,9).

Muitas células epiteliais regulam a secreção de Cl<sup>-</sup> através da modulação da atividade do canal CFTR e do controle do número de canais CFTR na membrana (10). A atividade do CFTR pode ser modulada através de diferentes mecanismos, incluindo os que envolvem fosforilação e defosforilação. A ativação do canal de Cl<sup>-</sup> parece ocorrer através de diferentes passos. Primeiramente, o domínio regulatório se torna fosforilado por uma proteína cinase dependente de cAMP (PKA). Em seguida, o ATP intracelular se liga e é hidrolisado pelo NBD1 e assim o canal se abre e os íons Cl<sup>-</sup> são transportados. A ligação e hidrólise de ATP pelo NBD2 levam ao fechamento do canal (11).

Além de funcionar como um canal de cloro, a proteína CFTR também atua como um regulador de condutância, exercendo influências mo-

dulatórias sobre outros canais iônicos (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>), sobre o transporte de proteínas e sobre processos como mecanismos de liberação de ATP, regulação da secreção de bicarbonato, produção de óxido nítrico, entre outros (10) (Guggino e Stanton, 2006). Essa proteína coregula o transporte de Na<sup>+</sup> através da interação com o canal de sódio epitelial (ENaC). Esta interação entre CFTR e ENaC é biologicamente relevante porque o balanço entre a secreção de cloro mediada pelo CFTR e a reabsorção de Na<sup>+</sup> mediada pelo ENaC regulam a quantidade de sais e água nos fluidos encontrados na superfície celular de alguns tecidos (10).

A proteína CFTR também pode funcionar como um neuromodulador e sinalizador celular, mediando o fluxo de glutatona através da hidrólise de ATP, além de ser importante para a regulação da reciclagem de membrana dependente de cAMP, indicando que mutações em CFTR podem induzir disfunções no sistema nervoso central (7).

### MUTAÇÕES NO GENE CFTR

Segundo o Banco de Dados de Mutações da Fibrose Cística (*Cystic Fibrosis Mutation Database* - <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>), existem 1.876 mutações identificadas ao longo do gene CFTR (acesso em maio de 2011). A maior parte das alterações envolve um ou poucos nucleotídeos, sendo que a grande maioria é responsável por substituição de um aminoácido (40,67%).

A mutação p.Phe508del, tradicionalmente conhecida como deltaF508, é a mais frequente entre os pacientes com FC, estando presente em aproximadamente 66% dos alelos em estatística mundial. A maioria das mutações restantes no gene CFTR são raras, com apenas quatro (p.Gly542X, p.Gly551Asp, p.Asn1303Lys e p.Trp1282X) apresentando frequências acima de 1% (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

A frequência e a distribuição das mutações no CFTR variam de acordo com a origem étnica dos pacientes com FC. Por exemplo, a frequência alélica de p.Phe508del apresenta um gradiente ao longo da Europa, variando de 24,5% na Turquia a 90% na Dinamarca. Além disso, algumas mutações são específicas ou apresentam frequências elevadas em determinados grupos étnicos, como a mutação p.Trp1282X em judeus Ashkenazi e a c.2988G>A (também conhecida como 3120+1G>A) em africanos (12). Essas variações são, provavelmente, devido ao efeito fundador durante a migração e estabelecimento de alguns grupos em diferentes áreas (13).

A população brasileira é bastante heterogênea, com uma alta taxa de miscigenação. Uma das consequências deste fato é a grande heterogeneidade alélica do gene CFTR, sendo que a frequência das mutações é variável de

estado para estado. A mutação p.Phe508del apresenta, nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, frequências entre 45,5 e 50% e, no Rio de Janeiro e Pará, frequências de 28,4 e 22,7% respectivamente (14). No estudo realizado pelo nosso grupo, a mutação p.Phe508del foi encontrada em 48,7% dos alelos (15). Vários estudos foram realizados em diferentes regiões do Brasil e todos demonstram a heterogeneidade alélica e a necessidade da realização de estudos regionais para determinar o perfil mutacional na região específica (16-23),

As mutações no gene CFTR podem ser classificadas em diferentes grupos, de acordo com os mecanismos pelos quais interrompem a função de CFTR:

#### **Classe I – Mutações que inibem ou reduzem a produção da proteína**

As mutações de classe I podem criar um códon de terminação prematuro (*nonsense mutations*), deslocar a fase de leitura ou alterar o padrão de *splicing*, inibindo a síntese da proteína estável ou produzindo baixos níveis da proteína madura (13).

As mutações p.Gly542X (ou G542X) e p.Trp1282X (ou W1282X) são as representantes mais comuns desta classe, estando relacionadas aos fenótipos mais graves de FC, uma vez que a proteína CFTR não é sintetizada corretamente. Proteínas truncadas geralmente são instáveis, sendo reconhecidas por chaperonas no retículo endoplasmático e degradadas rapidamente (13). A degradação do mRNA mediada pela criação de códon de terminação prematuro (NMD - *nonsense mediated decay*) também está relacionada a mutações de classe I, porém a eficiência do processo de NMD é variável entre os pacientes com FC (24).

Esta classe também inclui fenótipos menos graves ou intermediários, que ocorrem devido a variações de sequência que alteram o padrão de *splicing*, produzindo baixos níveis da proteína CFTR funcional. Um exemplo é o polimorfismo de número de repetições (TG)<sub>n</sub>T<sub>m</sub> na junção íntron 8 - éxon 9.

O *splicing* alternativo é um processo regulado, que aumenta a diversidade de mRNA maduros correspondentes a um gene. Porém, ocasionalmente, éxons constitutivos também podem ser removidos devido à presença de sítios de *splicing* com eficiência reduzida e o éxon 9 do gene CFTR é um exemplo deste processo. Entre o sítio de ramificação e a extremidade 3' do sítio de *splicing* do íntron 8 existe uma região polimórfica com número variável de repetições timidinas-guaninas (TG) seguida imediatamente por uma repetição de timidinas (T), conhecida como polimorfismo (TG)<sub>m</sub>T<sub>n</sub>. Formas alélicas contendo 5T, 7T ou 9T podem ser encontradas nessa região e alelos com 5T têm altos níveis de

remoção do éxon 9. O número de repetições TG pode variar de 10 a 13 e o tamanho desta repetição influencia a penetrância dos alelos contendo 5T. Sequências TG com 12 ou 13 repetições, quando em *cis* com a repetição 5T, contribuem para um aumento dos níveis de remoção do éxon 9. O mRNA sem o éxon 9 codifica uma proteína com dobramento incorreto e, assim, a variante alélica contendo 5T pode estar relacionada ao aumento da gravidade do fenótipo da FC, principalmente se associada com 12 ou 13 TG (25).

#### **Classe II – Mutações que afetam o processamento da proteína**

Mutações desta classe não permitem que a proteína CFTR seja processada corretamente, impedindo-a de alcançar a membrana celular para funcionar como um canal de Cl<sup>-</sup>. A principal representante desta classe é a mutação p.Phe508del e também estão incluídas outras mutações associadas a dobramento incorreto da proteína, como algumas que causam substituição de aminoácido (13).

A p.Phe508del é uma deleção de 3 pb no éxon 10 do gene CFTR, que ocasiona a perda da fenilalanina na posição 508 da proteína. A proteína CFTR com p.Phe508del é sintetizada, mas não é transportada para a membrana celular por apresentar dobramento incorreto.

#### **Classe III – Mutações que afetam a regulação do canal de Cl<sup>-</sup>**

Mutações de classe III produzem proteínas CFTR que são transportadas para a membrana celular, mas não respondem à estimulação por cAMP (13). As mutações desta classe geralmente estão presentes nos NBD, interferindo na interação desses domínios com ATP intracelular e, conseqüentemente, impedindo a regulação correta da abertura do canal de Cl<sup>-</sup>. Algumas mutações interrompem fortemente a função do CFTR, como a p.Gly551Asp, e estão associadas aos fenótipos graves da FC, e outras, como a p.Ala455Glu (ou A455E), causam uma diminuição moderada da função de CFTR e são associadas a fenótipos leves (1).

#### **Classe IV – Mutações que afetam o transporte de Cl<sup>-</sup>**

Muitas mutações foram identificadas nos domínios transmembrânicos, sendo que o gene codifica uma proteína que é transportada corretamente para a membrana celular e responde a estímulos, mas gera um fluxo reduzido de íons Cl<sup>-</sup>. Alguns exemplos incluem mutações no MSD1, como a p.R117H, a p.R334W e a p.R347P, estando associadas ao fenótipo intermediário de FC. A mutação p.D1152H, localizada na alça intracitoplasmática que conecta o MSD2 ao NBD2, reduz significativamente o fluxo

de Cl<sup>-</sup> estimulado por cAMP e também está incluída na classe IV (13).

### CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

O fenótipo da FC é altamente heterogêneo, indicando uma complexa contribuição de diferentes fatores na determinação da gravidade da doença, como a presença de mutações no gene *CFTR* com diferentes efeitos na proteína, genes modificadores e efeitos ambientais (1). O atraso no diagnóstico, a disponibilidade e adesão ao tratamento, a exposição a poluentes do ar, bem como o tempo de infecção pulmonar podem ser considerados como fatores ambientais.

As mutações denominadas graves, em que a proteína CFTR funcional está ausente, estão correlacionadas principalmente com insuficiência pancreática, início precoce dos sintomas, altos níveis de Cl<sup>-</sup> no suor e infertilidade masculina. As mutações intermediárias, cujo efeito é mais sutil na função da proteína ou permitem que uma pequena quantidade de CFTR funcional seja produzida, são geralmente associadas com suficiência pancreática, diagnóstico tardio, baixos níveis de Cl<sup>-</sup> no suor e dano pulmonar intermediário (13).

Poucas mutações no gene *CFTR* foram associadas à doença pulmonar na FC, já que este aspecto é altamente variável, mesmo entre irmãos que possuem o mesmo genótipo. Pacientes apresentando a mutação p.A455E, por exemplo, parecem ter uma menor taxa de declínio da função pulmonar, e algumas mutações que afetam o *splicing* foram correlacionadas com um baixo risco de infecção com *P. aeruginosa*. Apesar dessas observações, existe um consenso de que o genótipo é pouco correlacionado com a gravidade da doença pulmonar (26).

Por outro lado, o estado pancreático dos pacientes é altamente associado com o genótipo de *CFTR*. Pacientes com suficiência pancreática têm pelo menos uma mutação intermediária, enquanto pacientes com insuficiência pancreática são homocigotos ou heterocigotos compostos para duas mutações de efeito grave. As mutações p.R117H, p.R334W, p.R347P e p.A455E, por exemplo, são geralmente associadas com dano pancreático menos grave (26).

O genótipo do *CFTR* também está associado ao transporte iônico através do epitélio intestinal, porém a função do genótipo no desenvolvimento das complicações intestinais em pacientes com FC ainda é pouco clara. A manifestação de íleo meconial parece ocorrer somente em pacientes com insuficiência pancreática (26).

A doença hepática está altamente associada com o estado pancreático e, em alguns casos, com íleo meconial. Assim, pacientes com doença hepática tendem a apresentar mutações de efeito grave, que são altamente associadas à insuficiência pancreática (26).

O TGFβ1 (*Transforming Growth Factor β1*), um mediador de fibrose, foi identificado como modificador da doença pulmonar, sendo que uma variante alélica responsável por alta produção da proteína foi associada a um pior estado pulmonar em pacientes com FC. Modelos recentes para a fisiopatologia da FC incluem elementos que contribuem para a remoção bacteriana anormal dos pulmões, para a infecção persistente, para a inflamação intensa e para o dano estrutural dos órgãos, e o TGFβ1 participa desses processos. Muitos outros candidatos a modificadores estão sendo estudados, como, por exemplo, MBL2 (*Mannose Binding Lectin 2*) e TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*), porém os estudos são, em geral, de pequeno porte levando a resultados conflitantes (27, 28).

Recentemente, um estudo de associação *genome-wide* identificou uma região genômica no *locus 11p13*, perto dos genes *EHF* e *APIP*, com associação estatisticamente significativa em pacientes homocigotos para a mutação p.Phe508del (29).

### DIAGNÓSTICO MOLECULAR

#### *Indivíduos sintomáticos*

O diagnóstico molecular de FC não é fácil de ser realizado devido ao grande número de mutações já descritas. Em regiões em que a mutação p.Phe508del apresenta alta frequência, boa parte dos casos podem ser identificados pela análise molecular de apenas essa mutação. No caso do Rio Grande do Sul, onde pacientes homocigotos para a mutação p.Phe508del totalizam aproximadamente 30% dos casos de FC (15), o genótipo da grande maioria dos pacientes não é identificado apenas pela análise dessa mutação, sendo necessária a realização de sequenciamento completo do gene.

#### *Triagem neonatal*

A triagem neonatal para FC é realizada através da avaliação da tripsina imunorreativa (IRT), com o objetivo de auxiliar no diagnóstico precoce (1). A IRT é avaliada no sangue para identificação precoce de manifestações bioquímicas da disfunção pancreática. A medição é feita em amostras de sangue seco (teste do pezinho) usando radioimunoensaio (30).

Uma simples elevação de IRT logo após o nascimento não é específica para FC, uma vez que elevação transitória nos níveis de IRT pode ser detectada em crianças normais. Crianças com FC apresentam elevações persistentes de IRT.

Por outro lado, a dosagem de IRT é sempre um assunto controverso, devido às taxas de resultados falso-positivos (0,5%) e falso-negativos (até 20%). Além disso, a concentração do tripsinogênio diminui em poucas sema-

nas após o nascimento, o que limita o uso dessa medida aos dois primeiros meses de vida (30).

Os principais benefícios da triagem neonatal para FC demonstrados em estudos randomizados são a melhora do estado nutricional e melhor desempenho cognitivo dos pacientes detectados. São considerados benefícios secundários a detecção de portadores e as opções reprodutivas decorrentes. Espera-se que em longo prazo o tratamento pré-sintomático diminua as lesões pulmonares, contribuindo para um aumento na expectativa e na qualidade de vida dos afetados (31).

A principal complicação da triagem neonatal para FC é ansiedade causada pelos resultados anormais, sendo que a maioria será falso-positivo. O aconselhamento genético para as famílias é essencial, contribuindo para o esclarecimento do significado de portadores saudáveis e para o manejo dos casos confirmados e dos familiares (32).

No Brasil, a triagem neonatal para FC na rede pública é incluída entre as doenças da Fase III (fenilcetonúria, hipotireoidismo, anemia falciforme e fibrose cística), tendo sido implantada inicialmente em apenas três estados: Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais ([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id\\_area=1061](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061)). Mais recentemente, outros três estados passaram também a incluir a FC na triagem obrigatória: Espírito Santo, Goiás e São Paulo, mas ainda não há dados disponíveis.

### **Identificação de indivíduos portadores na população**

A triagem populacional para a FC se refere à testagem de mutações no gene CFTR em indivíduos que não têm história familiar de fibrose cística. Existe um número crescente de programas que disponibilizam a investigação de casais durante a gestação ou em aconselhamento pré-concepcional (33).

O objetivo dessa triagem é identificar casais em risco de terem filhos afetados pelas formas graves da doença, permitindo opções reprodutivas e o diagnóstico pré-natal.

A frequência de portadores de mutação para FC varia de acordo com a ancestralidade dos indivíduos. Por exemplo, na população norte-americana a frequência de portadores da FC é de 1:25 brancos não hispânicos, 1:58 hispânicos, 1:61 afro-americanos e 1:94 americanos de origem asiática (34).

Nos Estados Unidos é recomendado um painel que identifica as 23 mutações mais comuns na população norte-americana. A taxa de detecção de portadores para FC através deste painel varia de acordo com a origem étnica, sendo 94% em judeus Ashkenazi, 88% em brancos não hispânicos, 72% em hispânicos, 64% em afro-americanos e 49% em americanos de origem asiática (34).

A população brasileira é ainda mais heterogênea do que a norte-americana, e os estudos disponíveis ainda são limitados a alguns estados, não estando estabelecido um painel de mutações próprio. Portanto, a interpretação dos resultados obtidos com a utilização de testes desenvolvidos em outras populações deve ser cautelosa.

### **Investigação de fibrose cística na infertilidade masculina**

As mulheres com FC são usualmente férteis. Já os homens com FC são quase invariavelmente inférteis, por apresentarem agenesia congênita ou hipoplasia dos vasos deferentes (ACVD), o que resulta em azoospermia obstrutiva (2).

Algumas mutações relacionadas a fenótipos mais leves da FC podem resultar em azoospermia obstrutiva por ACVD como única manifestação da doença (35).

Através de técnicas de reprodução assistida, atualmente é possível recuperar espermatozoides através de punção de testículos e oferecer fertilização assistida com técnica de ICSI aos homens com azoospermia obstrutiva (36).

### **ACONSELHAMENTO GENÉTICO NA FIBROSE CÍSTICA**

Aconselhamento genético é o processo de ajudar as pessoas a entender e adaptar-se às implicações médicas, psicológicas e familiares da contribuição da genética à doença. Este processo integra as seguintes etapas: interpretação da história familiar e da história médica para avaliar a possibilidade de ocorrência ou recorrência da doença; educação sobre herança, testes genéticos, manejo, prevenção, recursos disponíveis e pesquisa; aconselhamento para promover escolhas informadas e adaptação ao risco ou à condição (37).

Assim, o processo de AG envolve a confirmação do diagnóstico, estimativa do risco de recorrência, fornecimento de informações sobre a doença e apoio a aceitação do diagnóstico. Incluiu também disponibilizar tratamento quando indicado e apresentar alternativas para a prevenção, como o diagnóstico pré-natal e o diagnóstico pré-implantacional.

A primeira etapa para o aconselhamento genético é a confirmação diagnóstica do indivíduo afetado (38). O diagnóstico de certeza da FC é obtido a partir de manifestações clínicas características e da elevação na concentração de eletrólitos (cloro e sódio) no suor. O diagnóstico pode também ser suscitado a partir de uma triagem neonatal alterada, antes do aparecimento dos sintomas (2).

O padrão de herança da fibrose cística é autossômico recessivo, ou seja, para manifestar a doença os indivíduos afetados devem apresentar uma mutação nos dois alelos do gene da fibrose cística. Portanto ambos os pais de um afetado são portadores (heterozigotos), e o risco de recorrência da FC é de 25% para seus próximos filhos.

O indivíduo com FC pode apresentar a mesma mutação nos dois alelos (homozigoto para determinada mutação) ou mutações diferentes em cada um dos alelos (heterozigoto composto). Os indivíduos saudáveis portadores de mutação em somente um dos alelos são chamados de heterozigotos.

Com o aumento na expectativa de vida dos pacientes com FC, muitas mulheres portadoras da doença tem tido gestações. Já os homens afetados apresentam infertilidade secundária à azoospermia obstrutiva, mas poderão ter filhos como o auxílio de técnicas de reprodução assistida. O risco de um indivíduo com fibrose cística ter filhos afetados depende de seu parceiro – se o parceiro for portador da doença este risco é de 50% (1,36).

A frequência de portadores para a fibrose cística na população em geral é variável de acordo com a origem étnica. Em populações caucasianas, a frequência de heterozigotos varia em torno de 1/25 a 1/30 indivíduos (34).

As principais limitações para o aconselhamento genético na fibrose cística são os casos em que a confirmação clínica permanece incerta, ou os casos em que não é possível a detecção da mutação causadora da doença, o que impede a identificação de outros indivíduos portadores na família, assim como impede o oferecimento de diagnóstico pré-natal (DPN) e diagnóstico genético pré-implantacional (DPI).

#### **DIAGNÓSTICO PRÉ-NATAL (DPN) E O DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-MPLANTACIONAL (DPI) DA FIBROSE CÍSTICA**

Para famílias cuja mutação ou mutações causadoras da FC são conhecidas, é possível oferecer diagnóstico pré-natal e diagnóstico genético pré-implantacional.

O diagnóstico pré-natal (DPN) é realizado através da pesquisa das mutações em tecido fetal. O material fetal para estudo molecular pode ser obtido através da punção de vilosidades coriônicas em torno das 12 semanas de idade gestacional ou através de amniocentese, realizada em torno das 15-16 semanas de gestação. Estes procedimentos são realizados com o auxílio de ultrassom, por um profissional especializado em medicina fetal, e apresentam um risco de perda gestacional entre 0,5 e 1% (39).

O diagnóstico genético pré-implantacional

(DPI), usualmente conhecido pela sigla *PGD* do inglês *Preimplantation Genetic Diagnosis*, consiste em um conjunto de procedimentos e técnicas que permite identificar anormalidades cromossômicas ou doenças gênicas no embrião poucos dias após a concepção realizada por fertilização assistida. Esta técnica começou a ser desenvolvida na Inglaterra a partir de 1989. O primeiro caso de bebê saudável após o DPI para FC foi publicado em 1992 (40). Desde então, muitos estudos publicados relatam o nascimento de bebês normais nascidos após a realização do DPI para diferentes doenças genéticas. No Brasil já existem alguns laboratórios especializados que disponibilizam este exame.

O DPI depende de uma técnica altamente especializada, que necessita de centros experientes e requer a realização de fertilização assistida através da técnica de Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI). No terceiro dia após a fecundação, quando o embrião apresenta 6 a 8 células, uma ou duas células são retiradas; a seguir, é feita a análise molecular para a fibrose cística, e o resultado deverá estar pronto em torno de 24 horas, quando os embriões normais são transferidos para o útero materno. Para cada casal que irá se submeter ao DPI é preciso estabelecer previamente um protocolo de investigação, estudando a mutação e marcadores genéticos que permitam aumentar a precisão do exame (41,42).

No DPI, como somente uma célula é analisada, existe a possibilidade de um resultado falso negativo (exame normal e o bebê afetado pela doença pesquisada). Embora este risco seja relativamente baixo (em torno de 1 a 5 %), posteriormente está indicada a realização de diagnóstico pré-natal para a confirmação do resultado normal (42).

Embora esta técnica ainda seja muito cara e trabalhosa, tem-se tornado uma opção promissora para os casais em risco para doenças genéticas, como a fibrose cística.

#### **CONCLUSÃO**

Um crescente desenvolvimento nas técnicas moleculares nos últimos anos tem contribuído para o diagnóstico das mutações relacionadas à FC nos pacientes e na investigação de portadores.

Existe uma grande variabilidade na frequência da doença e das principais mutações causadoras da FC de acordo com a ancestralidade dos indivíduos.

Considerando a complexidade da informação genética relacionada à FC e as alternativas reprodutivas que estão surgindo, é muito importante a disponibilização do aconselhamento genético para o paciente e sua família.



## REFERÊNCIAS

1. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic Fibrosis. The metabolic and molecular bases of inherited disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. New York: McGraw-Hill; 2001. P. 5121-80.
2. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2009 May 30;373(9678):1891-904. Epub 2009 May 4.
3. Kerem B-S, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TIC, Chakravati A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989; 245:1073-80.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA. *Science*. 1989; 245:1066-73.
5. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*. 1989; 245:1059-65.
6. McCarthy VA, Harris A. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol*. 2005; 40(1):1-8.
7. Guo Y, Su M, McNutt MA, Gu J. Expression and Distribution of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in Neurons of the Human Brain. *J Histochem Cytochem*. 2009; 57(12):1113-20.
8. Li C, Naren AP. Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther*. 2005; 108:208-23.
9. Akabas MH. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem*. 2000; 275(6):3729-32.
10. Guggino WB, Stanton BA. New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:426-36.
11. Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature Rev*. 2006; 440:477-83.
12. Bobadilla JL, Macek Jr. M, Fine JP, Farrell PM. Cystic Fibrosis: A Worldwide Analysis of CFTR Mutations. Correlation With Incidence Data and Application to Screening. *Hum Mut*. 2002; 19:575-606.
13. Rowntree RK, Harris A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann Hum Genet*. 2003;67:471-85.
14. Faucz FR, Souza DAS, Olandoski M, Raskin S. CFTR allelic heterogeneity in Brazil: historical and geographical perspectives and implications for screening and counseling for cystic fibrosis in this country. *J Hum Genet*. 2010;55:71-6.
15. Streit C, Burlamaque-Neto AC, Silva FA, Giugliani R, Saraiva-Pereira ML. CFTR gene: molecular analysis in patients from South Brazil. *Mol Gen Metab*. 2003; 78: 259-64.
16. Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE, Damaceno N, Zatz M. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test*. 2000;4(1): 69-74.
17. Cabello GM, Cabello EH Jr JL, Femande O, Harris A. The 3120 +1G-->A splicing mutation in CFTR is common in Brazilian cystic fibrosis patients. *Hum Biol*. 2001;73(3):403-9.
18. Raskin S, Pereira L, Reis F, Rosario NA, Ludwig N, Valentim L, Phillips JA 3rd, Allito B, Heim RA, Sugarman EA, Probst CM, Faucz F, Culp L. High allelic heterogeneity between Afro-Brazilians and Euro-Brazilians impacts cystic fibrosis genetic testing. *Genet Test*. 2003;7(3):213-8.
19. Araújo FG, Novaes FC, Santos NP, Martins VC, Souza SM, Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(1):11-5.
20. Cabello GM, Cabello PH, Otsuki K, Gombarovits ME, Llerena JC Jr, Fernandes O. Molecular analysis of 23 exons of the CFTR gene in Brazilian patients leads to the finding of rare cystic fibrosis mutations. *Hum Biol*. 2005;77(1):125-35.
21. Moura Costa FM, Santana MA, Lemos AC, Galvão-Castro B, Acosta AX. Low frequency of the deltaAF508 mutation of the CFTR gene in a highly admixed population in Bahia, Brazil. *Hum Biol*. 2007;79(3):293-7.
22. Vidigal PV, Reis FJ, Boson WL, De Marco LA, Brasileiro-Filho G. p.F508del in a heterogeneous cystic fibrosis population from Minas Gerais, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(8):643-7.
23. Perone C, Medeiros GS, del Castillo DM, de Aguiar MJ, Januário JN. Frequency of 8 CFTR gene mutations in cystic fibrosis patients in Minas Gerais, Brazil, diagnosed by neonatal screening. *Braz J Med Biol Res*. 2010;43(2):134-8.
24. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest*. 2007; 117:683-92.
25. Hefferon TW, Broackes-Carter FC, Harris A, Cutting GR. Atypical 5' splice sites cause CFTR exon 9 to be vulnerable to skipping. *Am J Hum Genet*. 2002;71:294-303.
26. Cutting GR. Modifier Genetics: Cystic Fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005; 6:237-60.
27. Accurso FJ, Sontag MK. Gene modifiers in cystic fibrosis. *J Clin Invest*. 2008;118:839-41.
28. Collaco JM, Cutting GR. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2008; 14(6):559-66.

29. Wright FA, Strug LJ, Doshi VK, Commanders CW, Blackman SM, Sun L, et al. Genome-wide association and linkage identify modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis at 11p13 and 20q13.2. *Nature Genet.* 2011; doi:10.1038/ng838.
30. Audrezet M-P, Dabricot A, Le Marechal C, Ferec C: Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn.* 2008;10(5):424-34.
31. Balfour-Lynn IM. Newborn screening for cystic fibrosis: evidence for benefit. *Arch Dis Child.* 2008;93(1):7-10.
32. Tluczek A, Zaleski C, Stachiw-Hietpas D, Modaff P, Adamski CR, Nelson MR, Reiser CA, Ghate S. A tailored approach to family-centered genetic counseling for cystic fibrosis newborn screening: the Wisconsin model. *J Genet Couns.* 2011;20(2):115-28.
33. Culling B, Ogle R. Genetic counselling issues in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2010;11(2): 75-9.
34. American College of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. ACOG Committee Opinion No. 486: Update on carrier screening for cystic fibrosis. *Obstet Gynecol.* 2011;117(4):1028-31.
35. Hussein TM, Zakaria NH, Zahran AM. Clinical, laboratory and genetic assessment of patients with congenital bilateral absent vas deferens. *Andrologia.* 2011;43(1):16-22.
36. Moskowitz SM, Chmiel JF, Sternen DL, Cheng E, Cutting GR. CFTR-Related Disorders. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2001 Mar 26 [updated 2008 Feb 19].
37. Resta R, Biesecker BB, Bennett RL, Blum S, Hahn SE, Strecker MN, Williams JL, National Society of Genetic Counselors' Definition Task Force A new definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force report. *J Genet Couns.* 2006;15(2):77-83.
38. Harper P. *Practical Genetic Counselling.* 5<sup>th</sup> edition. Ed. Butterworth-Heinemann, Cambridge, 2000.
39. Sanseverino MT, Kessler RG, Burin MG, Stein NR, Herman R, Matte U, Barrios PM, Magalhães JA. Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. *Revista HCPA.* 2001(3):301-16.
40. Handyside AH, Lesko JG, Tarín JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1992 24;327(13): 905-9.
41. Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC; European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod.* 2011;26(1):41-6. Epub 2010 Oct 21.
42. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn.* 2010 Jul;30(7):682-95.

Recebido: 20/05/2011

Aceito: 03/07/2011