



## TERAPIA GÊNICA COMO TRATAMENTO PARA FIBROSE CÍSTICA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Milena Roberta Freire da Silva<sup>1</sup>, Emanuella Lacerda Santos<sup>1</sup>, Kátia C. da Silva Felix<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduanda. Aluna do Curso de Biomedicina da Faculdade Sete de Setembro. E-mail: milena.freire@hotmail.com; <sup>1</sup>Graduanda. Aluna do Curso de Biomedicina da Faculdade Sete de Setembro. E-mail: emanuellals16@gmail.com; <sup>2</sup>Bióloga (Doutora em Fitopatologia) Professora do Curso de Biomedicina da Faculdade Sete de Setembro, E-mail: katia.felix@fasete.edu.br

### RESUMO

A fibrose cística (FC) é uma doença genética letal, de herança autossômica recessiva, que acomete mais comumente a raça caucasiana. É uma doença decorrente da mutação do gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), localizado no braço longo do cromossomo 7, responsável por codificar a proteína CFTR, cuja sua principal função é o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação do fluxo de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, e água nos tecidos secretores, devido a este defeito no material genético da célula há uma ausência do funcionamento parcial da proteína, o que gera a formação de um muco espesso favorecendo o processo de obstrução dos ductos. As manifestações clínicas decorrente da FC acometem principalmente o sistema respiratório e gastrointestinal, que decorrente de complicações são os principais responsáveis por levar a morbidade e mortalidade dos portadores desta enfermidade. Devido ao comprometimento patológico que a FC pode causar em seus pacientes, esta doença assume grande importância e o diagnóstico precoce é decisivo para um melhor prognóstico. Porém, o tratamento convencional aplicado para esta patologia não proporciona a cura da mesma. Contudo, novas pesquisas baseadas em técnicas moleculares, especificamente a terapia gênica, tem mostrado-se promissoras. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica de abordagem qualitativa do tipo exploratória. No qual, foram realizadas buscas em bases nacionais e internacionais, Medline, Scientific Electronic Library On-line (SCIELO), Scholar Google (Google Acadêmico), Pubmed e Biblioteca virtual de saúde (Bvs). Consideraram-se elegíveis os estudos nas línguas portuguesa e inglesa. Além de livros, teses e dissertações. Com base na busca de tratamento definitivos para esta patologia, surge a terapia gênica, que tem como objetivo tratar a doença na sua base de origem, utilizando a técnica de DNA recombinante para transferência de cópias corretas do DNA do regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) para as células epiteliais nas vias aéreas, de forma a curar ou corrigir a condição causada por um alelo mutante, através da introdução de uma sequência de DNA. Os ensaios clínicos mais recentes abordam os principais meios de transferência deste material genético, tendo como premissa a abordagem dos defeitos básicos e não as consequências apresentadas pela fibrose cística, direcionando se para a compreensão da função da proteína CFTR. Os principais vetores utilizados para transportar os genes modificados são os vírus, devido a capacidade inata que estes têm de infectar o trato respiratório; já as abordagens não virais consistem em lipossomas catiônicos, nanopartículas de DNA compactadas e o DNA puro, pois ambos são resistentes à degradação da nuclease, melhorando assim as taxas de sucesso da distribuição de genes. Decorrente disto têm se uma maior perspectiva do completo desenvolvimento de uma terapia definitiva para a cura da FC, possibilitando uma maior sobrevida os portadores dessa doença.

**Palavras-chaves:** Terapia Gênica, gene *CFTR* e proteína CFTR.

<sup>1</sup> Graduanda. Aluna do Curso de Biomedicina da Faculdade Sete de Setembro. E-mail: milena.freire@hotmail.com; <sup>1</sup> Graduanda. Aluna do Curso de Biomedicina da Faculdade Sete de Setembro. E-mail: emanuellals16@gmail.com; <sup>2</sup> Bióloga. Doutora em Fitopatologia. Professora do Curso de Biomedicina da Faculdade Sete de Setembro.



## INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC), também denominada mucoviscidose é uma doença hereditária de padrão autossômica recessiva, letal, com maior incidência na raça caucasiana. A doença é decorrente da mutação no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) localizado no braço longo do cromossomo 7 (lócus q31), responsável pela codificação da proteína transmembrana CFTR, na qual, sua principal função é o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvido na regulação do fluxo de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, e água nos tecidos secretores, devido a este defeito no material genético da célula há uma ausência do funcionamento parcial da proteína, o que gera a formação de um muco espesso favorecendo o processo de obstrução dos ductos. Esta obstrução dificulta a passagem das secreções, levando a predisposição dos órgãos contraírem infecções locais e fibrose (LIMA, 2012).

A proteína CFTR está inserida em diversos órgãos, e o seu mau funcionamento desencadeia diversas anormalidades, como: doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência pancreática, íleo meconial, doença obstrutiva do trato biliar, e azoospermia no caso de pacientes do sexo masculino, caracterizando assim uma doença multiorgânica, estas complicações decorrentes da FC são as principais causas de morbidade e mortalidade (CABELLO, 2011).

O diagnóstico precoce da doença vem possibilitando uma maior sobrevida aos portadores dessa patologia, as terapias atuais disponíveis contribuem para a melhoria das obstruções das vias aéreas e reduzir as infecções bacterianas, mas não promovem a cura e a maioria dos afetados vai a óbito devido à gravidade das doenças pulmonares, no entanto, ainda se busca uma terapia curativa para a FC (LIMA, 2012).

Perspectivas de novas terapias como terapia gênica está sendo desenvolvida como um novo tratamento para a FC, que tem como principal objetivo, a utilização de técnicas de DNA recombinante, para transferência de cópias corretas do DNA do regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) para as células epiteliais nas vias, ou seja, alterar a base genética, de forma a curar ou corrigir a condição causada por um alelo mutante, através da introdução de uma sequência de DNA (BURNEY; DAVIES, 2012).

A terapia genica abre perspectivas excitantes como alternativa à terapêutica convencional, tendo como premissa a correção das doenças na sua origem, possibilitando



potencialmente a solução para algumas das doenças hereditárias e adquiridas que acarretam graves consequências ao indivíduo.

Diante da importância dessa patologia, e da necessidade de conhecer sobre novas técnicas de terapia na busca da cura dessa doença, este trabalho tem como objetivo compreender as mutações que ocorrem no gene *CFTR*, e conseqüentemente a regulação da proteína CFTR, assim como e descrever as perspectivas de tratamento por meio de terapia gênica.

## **METODOLOGIA**

Trata-se de uma revisão bibliográfica de abordagem qualitativa do tipo exploratória. A grande importância da pesquisa é a maximização do conhecimento auxiliado por toda uma metodologia, gerando inquietações e uma reflexões diante dos conteúdos abordados, o que permite uma ampla possibilidade de novas descobertas (LAKATOS; MARCONI, 2010).

Em relação aos procedimentos do estudo, foram realizadas buscas nas bases eletrônicas nacionais e internacionais Medline, Scientific Eletronic Library On-line (SCIELO), Scholar Google (Google Acadêmico), Pubmed, Biblioteca virtual de saúde (Bvs), apanhando artigos científicos sobre o tema utilizando as principais palavras-chave: terapia gênica, gene *CFTR* e proteína CFTR. Consideraram-se elegíveis os estudos nas línguas portuguesa e inglesa. Além de livros, teses e dissertações.

## **RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **Fibrose cística**

Fibrose Cística é uma doença de origem genética que apresenta um padrão de herança autossômica recessiva e é expressa em ambos os sexos. É considerada a doença mais frequente em descendentes de Caucasianos da Europa, América do Norte e Austrália (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). A patologia é decorrente de uma mutação, no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), o qual está localizado no braço longo do cromossoma 7. O gene defeituoso, é transferido tanto pelo pai como pela mãe, o qual é responsável pela modificação na condução de íons através das membranas celulares (WELSH; SMITH, 1993).

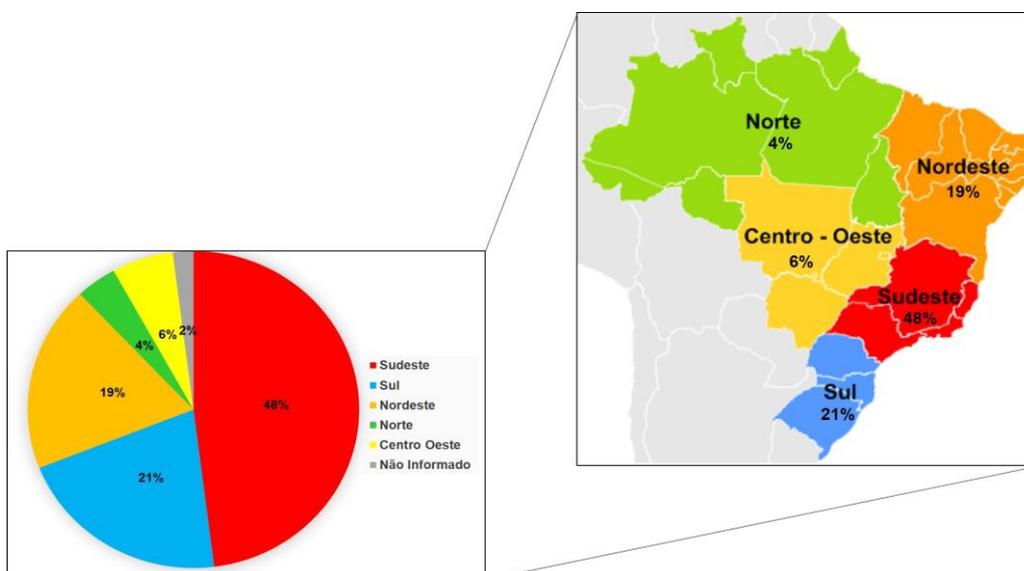
A alteração no gene *CFTR* leva a problemas funcionais da proteína decodificada a



partir desse gene, a qual se situa na membrana apical das células epiteliais de muitos órgãos e que tem como principal função ser um canal de transporte de cloro. A disfunção da proteína CFTR resulta em uma grande variabilidade de sinais e sintomas, sendo acometidos os sistemas respiratório e gastrointestinal. As principais manifestações clínicas da fibrose cística são síndrome de má absorção devido à insuficiência pancreática exócrina, perda excessiva de eletrólitos no suor, doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras. Todas estas comorbidades iniciam se comumente no primeiro ano de vida, levando a um quadro de desnutrição com crescimento pômdero-estatural e amadurecimento ósseo retardado (DORNELAS et al., 2000; FIRMIDA; LOPES, 2011; PIZZIGNACCO; MELLO; LIMA, 2011).

O diagnóstico é solicitado de acordo com o quadro clínico do paciente, o rastreamento da fibrose cística neonatal, é realizado pela Triagem Neonatal (teste do pezinho), sendo este o mais importante para diagnosticar a fibrose cística nos primeiros meses de vida da criança. No entanto, existem outros exames laboratoriais, para que haja a confirmação da patologia, dentre eles estão o teste do suor, exame de sangue, DNA e testes de escarros. É de suma importância que haja um diagnóstico precoce e categórico, para que se possa estabelecer a melhor forma de tratamento (LIMA; ORTEGA; MARSON, 2012).

De acordo com os dados do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC), em 2015 foram registros 587 novos casos. No qual há uma maior prevalência de casos na região sudestes com 48% dos números de pacientes com FC, onde o estado com maior registro é São Paulo (27,2%), seguido das regiões Sul, Nordeste, Centro-Oeste e Norte, respectivamente. O estado da Bahia (11,1%) apresenta a maior registro de FC da região Nordeste (Figura 1) (GBEFC, 2014).



**Figura 1-** Distribuição dos registros por Região brasileira, 2014. Fonte: Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC) (GBEFC, 2014).

### **Mutações no gene *CFTR* e regulação da proteína *CFTR***

O gene da fibrose cística foi descoberto através da análise sequencial do DNA, o mesmo localiza-se no braço longo do cromossomo 7, no locus q31, constituído por 27 éxons e codifica RNAm de 6,5 Kb, que é transcrito em uma proteína transmembrana reguladora do transporte iônico, conhecida como CFTR (LIMA, 2012).

Desde a descoberta deste gene já foram descritas mais de mil mutações relacionadas a este, mas a mutação mais frequente e mais estudada é a F508del, que corresponde à deleção da fenilalanina na posição 508 da CFTR, que é uma proteína composta por 1.480 aminoácidos. Por resultar em importante déficit funcional esta é a mutação considerada mais grave e que apresenta as manifestações clínicas clássicas da doença (FIRMIDA; LOPES, 2011).

As mutações no gene da fibrose cística, são causadas pela presença de dois alelos, provocam ausência de atividade, ou funcionamento parcial da CFTR, provocando assim redução na excreção de cloro, com aumento de eletronegatividade intracelular, resultando em um maior fluxo de sódio para preservar o equilíbrio eletroquímico e secundariamente de água para a célula por ação osmótica (LIMA, 2012).

As mutações do gene CFTR podem ser classificadas em cinco classes funcionais diferentes, de acordo com os mecanismos que interrompem a funcionalidade da proteína, embora a base molecular dos mutantes CFTR ainda sejam complexo. As mutações I, II e III conferem formas clínicas mais graves, já as mutações IV e V conferem as manifestações clínicas mais leves (ROVE; SLOANEA, 2010; ROWE; MILLER; SORSCHER, 2005; SARAIVA-PEREIRA; FITARELLI-KIEHL; SANSEVERINO, 2011).

A classe I corresponde às mutações que afetam a biossíntese, devido não ocorrer à síntese adequada de todo o comprimento da proteína CFTR, ou seja, criar um códon de terminação prematuro (nonsense mutations), pode também deslocar a fase de leitura ou alterar o padrão de *splicing*, inibindo a síntese da proteína estável ou produzindo baixos níveis da proteína madura, esta classe apresenta fenótipo mais graves, pois nenhuma proteína é sintetizada. A classe II são as mutações que afetam a maturação da proteína, ou seja, resultam



na falta de proteínas funcionais na membrana celular, impedindo-a de funcionar como um canal de  $\text{Cl}^-$ . A classe III corresponde às mutações que afetam a regulação do canal de cloreto, as mesmas não respondem à estimulação por cAMP. Já a classe IV afeta a condutância de cloreto, sendo que ambas apresentam transporte de íons reduzido devido à anormalidade no canal de cloreto, todavia, podem apresentar efeitos diferentes sobre os níveis de condutância de cloreto. Por fim a classe V apresenta mutação que altera a quantidade de proteína na membrana, no entanto, a proteína permanece normal, só há uma diminuição na sua quantidade (ROVE; SLOANEA, 2010; SARAIVA-PEREIRA; FITARELLI-KIEHL; SANSEVERINO, 2011).

O gene *CFTR* fornece instruções para a fabricação da proteína CFTR, esta proteína funciona como um canal através da membrana de células que segregam muco, suor, lágrimas, saliva e enzimas digestivas. É um canal de cloreto epitelial que transporta íons cloreto de dentro para fora das células, o que ajuda a manter controlado o movimento de água nos tecidos, o que é necessário para a produção do muco que flui livremente pelos tecidos. A proteína CFTR é central na determinação do transporte trans-epitelial de sal, fluxo de fluido, e as concentrações de íons; cuja sua maior função está no processo de absorção/secreção de cloreto das células epiteliais. A expressão CFTR é restrita a células epiteliais e é encontrada em níveis moderados de pâncreas humano, glândulas salivares, glândulas sudoríparas, intestino e do trato reprodutivo (LIMA, 2012).

Apesar das diferentes categorias de mutação, a anormalidade no gene da FC irá, invariavelmente, provocar um transporte anormal de íons na superfície da célula epitelial e, como consequência, irá causar a desidratação das secreções (BARTH; PITT, 1998).

### **Terapia Gênica no tratamento da Fibrose Cística**

Com o progresso de compreensão da patogênese da fibrose cística, tornou-se mais fácil o desenvolvimento de formas terapêuticas para o tratamento da doença. A terapia gênica tem apresentado-se como forma desses novos tratamentos, onde a mesma consiste na inserção de um ou mais genes manipulados em laboratório, no material genético de células de um doente, de modo a curar uma doença genética (NABAIS, 2015).

A terapia gênica visa abordar os defeitos básicos e não as consequências apresentadas pela fibrose cística, direcionando-se para a compreensão da função da proteína CFTR, onde



tem por objetivo a transferência de cópias do gene *CFTR* normal para as células com desordem no seu funcionamento. Devido ser uma doença multisistêmica o principal alvo a ser tratado são as vias aéreas, pois é mais acessível através de rotas tópica (BURNEY; DAVIES, 2012).

Atualmente, os estudos mostram que os principais vetores utilizados para transportar os genes modificados para as células são os vírus. Estes ligam-se a uma célula hospedeira e transferem o seu material genético para o interior da mesma; são modificados para que no seu interior contenha material genético terapêutico em vez de viral. A capacidade inata que os vírus têm de infectar o trato respiratório fazem deles a escolha inicial para o progresso da terapia gênica (NABAIS, 2015).

Segundo Burney e Davies (2012), diante da necessidade de se conhecer outro método de transferência do material genético saudável para os portadores da fibrose cística, foi desenvolvido uma técnica de terapia gênica que consiste em lipossomas catiônicos, nanopartículas de DNA compactadas e o DNA puro, onde ambas não incluem abordagens virais. Os lipossomas catiônicos consistem em lípidos catiônicos que são normalmente misturados com colesterol e dioleoilfosfatidiletanolamina. Quando combinados com DNA formam partículas de 100-500 nm de diâmetro que podem penetrar nas membranas celulares e entrar nas células. O complexo de DNA e lipossomas é resistente à degradação da nuclease, melhorando assim as taxas de sucesso da distribuição de genes.

Os mais recentes progressos nas estratégias de tratamento estão focados na identificação de métodos que potencializem a atividade da *CFTR*, restaurando sua regulação endógena, o transporte de íons, melhorando desta forma as doenças pulmonares e as demais comorbidades concomitantes apresentada por esta patologia (CABELLO, 2011).

## CONCLUSÃO

A fibrose cística é uma doença multisistêmica, que pode acometer vários órgãos, além de comprometer as funções pulmonares, a etiologia da doença é determinada pela mutação no gene *CFTR*, cuja proteína está envolvida principalmente, no transporte de íons cloreto através das membranas apicais das células epiteliais.

Com a descoberta do gene *CFTR* gerou grande expectativa para o desenvolvimento de terapia curativa da FC, a terapia gênica, que surge como um promissor e abre caminhos para a terapia definitiva, podendo contribuir para a diminuição da morbidade e mortalidade



decorrente principalmente das alterações pulmonares, já que a mesma tem como principal objetivo tratar as vias aéreas.

Essa terapia apresenta uma perspectiva de revolucionar o tratamento da FC, pois a mesma atuará na sua base de origem. No entanto, ainda encontra-se desafios que não estão permitindo explorar todo o potencial de ação que esta técnica tem para oferecer. Os principais desafios decorrem da imprevisibilidade da utilização de vetores virais, devido a fatores como a potencial imunogenicidade e inserção mutagênica. Sobretudo, as alternativas não virais, solucionam algumas dessas limitações, pois possuem uma baixa imunogenicidade e uma grande capacidade de carga de DNA, no caso dos lipossomos catiônicos.

Contudo, ainda existem alguns desafios técnicos e éticos que necessitam ser ultrapassados para que a terapia gênica possa atingir maior adoção, os grandes números de ensaios clínicos continuam avançando, proporcionando desta forma perspectivas animadoras para o futuro.

## REFERÊNCIAS

BARTH, A. L.; PITT, T. L. Microbial pathogens associated with Cystic Fibrosis: Special focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal Infection Disease**, v. 2, n. 2, p. 43-61, 1998.

BURNEY, T. J.; DAVIES, J. C. Gene therapy for the treatment of cystic fibrosis. **The Application of Clinical Genetics**, v. 5, p. 29–36, 2012.

CABELLO, G. M. K. Avanços da Genética na Fibrose Cística, **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 10, n. 11, 2011.

DORNELAS, E. et al. Estudo do quadro pulmonar de pacientes com fibrose cística, **Jornal de Pediatria**, v. 76, n.4, 2000.

FIRMIDA, M. C.; LOPES, A. J. Aspectos Epidemiológicos da Fibrose Cística, **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 10, n. 4, 2011.

LIMA, C. S. P. et al. Mutações do gene *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* e deleções dos genes glutatona S-transferase em pacientes com fibrose cística no Brasil, **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol.38 n.1 São Paulo Jan./Feb. 2012.

LIMA, P. A. V. **Novas estratégias de diagnóstico da fibrose cística**, 2012, 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

MARCONI, M. A; LAKATOS, E. M. **Fundamentos de metodologia científica**, 7º Ed. São Paulo: Atlas, 2010.



NABAIS, A. T. G. **Técnicas de edição de genoma como abordagem promissora na terapia gênica**, 2015, 73 f. Tese (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2015.

PIZZIGNACCO, T. P.; MELLO, D. F.; LIMA, R. G. A experiência da doença na fibrose cística: caminhos para o cuidado integral. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 3, p. 638-44, 2011.

ROWE, S. M.; MILLER, S.; SORSCHER, E. J. Mechanisms of disease Cystic Fibrosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 19, p. 1992-2001, 2005.

SARAIVA-PEREIRA, M. L.; FITARELLI-KIEHL, M.; SANSEVERINO, M. T. V. A genética na fibrose cística. **Revista HCPA**, v. 31, n. 2, p. 160-167, 2011.

SLOANE, P. A.; ROWE, S. M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 6, p. 591-597, 2010.

WELSH, M. J.; SMITH, A. E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. **Cell**, v. 73, n. 7, p. 1251-1254, 1993

