

# **Novas Terapêuticas no Tratamento da Fibrose Quística**

Ana Rita Mateus Loureiro

Mestrado Integrado em Medicina 2012

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Morada: Rua da Cooperativa, nº3, 2480-075 Juncal

E-mail: [anarita.mloureiro@gmail.com](mailto:anarita.mloureiro@gmail.com)

## Resumo

A fibrose quística é uma doença causada por mutações no gene que codifica a proteína *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*, um canal iónico que existe nas células epiteliais de todo o corpo.

A esperança média de vida dos indivíduos com fibrose quística tem vindo a aumentar substancialmente nas últimas décadas devido aos avanços nas várias vertentes terapêuticas. Notáveis progressos na compreensão da patogenia da fibrose quística conduziram a uma série de novas possibilidades terapêuticas. Deste modo, novos tratamentos que visam corrigir o defeito de base no transporte iónico já se encontram em estudo e prometem ser um importante complemento às terapias de suporte já disponíveis para os doentes com fibrose quística.

**Objectivos:** Este artigo aborda os avanços no tratamento sintomático da fibrose quística e o desenvolvimento de terapêuticas destinadas às diferentes classes de mutações. Para além dos avanços na terapia genética, vários novos compostos têm sido descobertos recentemente, os quais se mostram bastante promissores no que diz respeito ao desenvolvimento de fármacos eficazes para corrigir o defeito de base.

**Palavras-chave:** fibrose quística, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), novas terapias, fármacos em desenvolvimento, CFTR correctores, CFTR potenciadores, ENaC.

## **Abstract**

Cystic fibrosis is caused by mutations in the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, an ion channel expressed in epithelial cells throughout the body.

The life expectancy of individuals afflicted by cystic fibrosis has improved substantially in recent decades with advances in all aspects of therapy. Remarkable progress in the understanding of cystic fibrosis pathogenesis has led to a number of therapeutic opportunities in the disease. Thus, new treatments targeting the basic ion transport defect in the disease are now in different stages of development, and promise to complement supportive therapies already available to patients.

**Objectives:** This article discusses the advances in symptomatic treatment of cystic fibrosis and the development of therapeutic approaches aimed at the different classes of basic mutation. Apart from gene therapy, several novel compounds have recently been discovered, which appear promising enough to develop effective drugs to cure the basic defect.

**Keywords:** cystic fibrosis, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), new therapies, drug development, CFTR correctors, CFTR potentiators, ENaC.

## Índice de siglas

**ABC** – *ATP binding cassette* (transportadores de membrana regulados pela ligação ao ATP)

**ACBT** – *Active Cycle of Breathing Technique* (técnica de respiração activa)

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**ATP** – adenosino trifosfato

**CaCC** – *Ca<sup>2+</sup> activated Cl<sup>-</sup> channel* (canal de Cl<sup>-</sup> activado pelo Ca<sup>2+</sup>)

**cAMP** - *cyclic adenosine monophosphate* (adenosina monofosfato cíclica)

**CBAVD** – *Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens* (ausência congénita bilateral dos canais deferentes)

**CFMDB** – *Cystic Fibrosis Mutation Database* (Banco de Dados de Mutações da Fibrose Quística)

**CFTR** - *cystic fibrosis transmembrane regulator*

**CHIP** – *carboxyl terminus of Hsc70- interacting protein*

**Cl<sup>-</sup>** – ião cloreto

**ClCx** – *volume regulated Cl<sup>-</sup> channel* (canal de Cl<sup>-</sup> regulado pelo volume)

**COPII** – proteína do complexo II

**DHA** – *docosahexaenoic acid* (ácido docosahexaenóico)

**DM** – *diabetes mellitus*

**Domínio R** – domínio regulatório

**ENaC** – *epithelial Na<sup>+</sup> channel* (canal epitelial de Na<sup>+</sup>)

**ERAD** – *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation* (sistema de degradação associado ao retículo endoplasmático)

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**FEV<sub>1</sub>** – *forced expiratory volume in the first second* (volume expiratório forçado no 1º segundo)

**FQ** – Fibrose Quística

**HAT** – *hydro-acoustic therapy* (terapia hidro-acústica)

**Hsc70** – *Heat shock cognate protein 70*

**HTS** – *High throughput screening* (triagem de alto rendimento)

**IL-8** – Inter-leucina 8

**LSA** – líquido da superfície aérea

**mRNA** – *messenger ribonucleic acid* (mensageiro do ácido ribonucleico)

**MSD** – *membrane spanning domains* (domínios de expansão de membrana)

**NBD** – *nucleotide binding domain* (domínio de ligação ao nucleotídeo)

**NPD** – *nasal potential difference* (diferença de potencial nasal)

**ORCC** – *outwardly rectifying chloride channels* (canais que rectificam externamente)

**PEP** – pressão expiratória positiva

**PKA** – *Protein kinase A* (proteína quinase dependente de AMPc)

**PKC** – *Protein kinase C* (proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup>)

**PTCs** – *premature termination codons* (codões de terminação prematuros)

**RE** – Reticulo endoplasmático

**rh DNase** – DNase recombinante humana

**rRNA** – RNA ribossômico

**tRNA** – RNA de transferência

**UPS** – *Ubiquitin Proteasome System* (sistema ubiquitina proteossoma)

**UTP** – uridino trifosfato

**VPI** – ventilação percussiva intrapulmonar

# Índice

<i>Resumo</i> .....	2
<i>Abstract</i> .....	3
<i>Índice de siglas</i> .....	4
<i>1 - Introdução</i> .....	8
<i>2 - Material e métodos</i> .....	12
<i>3 - Perspectiva histórica da Fibrose Quística</i> .....	13
<i>4 - Biologia molecular da CFTR</i> .....	15
<i>5 - Síntese e percurso da CFTR normal</i> .....	21
<i>6 - Mutações no Gene CFTR</i> .....	24
6.1 Classe I – defeito na produção proteica.....	27
6.2 Classe II – defeito no processamento e transporte proteico .....	28
6.3 Classe III – defeito na regulação do canal Cl <sup>-</sup> .....	29
6.4 Classe IV – defeito no transporte de Cl <sup>-</sup> .....	30
6.5 Classe V – síntese proteica reduzida.....	31
6.6 Classe VI – estabilidade proteica reduzida .....	31
<i>7 - Correlação genótipo-fenótipo</i> .....	32
<i>8 - Terapêutica actual da Fibrose Quística</i> .....	34
8.1 Antibioterapia.....	35
8.2 Cinesiterapia respiratória.....	38
8.3 Agentes modificadores do muco.....	39
8.4 Broncodilatadores .....	40
8.5 Agentes anti-inflamatórios.....	40
8.6 Oxigenoterapia e ventilação .....	41
8.7 Suporte nutricional.....	42

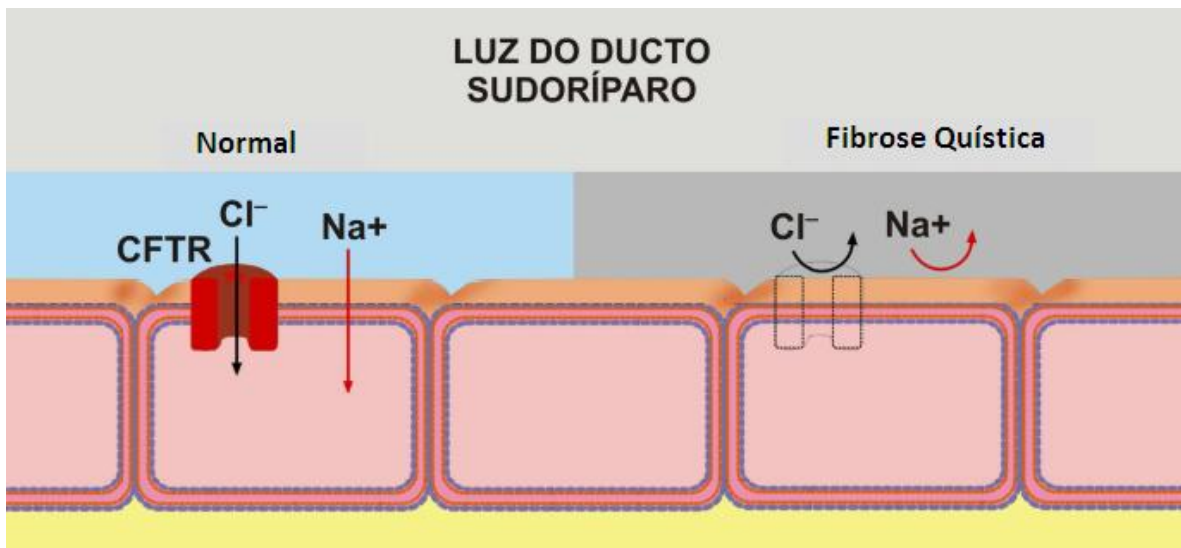
<b>9 - Terapêuticas em estudo.....</b>	<b>44</b>
<b>9.1 Antibioterapia.....</b>	<b>44</b>
<b>9.2 Cinesiterapia respiratória.....</b>	<b>47</b>
<b>9.3 Agentes modificadores do muco.....</b>	<b>48</b>
<b>9.4 Agentes anti-inflamatórios.....</b>	<b>49</b>
<b>9.5 Nutrição.....</b>	<b>52</b>
<b>9.6 Terapias específicas da CFTR.....</b>	<b>53</b>
9.6.1 Terapia genética .....	54
9.6.2 Modeladores da CFTR .....	55
<b>9.7 Terapias que restauram o transporte iônico epitelial independentes do CFTR.....</b>	<b>61</b>
9.7.1 Estimulação da secreção de Cl <sup>-</sup> .....	62
9.7.2 Inibição da absorção de Na <sup>+</sup> .....	64
<b>10 - Conclusão .....</b>	<b>66</b>
<b>11 – Agradecimentos .....</b>	<b>67</b>
<b>12 – Bibliografia.....</b>	<b>68</b>

# 1 - Introdução

A fibrose quística (FQ) é a doença autossómica recessiva mais comum na população caucasiana, sendo que nesta população a mutação está presente em aproximadamente uma em cada vinte cinco pessoas sem predomínio de sexo, a maioria dos quais assintomática (Becq 2010). Estima-se que existam 70 mil pessoas com a doença em todo o mundo (www.cff.org).

A FQ é uma doença multissistémica causada pela mutação do gene que codifica a síntese de uma proteína, a *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), que funciona como um canal de iões cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) expressado nas células epiteliais de diversos órgãos (Kreindler 2010).

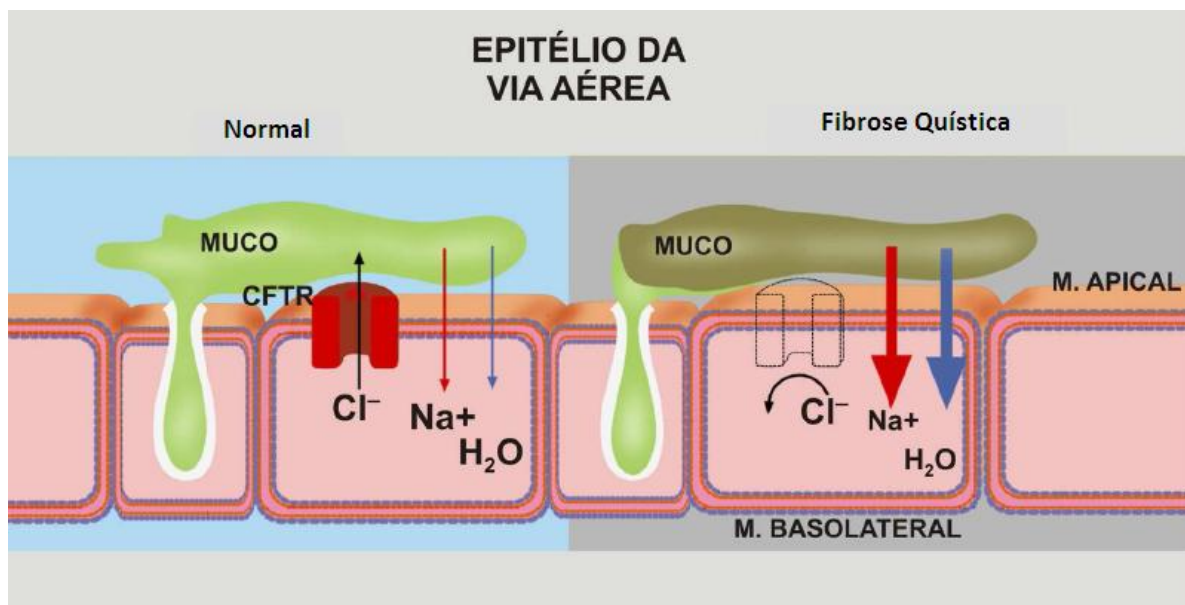
As alterações na expressão e na função da proteína CFTR resultam num anormal transporte de iões e água através dos epitélios dos sistemas gastrointestinal e hepato-biliar, do tracto respiratório, do sistema reprodutivo e das glândulas sudoríparas (Wojewodka, De Sanctis et al. 2011).



**Figura 1** - Desenho esquemático do transporte dos iões  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  no epitélio das glândulas sudoríparas de um indivíduo normal e de um indivíduo com FQ. Modificado de Mishra, Greaves et al., 2005.



Enquanto as glândulas sudoríparas (Figura 1) produzem suor com maiores concentrações de sódio e cloro, nos outros órgãos, como é o caso da via aérea (Figura 2), a proteína CFTR mutada leva a uma diminuição do transporte de cloro para fora da célula e alterações na regulação da absorção de sódio e água, o que conduz a uma produção de secreções viscosas que se acumulam, podendo mesmo chegar a obstruir o lúmen dos órgãos afectados (Mishra, Greaves et al. 2005).



**Figura 2** - Desenho esquemático do transporte dos íons  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  e da água no epitélio respiratório de um indivíduo normal e de um indivíduo com FQ. Modificado de Mishra, Greaves et al., 2005.

Nos pulmões, a desidratação das secreções brônquicas impede o movimento dos cílios das células e conseqüentemente conduz ao comprometimento da *clearance* muco-ciliar, havendo assim acumulação de secreções. Este processo provoca a retenção de agentes microbianos e anti-inflamatórios no muco, levando a inflamação e infecções crônicas com progressiva lesão dos tecidos (Shamseer, Adams et al. 2010). Ao longo da vida do doente são frequentes as infecções respiratórias, eventualmente surgindo insuficiência respiratória e morte (Kreindler 2010).

A nível pancreático, as secreções viscosas provocam obstrução dos ductos e consequente insuficiência exócrina, resultando em má absorção intestinal e malnutrição. É também frequente a insuficiência endócrina, sendo a diabetes *mellitus* (DM) uma complicação importante da FQ (Lin, Sui et al. 2010).

A FQ é uma doença multissistémica pelo que, para além da doença pulmonar progressiva e da disfunção pancreática, os doentes podem também apresentar problemas de motilidade intestinal, atraso de crescimento, infertilidade masculina, cirrose biliar multifocal, osteoporose e défices de ácidos gordos e vitaminas lipossolúveis (Wojewodka, De Sanctis et al. 2011). A tabela 1 mostra, em resumo, as manifestações clínicas mais frequentemente associadas à FQ.

**Tabela 1** – Manifestações clínicas associadas à Fibrose Quística.

<b>Doença sino-pulmonar crónica</b>	Persistente colonização / infecção por agentes típicos da FQ
	Tosse e expectoração crónicas
	Alterações radiológicas persistentes (atelectasias, bronquiectasias, infiltrados e hiperinsuflação)
	Pólipos nasais e alterações radiológicas dos seios perinasais
	Hipocratismo digital
<b>Anormalidades gastrointestinais e nutricionais</b>	<b>Intestinal:</b> íleo meconial, síndrome da obstrução intestinal distal e prolapso retal
	<b>Pancreático:</b> insuficiência pancreática e pancreatite recorrente
	<b>Hepático:</b> doença hepática crónica com evidência clínica ou histológica de cirrose biliar focal ou multilobular
	<b>Nutricional:</b> desnutrição proteico-calórica com hipoproteinémia e edema, complicações secundárias à deficiência de vitaminas lipossolúveis
<b>Alterações electrolíticas</b>	Depleção salina aguda e alcalose metabólica crónica
<b>Anormalidades urogenitais masculinas</b>	Azoospermia obstrutiva (ausência congénita bilateral dos canais deferentes)

Modificado de Dalcin Pde and Abreu, 2008; Damas, Amorim et al., 2008.

Dos doentes com FQ, 93,7% são de raça caucasiana, mencionando a maioria dos autores uma incidência de 1 em cada 2500-3000 nados vivos nesta população. No entanto, existe uma grande variabilidade de acordo com a região geográfica e com o grupo étnico. Nos Estados Unidos, por exemplo, onde a diversidade étnica propicia dados comparativos, a FQ atinge 1 em cada 2500 bebés de raça caucasiana e 1 em cada 17 000 de raça negra, enquanto é rara nos indivíduos asiáticos. Em contrapartida, não existe variação da incidência em função do sexo, afectando rapazes e raparigas de uma forma equitativa ([www.apfq.pt](http://www.apfq.pt)).

Nos Estados Unidos, cerca de 1000 novos casos são diagnosticados cada ano, sendo 70% dos diagnósticos efectuados antes dos dois anos de idade e apenas 10% aos 18 anos ou depois (Shamseer, Adams et al., 2010; [www.cff.org](http://www.cff.org)).

A esperança média de vida dos indivíduos com FQ tem aumentado substancialmente. Há um século atrás, a esperança média de vida à nascença de uma criança com FQ era de um ou dois anos; nos anos sessenta era de cerca de dez anos (Becq 2010). Na década de noventa a esperança média de vida estava nos 28 anos, no ano 2000 era de 32 anos e em 2008 era de 37,4 anos (Plosker 2011). O diagnóstico precoce, a melhoria do estado nutricional global através da administração de suplementos de enzimas pancreáticas e de vitaminas lipossolúveis, o combate ao declínio da função pulmonar através de agentes modificadores do muco, cinesiterapia respiratória, anti-inflamatórios, broncodilatadores, oxigenoterapia e antibioterapia têm contribuído para este aumento esperança média de vida (Wojewodka, De Sanctis et al. 2011). No entanto, as pessoas com FQ continuam a ter uma esperança média de vida reduzida quando comparada com a generalidade da população, sendo as complicações respiratórias responsáveis pela maior parte da mortalidade associada a esta doença (Collawn, Fu et al. 2010).

Desde a descoberta do gene CFTR, em 1989, têm sido encetados numerosos estudos com o objectivo de desenvolver novas terapias direccionadas para o defeito que está na base

da doença. Estas incluem a substituição do gene CFTR através da terapia genética, terapias para corrigir a função da proteína CFTR alterada, melhorando a sua expressão, o seu transporte intracelular ou a sua função, e terapias para restaurar as características do líquido da superfície aérea (LSA), activando canais de  $\text{Cl}^-$  alternativos ou inibindo o excesso de absorção de sódio através dos canais epiteliais de  $\text{Na}^+$ . Assim, as abordagens terapêuticas actualmente em vigor têm sofrido uma grande evolução e aperfeiçoamento ao longo dos últimos anos, e muitas outras novas estratégias de actuação sintomática ainda continuam em estudo (Sloane and Rowe 2010).

Embora muitas destas terapias ainda se encontrem em investigação, existe a esperança de que poderão trazer grandes benefícios a estes doentes, aumentando a sua qualidade de vida e, potencialmente, fornecer uma cura.

## **2 - Material e métodos**

Para a realização deste trabalho de revisão foram consultados artigos científicos publicados e referenciados na Medline/ Pubmed desde 2010 a 2012, e artigos prévios a essa data que pareceram relevantes para os temas em discussão.

### 3 - Perspectiva histórica da Fibrose Quística

A primeira descrição da FQ como uma entidade patológica data de 1938 por Dorothy Andersen, que a intitulou de "fibrose quística do pâncreas" devido a alterações microscópicas precoces do tecido pancreático, sendo esta denominação mais tarde abreviada para fibrose quística. Em 1951, perante uma onda de calor que surgiu nos Estados Unidos, surgiram vários casos de crianças com desidratação e choque, as quais responderam rapidamente a terapêuticas de hidratação. Análises laboratoriais ao sangue aquando da sua chegada ao hospital revelaram baixa concentração de cloro e alta concentração de bicarbonato, situação que reverteu com a terapia. Estes achados confirmavam a hipótese de Kessler e Andersen que dizia que a FQ ultrapassava largamente a doença pancreática, afectando de maneira generalizada as glândulas secretoras, pelo que a denominaram de mucoviscidose (Kreindler 2010).

Em 1953, Paul di Sant Agnese estudou os níveis de electrólitos no suor de doentes com FQ e encontrou teores elevados de cloreto de sódio ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$  acima de 60,0 mEq/L), sendo esta elevada perda de sais responsável pela maior susceptibilidade dos doentes com FQ à desidratação. Mais tarde, em 1959, Gibson e Cooke introduziram o método da iontoforese com pilocarpina para a execução do teste do suor, que é até hoje a técnica de escolha para a realização deste exame laboratorial ([www.apfq.pt](http://www.apfq.pt)).

No início da década de 80, Knowles demonstrou que a diferença de potencial nas vias respiratórias dos pacientes com FQ era significativamente maior que em indivíduos normais e portadores de outras doenças. Em 1983, Quinton estudou a perfusão nos ductos de glândulas sudoríparas isoladas de pacientes com FQ e demonstrou que o aumento da voltagem nesses casos era devido a uma diminuição da permeabilidade ductal ao ião  $\text{Cl}^-$  e uma redução da secreção desse ião em resposta à estimulação adrenérgica (Kreindler 2010).

Tendo por base o conhecimento de que a FQ resultava de uma alteração do transporte do ião  $\text{Cl}^-$ , os investigadores começaram à procura do gene afectado. Em 1985, dois laboratórios diferentes localizaram o gene da FQ no braço longo do cromossoma 7 (Kreindler 2010). A identificação do gene, no entanto, teve lugar somente em Agosto de 1989, quando dois grupos de investigadores, um em Toronto, liderado por Lap Chee Tsui, e outro em Michigan, liderado por Francis Collins, não só identificaram o gene mas também a proteína por ele codificada, que foi designada pelas letras CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) ([www.apfq.pt](http://www.apfq.pt)). Seguiram-se vários estudos e em 1990 chegou-se à conclusão que a proteína CFTR funcionava como um canal iões  $\text{Cl}^-$  e que poderia funcionar como um regulador positivo sobre outros canais de  $\text{Cl}^-$ . Em 1991 descobriu-se que a permeabilidade da proteína CFTR aos aniões requer a sua fosforilação por uma proteína quinase A (PKA) dependente da adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e que esta, por sua vez, é dependente da presença de ATP. Estudos efectuados em 1992 e 1994 concluíram que a proteína CFTR também conduzia  $\text{HCO}_3^-$  (Kreindler 2010).

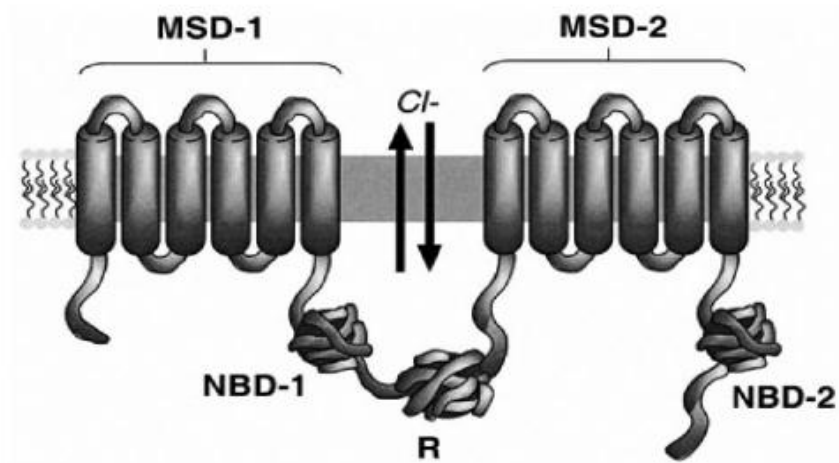
Sendo assim, a CFTR é uma proteína que regula a conductância transmembranar, ou seja, funciona como um canal de iões  $\text{Cl}^-$  mas também regula a actividade de vários outros canais iónicos localizados na membrana apical das células epiteliais de alguns órgãos, especificamente vias biliares, criptas intestinais, pâncreas, aparelho respiratório, aparelho reprodutor, túbulos renais e glândulas sudoríparas ([www.apfq.pt](http://www.apfq.pt)).

## 4 - Biologia molecular da CFTR

A FQ é uma doença genética que resulta de mutações de um gene localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q31.2) composto por 180 mil pares de bases que codifica a proteína CFTR, sendo esta constituída por uma cadeia única de polipeptídeos contendo 1480 aminoácidos com massa molecular de 168,138 Daltons. Como referido anteriormente, a glicoproteína CFTR localiza-se na membrana apical da célula e funciona como um canal de iões  $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$ , afectando o transporte de sódio e água nos epitélios secretores e absorventes. A proteína CFTR faz parte de uma grande família de proteínas membranares chamadas transportadoras de membrana reguladas pela ligação ao ATP (ABC). Estas transportadoras regulam o transporte de pequenas moléculas através da membrana celular. Nos mamíferos, por exemplo, são responsáveis pela resistência das células a fármacos anti-neoplásicos e nas bactérias participam na captação de nutrientes. Tal como as outras transportadoras ABC, a CFTR é formada por dois domínios de ligação a nucleotídeos (NBD) e por dois domínios de expansão de membrana (MSD). No entanto, a CFTR tem características que a tornam única: funciona como um canal iónico onde os iões atravessam a proteína e exibe um domínio regulatório (domínio R) que abre o canal iónico aquando da sua fosforilação pela proteína quinase A (PKA) (Li and Naren 2005; Rogan, Stoltz et al. 2011).

No total, a proteína CFTR é constituída por cinco domínios: dois domínios MSD hidrofóbicos e simétricos, cada um composto por 6 segmentos transmembranares que ancoram a proteína à membrana celular e contribuem para a formação do canal iónico, dois domínios NBD hidrofílicos que são o local de união e hidrólise do ATP e proporcionam a energia necessária para regular a abertura e fecho do canal e o domínio R, uma região citoplasmática que possui vários sítios de fosforilação e que controla a actividade do canal iónico, podendo ter efeitos de activação ou de inibição. Os terminais amino e carboxil são

orientados para o citoplasma da célula e actuam como mediadores de interacção entre a CFTR e uma ampla variedade de proteínas intracelulares (Li and Naren 2005; Kreindler 2010).



**Figura 3** – Esquema da estrutura da proteína CFTR: dois domínios de expansão de membrana (MSD1/2) cada um com seis segmentos transmembranares, dois domínios de ligação a nucleótidos (NBD1/2) e um domínio regulatório R intracelular. Adaptado de Mishra, Greaves et al., 2005.

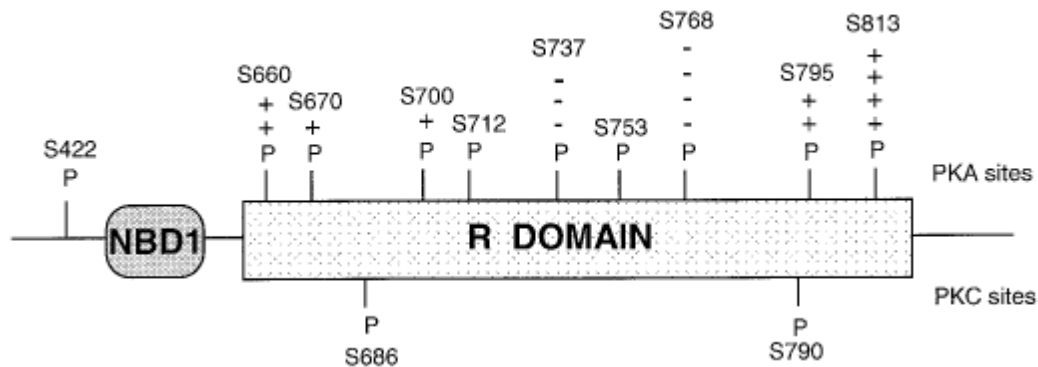
A proteína CFTR possui seis resíduos positivamente carregados (K95, R134, R334, K335, R347 e R1030) dentro dos domínios MSD que são, provavelmente, responsáveis pelo alinhamento do poro. Estes aminoácidos estão conservados através das espécies, sendo que dois deles são sítios de mutações associadas à FQ (R334Q/W e R347C/H/L/P), o que sugere que estes tenham um papel funcional importante (Schwiebert, Benos et al. 1999).

Em ambos os NBD existem sequências de aminoácidos específicas chamadas de Walker A, Walker B e uma sequência chamada sequência LSGGQ (denominada também *signature sequence*). Estas sequências são responsáveis pela ligação e hidrólise do ATP intracelular. A importância dos NBD é realçada pela existência de várias mutações associadas à FQ nestes domínios que originam importantes disfunções do canal (Mishra, Greaves et al. 2005).

O domínio regulatório R contém vários sítios de fosforilação para proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e para a proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup> (PKC), produzindo



a abertura do canal. A fosforilação do domínio R provoca uma alteração na conformação espacial de toda a proteína, estimulando assim a actividade da CFTR. Sabe-se que as variantes da CFTR com sítios de fosforilação mutados apresentam uma actividade extremamente deficitária (Kreindler 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011).



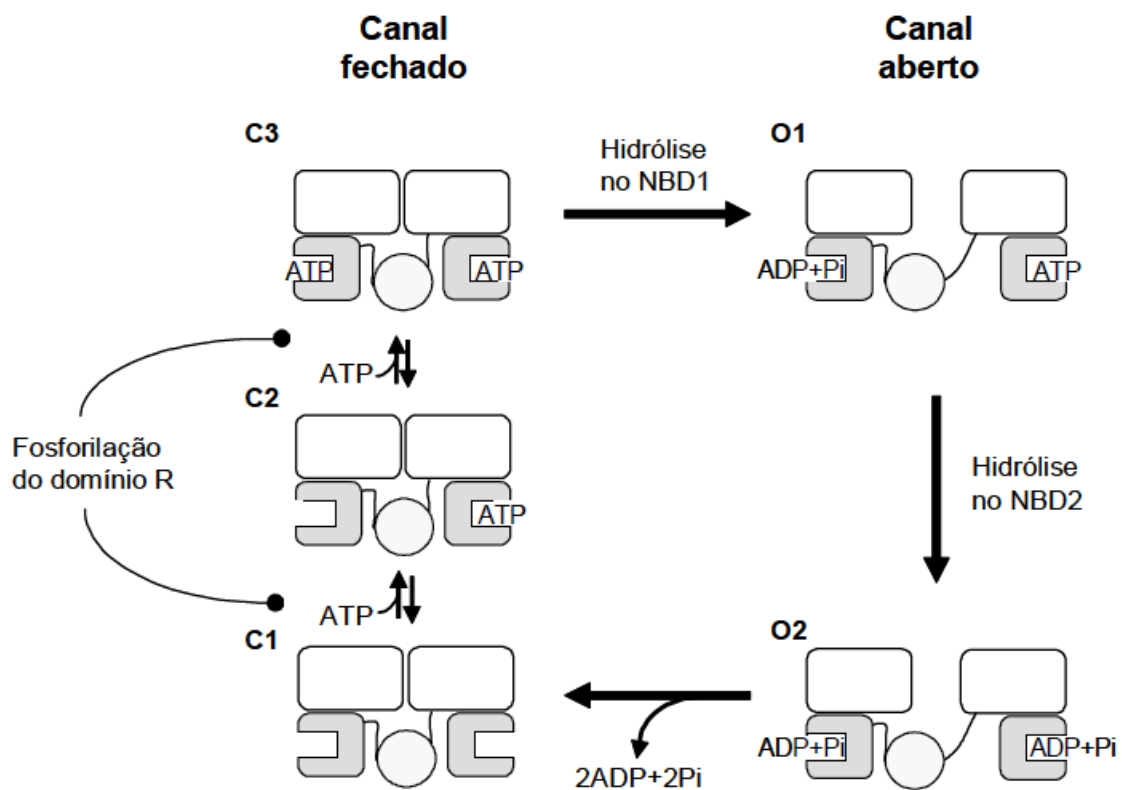
**Figura 4** – Esquema dos sítios de fosforilação da CFTR pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (em cima) e pela proteína quinase dependente de  $Ca^{2+}$  (PKC) (em baixo). Está representada a contribuição de cada sítio para a regulação do canal CFTR, havendo distinção entre sítios de estimulação (+) e sítios de inibição (-).

Adaptado de Gadsby and Nairn, 1999.

Estudos de eletrofisiologia indicam que a proteína CFTR é permeável a alguns aniões. A CFTR mostrou a seguinte sequência de permeabilidade a aniões:  $Br^- \geq Cl^- > I^- > F^-$ . Esta permeabilidade distingue a CFTR de outros canais epiteliais de cloreto, que geralmente têm maior permeabilidade ao  $I^-$  do que ao  $Cl^-$ . Outros investigadores mediram a permeabilidade da CFTR a aniões poliatômicos e obtiveram a seguinte sequência:  $NO_3^- > Cl^- > HCO_3^- > \text{formato} > \text{acetato}$ . A razão da permeabilidade do  $Na^+$  sobre a do  $Cl^-$  ( $P_{Na}/P_{Cl}$ ) encontra-se no intervalo entre 0,1 - 0,03, sugerindo uma actividade significativamente maior para o  $Cl^-$  do que para o  $Na^+$ . Foram encontrados também dados que comprovam a permeabilidade da CFTR à água e ureia (Kreindler 2010).

Como referido anteriormente, a abertura e o fecho da proteína CFTR é fortemente controlada pelo balanço intracelular da proteína quinase e pelos níveis de ATP. A activação da PKA ou PKC causa a fosforilação de múltiplos resíduos de serina no domínio regulador R. Uma vez que o domínio R foi fosforilado, a abertura do canal ocorre em função da hidrólise do ATP nos NBD. Finalmente, o canal retorna ao seu estado inicial quando as fosfatases desfosforilam o domínio R.

Muitos modelos diferentes foram propostos para demonstrar a regulação do canal pela hidrólise do ATP, sendo um deles o proposto por Gadsby & Nairn em 1999. Neste modelo, como pode ser observado na figura 5, quando o canal não está ligado ao ATP permanece fechado (em C1). De seguida, o domínio R é fosforilado pela PKA dependente de cAMP e esta fosforilação permite a ligação do ATP aos NBD, alterando assim a sua conformação (o canal passa de C1 para C2 e C3). Em C3 o canal encontra-se fechado mas a hidrólise do ATP ligado ao NBD1 altera a sua conformação e induz a abertura do canal iónico fazendo com que os aniões passem a favor do gradiente electroquímico através do poro formado pelos domínios transmembranares MSD (C3→O1). Neste momento, o ATP que está ligado ao NBD2 permite a estabilização do canal aberto. De seguida as fosfatases desfosforilam o domínio R, o ATP é hidrolisado pelo NBD2, o ADP+Pi é libertado de ambos os NBD e o canal fechará outra vez. (O1→O2→C1) (Gadsby and Nairn 1999; Rogan, Stoltz et al. 2011).

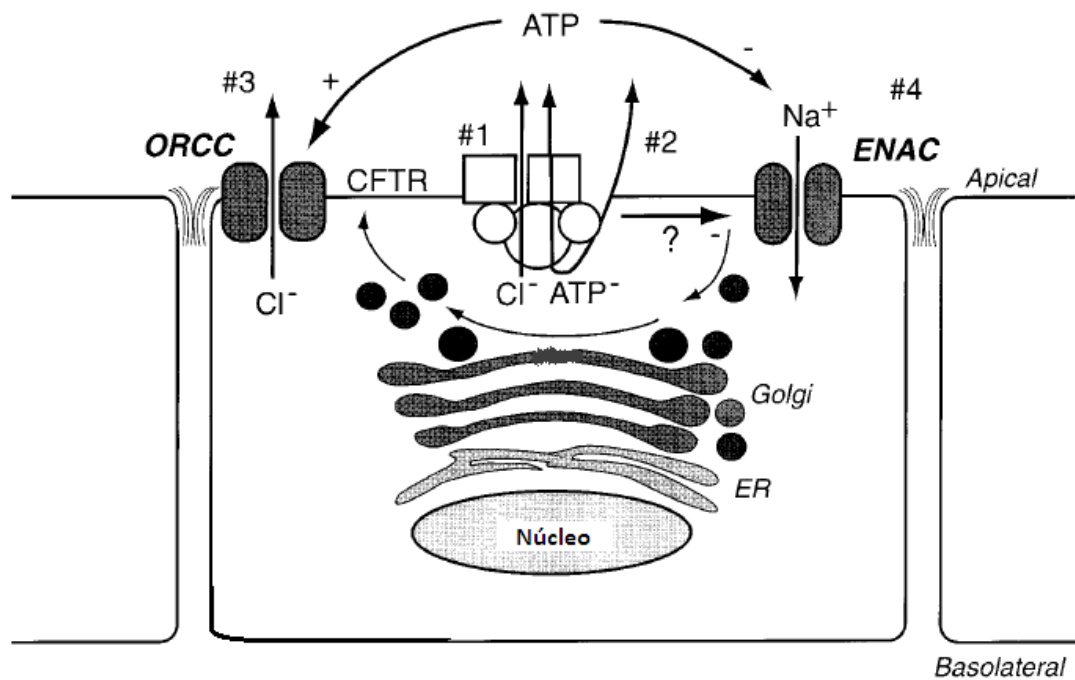


**Figura 5** – Mecanismo proposto para a abertura e fecho do canal CFTR. Modificado de Gadsby and Nairn, 1999.

Além de funcionar como um canal de  $\text{Cl}^-$ , a proteína CFTR também actua como um regulador de condutância, exercendo influências modulatórias sobre outros canais iónicos ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ), sobre o transporte de proteínas e sobre alguns outros processos, como mecanismos de liberação de ATP, regulação da secreção de bicarbonato, produção de óxido nítrico, entre outros. Esta hipótese surgiu após a constatação de que as alterações no transporte iónico observadas no epitélio das vias aéreas de pessoas com FQ não podiam ser explicadas apenas por alterações do transporte de  $\text{Cl}^-$  atribuído ao CFTR (Guggino and Stanton 2006; Sloane and Rowe 2010).

Um tipo de canais regulados pela CFTR são os canais epiteliais de  $\text{Na}^+$  (ENaC). Estes canais são inibidos durante a secreção de  $\text{Cl}^-$  em células que expressam a CFTR, o que sugere que a activação da CFTR inibe os ENaC. Certos estudos sugeriram que a CFTR e os ENaC

interagem directamente por ligação proteína-proteína. Esta interacção entre a CFTR e os ENaC é biologicamente relevante porque a secreção de  $\text{Cl}^-$ , mediada pela CFTR, e a reabsorção de  $\text{Na}^+$ , mediada pelo ENaC, regulam a quantidade de iões e de água nos fluidos das superfícies celulares de alguns órgãos (Sloane and Rowe 2010).



**Figura 6:** Esquema de uma célula epitelial mostrando as múltiplas funções da CFTR: 1) transporte de iões  $\text{Cl}^-$ , 2) libertação de ATP, 3) regulação positiva dos canais de cloreto que rectificam externamente (ORCC), 4) inibição do canal epitelial de  $\text{Na}^+$  (ENaC). ER, retículo endoplasmático. Modificado de Schwiebert, Benos et al., 1999.

A CFTR é capaz de regular uns canais iónicos chamados canais de cloreto que rectificam externamente (ORCC) através de um mecanismo envolvendo a libertação de ATP pela própria CFTR para fora da célula. Uma vez fora da célula, o ATP pode interagir com receptores purinérgicos que, depois de activados, estimulam os ORCC através de segundos mensageiros, aumentando o transporte de  $\text{Cl}^-$ . A fosforilação e a abertura da CFTR estão directamente envolvidas na abertura do canal de ATP associado a esta, sugerindo que mutações que causem mudanças estruturais da CFTR que alteram os mecanismos de abertura

e fecho deste canal têm efeitos semelhantes na via de condução de ATP (Schwiebert, Benos et al. 1999).

A proteína CFTR também pode regular a actividade do canal de potássio. Para além disso, 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 da membrana dependente de cAMP, indicando que mutações na CFTR podem induzir disfunções no sistema nervoso central (Guo, Su et al. 2009).

## **5 - Síntese e percurso da CFTR normal**

O percurso seguido pela glicoproteína CFTR desde a transcrição do gene até à membrana celular leva-a através dos vários compartimentos celulares, onde tem de passar por um rigoroso controlo de qualidade (Rogan, Stoltz et al. 2011).

Dentro do núcleo, o ADN é transcrito em mRNA. O mRNA deixa o núcleo e encontra ribossomas no citoplasma mas principalmente no retículo endoplasmático (RE), os quais interagem com os RNA de transferência (tRNA) carregados de aminoácidos específicos, resultando na tradução de um polipeptídeo. Esse polipeptídeo imaturo com cerca de 140kDa sofre várias glicosilações até se tornar uma proteína madura com aproximadamente 170kDa (Rogan, Stoltz et al. 2011).

A maturação da proteína dentro do RE envolve um processo de dobragem da cadeia polipeptídica, com formação de ligações entre a proteína e a bicamada lipídica do RE. As várias etapas de dobragem são muito falíveis, ocorrendo erros em mais de metade das proteínas CFTR normais. Assim sendo, do total das proteínas CFTR formadas só cerca de 20 a 50% é convertida na forma madura da CFTR. Essa ineficácia na maturação conformacional

da proteína é fruto da complexidade dos seus segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos, os quais por vezes não se ligam correctamente à membrana do RE, o que faz com que a dobragem dos vários domínios não fique correcta. As proteínas mal dobradas são muito menos compactas, o que as torna mais sensíveis à acção das proteases. Neste sentido, qualquer alteração na sequência de aminoácidos que aumente, ainda que de forma subtil, o tempo de permanência da proteína no RE será desastrosa, na medida em que a expõe por mais tempo à acção das proteases e, conseqüentemente, ao controlo de qualidade do retículo endoplasmático (Riordan, Rommens et al. 1989; Rogan, Stoltz et al. 2011).

Após a sua síntese no RE, a CFTR deverá ser transportada até à membrana plasmática para que assuma a sua posição definitiva. As CFTR que não adquirem a sua conformação final, não ultrapassam o controlo de qualidade do RE e são eliminadas pelo sistema de degradação associado ao retículo endoplasmático (ERAD). Este ERAD é formado principalmente pelo sistema ubiquitina proteossoma (UPS) que controla a qualidade do polipeptídeo CFTR após amadurecimento, tanto na membrana do RE como posteriormente no compartimento citoplasmático. Este sistema é composto por enzimas que promovem ligações covalentes entre a proteína defeituosa e a ubiquitina, marcando-a assim para a degradação; a este processo dá-se o nome de ubiquitinação. De seguida, estas proteínas são transferidas para o sistema de degradação proteossoma 26S existente no citoplasma, através da interacção com proteínas específicas dentro do ERAD, como a manose, a manose-like, a Derlin-1 e a Hsc70 (Sloane and Rowe 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011).

As CFTR maduras e completamente glicosiladas são reconhecidas pelo controlo de qualidade do RE, interiorizadas em vesículas do RE e cobertas com uma molécula de ácido diacídico a que se chama proteína do complexo II (COPII), a qual coordena a saída das vesículas do RE. A transferência da proteína CFTR a partir do RE até ao complexo de Golgi

também é coordenada por vários *chaperones* (Hsp70, Hsc70, Hsp90 e HDJ-2) (Riordan, Rommens et al. 1989).

No complexo de Golgi dá-se a conversão final da CFTR numa proteína totalmente glicosilada. Então, formam-se vesículas revestidas por clatrina contendo a proteína CFTR madura que migram para a membrana apical. Uma vez situadas na membrana plasmática, as CFTR vão-se renovando a uma taxa de 10% por minuto, tendo uma semivida de 12 a 24 h. Isto porque na membrana plasmática existe outro controlo de qualidade que serve para eliminar CFTR senescentes ou com um funcionamento incorrecto. Este controlo de qualidade envolve, sequencialmente, o reconhecimento das CFTR pelo *chaperone* Hsc70, a ubiquitinação e, por fim, a reciclagem em endossomas revestidos por clatrina ou a degradação em lisossomas (Rogan, Stoltz et al. 2011).

Existem aminoácidos localizados no NBD1 que são reconhecidos pelo sistema COPII e que levam ao empacotamento da proteína CFTR dentro da vesícula, facilitando a sua exportação. Assim, mutações como a F508del, situada no NBD1, impedem a adequada dobragem e empacotamento da CFTR, aumentando o tempo de permanência da proteína no RE, e reduzem a activação do sistema COPII de exportação, o que leva à sua degradação pelo controlo de qualidade do RE. Por outro lado, quando a CFTR-F508del atinge a membrana plasmática, geralmente apresenta uma semivida mais curta do que a CFTR não mutada, por causa de uma mais rápida reciclagem ou degradação lisossomal (Riordan, Rommens et al. 1989).

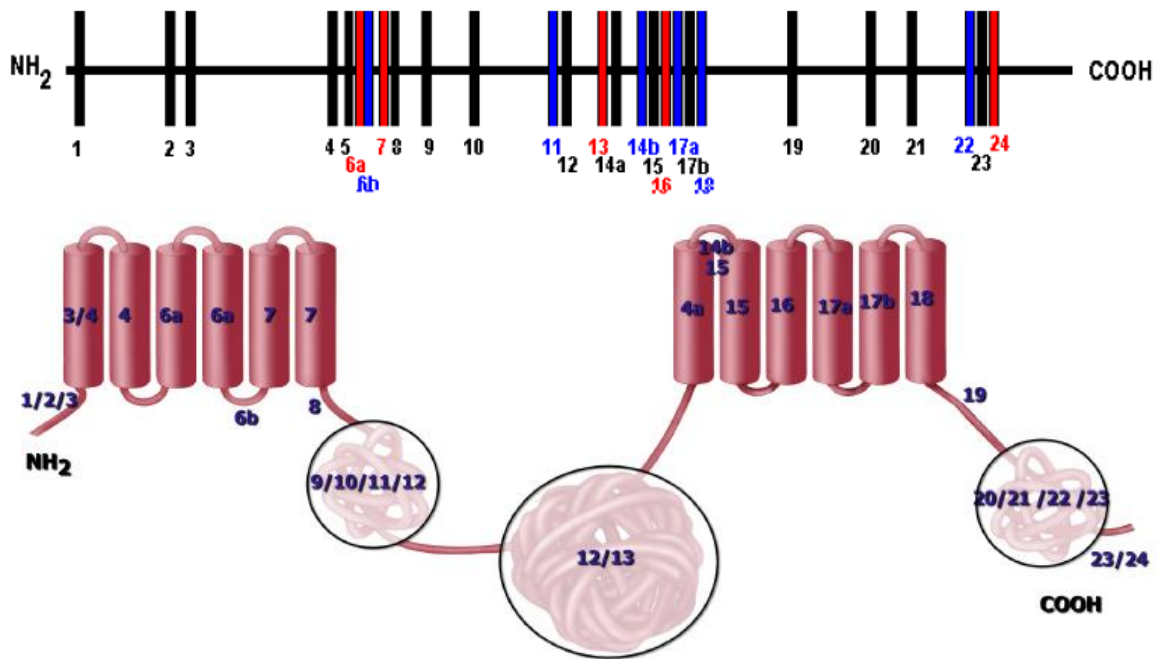
## 6 - Mutações no Gene CFTR

A nível funcional, os efeitos das mutações na actividade do canal de cloreto são consistentes com a natureza recessiva da doença: mutações resultam na redução da função, quantitativa e/ou qualitativamente. Estas mutações podem alterar a função do canal quer indirectamente, interferindo com a formação da estrutura tridimensional nativa do canal, ou mais directamente, interferindo com os processos de activação, abertura e condução (Chmiel and Davis 2003).

Segundo o Banco de Dados de Mutações da Fibrose Quística (CFMDB) existem 1.902 mutações identificadas ao longo do gene CFTR (acesso em 12 de Janeiro de 2012). A maior parte das alterações encontradas envolve um ou poucos nucleotídeos, sendo que 40,38% são mutações que causam a substituição de um aminoácido (*missense*); 15,93% são do tipo que desvia ou altera o quadro de leitura (*frame shift*); 14,14% das mutações causam variações da sequência; 11,88% são do tipo que impede o correcto processamento do mRNA (*splice site*); 8,46% causam a terminação da cadeia (*nonsense*); enquanto as grandes deleções ou inserções representam apenas 2,58% das alterações observadas ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)).

As mutações associadas à FQ não são aleatórias e localizam-se mais frequentemente na primeira metade do gene CFTR, principalmente na primeira região NBD, particularmente nos exões 10 e 11. A primeira região MSD revela um aglomerado de mutações nos exões 4 e 7. Pelo contrário, são raras as mutações encontradas no domínio R e na segunda região MSD. Na segunda região NBF também se verificam diversas mutações, principalmente nos exões 19 e 20 (Castellani, Cuppens et al. 2008).





**Figura 7:** Esquemas que ilustram a organização dos exões que determinam cada um dos domínios da proteína CFTR.

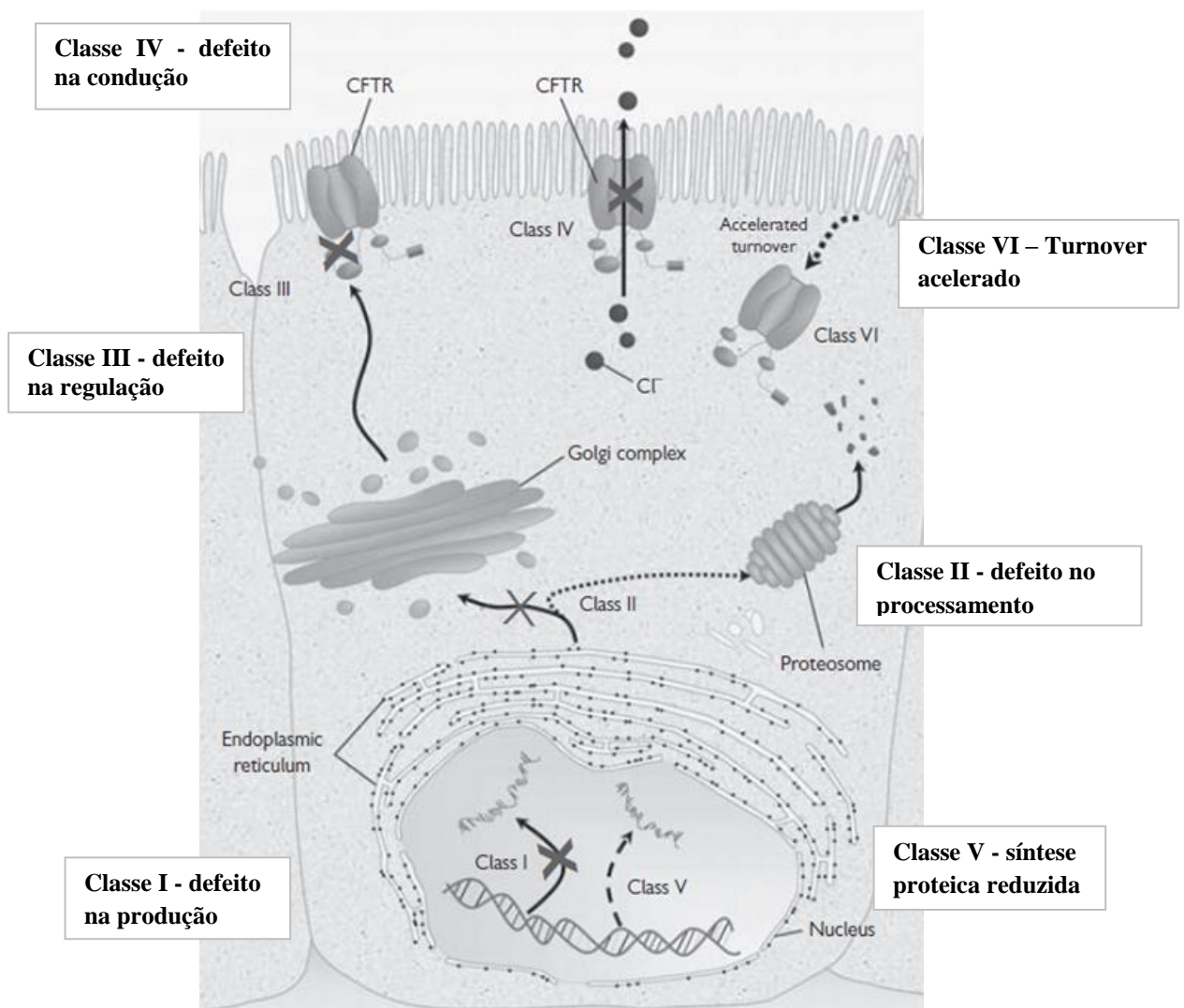
Modificado de Welsh and Smith, 1995.

A mutação F508del, tradicionalmente conhecida como  $\Delta F508$ , é a mais frequente entre os pacientes com FQ e está presente em aproximadamente 66% dos alelos nas estatísticas mundiais. A maioria das restantes mutações no gene CFTR são raras, com apenas quatro (G542X, G551D, N1303K e W1282X) apresentando frequências entre 1% e 3%. De facto, apenas vinte mutações têm uma frequência superior a 0,1% ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)).

A frequência e a distribuição das mutações da proteína CFTR variam de acordo com a origem étnica dos doentes. Por exemplo, a frequência alélica da mutação F508del 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 *nonsense* W1282X em judeus Ashkenazi e a mutação 3120+1G>A em africanos. Essas variações são, provavelmente, devido ao efeito

fundador durante a migração e estabelecimento de alguns grupos em diferentes áreas (Lommatzsch and Aris 2009; Rogan, Stoltz et al. 2011).

As mutações no gene CFTR foram inicialmente subdivididas por Welsh e Smith em 4 classes, de acordo com os seus efeitos na transcrição, no processamento, na concentração e na função da proteína CFTR (Becq 2010). No entanto, devido à existência de fenótipos relacionados com a FQ associados a mutações particulares no CFTR e a propriedades regulatórias do canal, foi feita uma extensão do número de classes para 5 e mais recentemente para 6 (Figura 8). Não obstante, estas classes não são mutuamente exclusivas, e mutações específicas podem ter características de mais do que uma classe (Kreindler 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011).



**Figura 8:** Representação esquemática das diferentes classes de mutações do gene CFTR. Modificado de Rowe, Miller et al., 2005.

## **6.1 Classe I – defeito na produção proteica**

Esta classe inclui as mutações que resultam na diminuição ou ausência de síntese de proteína estável, originando os fenótipos mais severos na FQ, e está presente em aproximadamente 10% dos pacientes (Sloane and Rowe 2010). Podem ser mutações *nonsense* que dão origem à formação de codões de terminação prematuros (PTC) também chamados codões STOP (UAA, UGA ou UAG), mas também mutações *frame shift* ou *splice site* (Becq 2010). Como consequência, são formados transcritos instáveis e/ou proteínas aberrantes possuindo deleções ou novas sequências de aminoácidos. Estas proteínas são frequentemente instáveis e como tal são reconhecidas por *chaperones* no RE e degradadas rapidamente. O resultado final é a ausência de proteína CFTR funcional na membrana plasmática devido à sua anormal produção (Lommatzsch and Aris 2009).

A mutação da classe I mais frequente é G542X (substituição de uma glicina por um codão STOP na posição 542 do exão 11) mas para além desta existe a R553X e a W1282X (particularmente comum nos Judeus Ashkenazi, nos quais representa 75% dos alelos CFTR mutantes). A terminação em X representa uma mutação *nonsense* (Sloane and Rowe 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011).

Esta classe também inclui fenótipos menos graves ou intermédios, que ocorrem devido a alterações do padrão de *splicing*, ou seja, modificação dos sítios de processamento do mRNA, o que resulta na formação de uma proteína anormal (Lommatzsch and Aris 2009; Becq, Mall et al. 2011).

## **6.2 Classe II – defeito no processamento e transporte proteico**

As mutações da classe II (mutações *missense* ou deleção de aminoácidos) resultam no processamento inadequado da proteína CFTR, o que tem como consequência falha no transporte até a membrana celular e ausência da proteína funcionante. Ou seja, a proteína CFTR com a mutação é sintetizada, mas é incapaz de sofrer uma correcta maturação pelo que não é transportada para a membrana celular onde funcionaria como canal de Cl<sup>-</sup> (Castellani, Cuppens et al. 2008).

A principal representante desta classe é a mutação F508del mas também estão incluídas outras mutações. A F508del é uma deleção de 3 pares de bases no exão 10 do gene CFTR que ocasiona a perda da fenilalanina na posição 508 da proteína, que se encontra no domínio NBD1. A isoleucina na posição 507 não é alterada pois ATC e ATT codificam o mesmo aminoácido (Lommatzsch and Aris 2009; Becq, Mall et al. 2011).

**Tabela 2** – Mutação F508del do gene CFTR

<b>Sequência de parte do exão 10 do gene CFTR normal</b>							
<b>ADN</b>	GAA	AAT	ATC	ATC	TTT	GGT	GTT
<b>Aminoácido</b>	Glu	Asn	Ile	Ile	Phe	Gly	Val
<b>Codão</b>	504	505	506	507	508	509	510
<b>Sequência de parte do exão 10 do gene CFTR com a mutação F508del</b>							
<b>ADN</b>	GAA	AAT	ATC	AT-	--T	GGT	GTT
<b>Aminoácido</b>	Glu	Asn	Ile	Ile	---	Gly	Val
<b>Codão</b>	504	505	506	507	508	509	510

Modificado de Lommatzsch and Aris, 2009.

Após a tradução que ocorre no ribossoma, a proteína CFTR sofre uma série de processos de glicosilação e modulação no RE e no complexo de Golgi, tornando possível o seu movimento para a membrana apical das células. As proteínas CFTR incorrectamente processadas são retidas no RE, sendo posteriormente ubiquitiladas e degradadas pelo proteossoma 26S existente no citosol. Como consequência, estas proteínas mutantes não existirão, ou aparecerão em pequena quantidade na superfície celular (devido à maquinaria celular não ser 100% eficiente). A quantidade de proteína mutada que atinge a membrana celular depende dos níveis da proteína CHIP que interacciona com a chaperone Hsc70, conduzindo as proteínas CFTR para a via de ubiquitilação no proteossoma (Amaral 2004). As proteínas CFTR-F508del que conseguem chegar até à membrana plasmática apresentam um fluxo iónico reduzido, sugerindo que a mutação F508del também acarreta uma redução na actividade intrínseca do canal iónico (Sloane and Rowe 2010).

Outra mutação desta classe, a P574H, apresenta um defeito de processamento menos severo que a F508del, e como resultado a proteína alcança o plasma e é funcional (Kreindler 2010).

### **6.3 Classe III – defeito na regulação do canal Cl<sup>-</sup>**

As mutações pertencentes a esta classe levam à produção de uma proteína CFTR que é processada no citoplasma e transportada para a membrana apical das células, mas que, no entanto, é resistente à ligação do ATP, ou, mais raramente, à fosforilação. Até à data, a maioria das mutações descritas nesta classe foram localizadas nas regiões NBD. Como o ATP intracelular regula a abertura do canal CFTR através de interacções directas com os NBD, mutações nestes domínios impedem a ligação e a hidrólise do ATP e assim alteram a função do canal. A abertura do canal CFTR normal ocorre com uma grande frequência e está

intercalada com curtos períodos de fecho, enquanto os canais CFTR mutados raramente abrem. O canal CFTR também é regulado pela fosforilação do domínio regulatório mas mutações neste domínio são mais raras (Lommatzsch and Aris 2009; Becq, Mall et al. 2011).

Algumas mutações desta classe interrompem fortemente a função da CFTR, como a mutação *missense* G551D (alteração de uma glicina para um ácido aspártico no codão 551), e estão associadas aos fenótipos graves da FQ, enquanto outras, como a A455E, causam uma diminuição moderada da função da CFTR e são associadas a fenótipos leves (Lommatzsch and Aris 2009).

#### **6.4 Classe IV – defeito no transporte de Cl<sup>-</sup>**

Esta classe está associada a mutações *missense* nos genes que codificam os domínios transmembranares, afectando assim os aminoácidos localizados no poro do canal e dando origem a um canal CFTR com propriedades de condução deficientes (Kreindler 2010).

Estas proteínas mutadas são processadas e transportadas correctamente, estão presentes na membrana apical e respondem a estímulos, no entanto geram uma condução reduzida. Isto deve-se a uma reduzida taxa de fluxo iónico através do canal aberto (em vez de passarem vários iões Cl<sup>-</sup> passa apenas um). Para além disso, e principalmente para a mutação R117H, a quantidade de tempo que o canal está aberto é também reduzida (Becq, Mall et al. 2011).

Esta classe de mutações está, na maioria dos casos, associada a fenótipos clínicos moderados. Como exemplos temos as mutações no domínio MDS1, onde a arginina é substituída pela histidina no resíduo 117 (R117H), o triptofano na posição 334 (R334W), ou a prolina no 347 (R347P). A mutação D1152H está localizada na ansa intracitoplasmática que

conecta o domínio MSD2 ao domínio NBD2 e reduz significativamente o fluxo de Cl<sup>-</sup> estimulado por cAMP (Lommatzsch and Aris 2009).

### **6.5 Classe V – síntese proteica reduzida**

Este grupo inclui mutações *missense* (por exemplo, a mutação A455E onde há substituição de um ácido glutâmico por uma alanina) e mutações que afectam locais de *splicing* (por exemplo a sequência repetitiva TG e politimidinas no intrão 8 que regulam o *splicing* do exão 9 e 849+10kbC-> T). Estas mutações afectam a maquinaria de transcrição, pelo que há a produção uma reduzida quantidade de proteína CFTR. Assim, na membrana celular existe apenas uma pequena quantidade de canais CFTR, no entanto, os que estão presentes têm uma actividade de condução de Cl<sup>-</sup> normal. Como nestes casos é transcrita uma pequena quantidade de proteína CFTR correcta, é de esperar que o fenótipo seja menos severo (Becq 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011).

### **6.6 Classe VI – estabilidade proteica reduzida**

As mutações desta classe interferem com a estabilidade da proteína CFTR na membrana plasmática apical, conduzindo a uma redução no tempo de permanência. São exemplos as mutações que resultam na ausência dos resíduos 70-98 da extremidade C-terminal da proteína. Apesar da extremidade C-terminal não ser necessária para a biogénese e funcionamento do canal de Cl<sup>-</sup>, esta é indispensável para a manutenção da estabilidade da proteína CFTR glicosilada. A mutação Q1412X (substituição de uma glutamina por um codão STOP na posição 1412) resulta na ausência de 70 aminoácidos na proteína CFTR e provoca insuficiência pancreática e infecções pulmonares recorrentes (Becq 2010; Kreindler 2010).

## 7 - Correlação genótipo-fenótipo

O fenótipo da FQ é altamente heterogéneo, indicando uma complexa contribuição de diferentes factores na determinação da gravidade da doença, como a presença de diferentes tipos de mutações no gene CFTR com diferentes efeitos na proteína, genes modificadores e efeitos ambientais. O atraso no diagnóstico, a disponibilidade e adesão aos tratamentos adequados, a exposição a poluentes ambientais e o tempo de infecção pulmonar são considerados como factores ambientais (Rogan, Stoltz et al. 2011).

As mutações são classificadas como graves ou moderadas, dependendo do prejuízo na função da proteína CFTR e das consequências clínicas. Geralmente, as mutações severas pertencem às classes I, II e III e resultam na ausência de síntese ou bloqueio do processamento da proteína CFTR, pelo que as células epiteliais são impermeáveis ao ião  $\text{Cl}^-$ . As mutações graves estão associadas principalmente a insuficiência pancreática (> 95% dos casos), a um diagnóstico nos primeiros anos de vida (geralmente <1 ano de idade), altos níveis de  $\text{Cl}^-$  no suor (> 80 mEq/l), íleo meconial (~20% dos casos), doença hepatobiliar (3 a 5% dos pacientes), malnutrição e infertilidade masculina. Por outro lado, as mutações moderadas pertencem às classes IV, V e VI e provocam uma redução da síntese ou alteração na condução iónica da proteína CFTR, pelo que estão associadas a um fenótipo mais brando, uma vez que ainda existe algum transporte iónico no canal. São geralmente associadas a suficiência pancreática (70 a 80% dos casos), diagnóstico tardio (geralmente >10 anos), baixos níveis de  $\text{Cl}^-$  no suor, ausência de íleo meconial e doença pulmonar mais ligeira. As mutações das classes IV, V e VI são fenotipicamente dominantes quando ocorrem em associação com as mutações das classes I, II e III (Becq 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011).

O grau de correlação entre o genótipo e o fenótipo da FQ varia muito, mas é bem definido para as manifestações pancreáticas e mal definido para as manifestações pulmonares, provavelmente pelo facto do pulmão ser um órgão que, por estar mais em contacto com o



meio ambiente (ao contrário do pâncreas exócrino que praticamente não sofre influência do meio externo), sofra mais influência deste do que do componente genético (Kreindler 2010).

Pacientes apresentando a mutação A455E, por exemplo, parecem ter uma menor taxa de declínio da função pulmonar, e algumas mutações que afectam o *splicing* foram correlacionadas com um baixo risco de infecção por *P. aeruginosa*. Apesar dessas observações, existe um consenso de que o genótipo é pouco correlacionado com a gravidade da doença pulmonar (Rogan, Stoltz et al. 2011).

Contrariamente, o estado pancreático das pessoas com FQ é altamente relacionado com o genótipo presente. Os pacientes com suficiência pancreática têm pelo menos uma mutação intermediária, enquanto os pacientes com insuficiência pancreática são homozigotos ou heterozigotos compostos por mutações de efeito grave. O genótipo também influencia o transporte iónico através do epitélio intestinal, sendo que a manifestação de íleo meconial parece ocorrer somente em pacientes com insuficiência pancreática, ou seja, com mutações graves. De modo semelhante, pessoas com FQ e com atingimento hepático tendem a apresentar mutações de efeito grave. Quase todos os homens com FQ são inférteis, pelo que se acredita que os canais deferentes são as estruturas do corpo humano mais sensíveis ao genótipo da FQ (Lommatzsch and Aris 2009; Rogan, Stoltz et al. 2011).

Existem doentes com fenótipos parciais de FQ, tais como ausência congénita bilateral dos canais deferentes (CBAVD) e azoospermia obstrutiva, bronquiectasias, aspergilose broncopulmonar alérgica, hipertripsinémia e pancreatite crónica. Estas doenças foram designadas como doenças relacionadas com CFTR (*CFTR related diseases*) e muitas vezes são associadas a mutações mais suaves. Estes doentes expressam sintomas clínicos devido à diminuição da função da CFTR num determinado órgão (canais deferentes, pulmões e pâncreas), não apresentando no entanto, manifestações clínicas nos outros órgãos, e o teste do suor é normal. Por exemplo, até 66% dos pacientes com CBAVD podem ter mutações do

gene CFTR e acredita-se que um único alelo mutado pode determinar uma alteração no canal de Cl<sup>-</sup> no epidídimo e uma possível regressão precoce do ducto mesonéfrico (Vankeerberghen, Cuppens et al. 2002).

## **8 - Terapêutica actual da Fibrose Quística**

O tratamento da FQ tem evoluído de forma colossal ao longo dos últimos anos, e prevê-se que dentro de pouco tempo esteja disponível um tratamento específico para o defeito no canal iónico (Kreindler 2010). Estes constantes avanços na abordagem ao doente com FQ fizeram com que a sobrevida média tenha vindo a aumentar de ano a ano, passando de 1 ou 2 anos há um século para perto de 40 anos nos dias de hoje (Becq 2010).

Actualmente, a terapêutica em vigor consiste no tratamento sintomático e na correcção das disfunções orgânicas. O tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível, deve ser individualizado e contínuo, de forma a retardar a progressão das lesões pulmonares, manter um bom estado nutricional, melhorar a qualidade de vida e aumentar a sobrevivência (Yankaskas, Marshall et al. 2004).

Devido ao seu carácter multissistémico e crónico, o tratamento deve ser realizado em centros de referência e com equipas multidisciplinares (Dalcin Pde and Abreu 2008). Estas equipas devem incluir médicos, enfermeiros, fisioterapeutas com conhecimentos na área da terapia respiratória, nutricionistas e assistentes sociais. O doente deve fazer uma avaliação abrangente com cada membro da equipa no mínimo uma vez por ano. Estas avaliações devem incluir uma análise da adesão à terapia, a identificação de questões psicossociais relevantes, bem como eventuais problemas de saúde (Yankaskas, Marshall et al. 2004).

A FQ é uma doença que afecta diversos órgãos sendo, no entanto, o envolvimento pulmonar a principal causa de morbilidade e mortalidade. Embora o curso natural da doença pulmonar seja a deterioração progressiva, uma abordagem terapêutica adequada pode retardar esta progressão. O regime terapêutico padrão inclui antibioterapia, cinesiterapia respiratória, agentes modificadores do muco, broncodilatadores, agentes anti-inflamatórios, oxigenioterapia e ventilação e suporte nutricional (Dalcin Pde and Abreu 2008).

### **8.1 Antibioterapia**

Os doentes com FQ devem realizar exames bacteriológicos da expectoração, incluindo antibiograma, no mínimo anualmente e de preferência a cada três meses (Damas, Amorim et al. 2008).

As exacerbações pulmonares decorrentes da colonização bacteriana são comuns em doentes com FQ. Os antibióticos específicos são seleccionados com base em culturas da expectoração. A *Pseudomonas aeruginosa* é de longe o organismo patogénico mais comum, afectando 80% dos adultos com FQ (Bals, Hubert et al. 2011). A terapêutica com fluoroquinolonas é muitas vezes usada para as exacerbações ligeiras a moderadas. Para o tratamento das exacerbações pulmonares moderadas a graves são usados dois antibióticos antipseudomonas em combinação, como por exemplo um  $\beta$ -lactâmico com actividade anti-*pseudomonas* e um aminoglicosídeo (geralmente a tobramicina) ou a associação de qualquer um destes dois com a ciprofloxacina (Yankaskas, Marshall et al. 2004).

Nas situações de gravidade ligeira a moderada opta-se pela via oral, associando antibióticos inalados, como a colistina ou a tobramicina não fenólica na solução para inalação (TOBI<sup>®</sup>). Nas situações moderadas a grave deve utilizar-se a via endovenosa, podendo ou não associar-se terapia inalatória (Damas, Amorim et al. 2008).

A terapia antibiótica supressiva crónica, também denominada tratamento de manutenção, destina-se a reduzir de forma sustentada a carga bacteriana, e é frequentemente empregue quando no tratamento das exacerbações pulmonares não se consegue erradicar o microrganismo causador da infecção. O tratamento usado mais frequentemente consiste na inalação de antibióticos, como a colistina ou a tobramicina (Yankaskas, Marshall et al. 2004).

Formulado especificamente para a ser administrado usando o nebulizador PARI LC PLUS reutilizável, a solução de tobramicina para inalação (TOBI<sup>®</sup>) fornece uma dose elevada de tobramicina (um aminoglicosídeo bactericida bastante eficaz contra *Pseudomonas aeruginosa*) aos pulmões dos pacientes com FQ (Cheer, Waugh et al. 2003).

Estudos de fase III demonstraram que o uso da TOBI<sup>®</sup> conduz a uma melhoria na função pulmonar, uma diminuição da densidade da *P. aeruginosa* na expectoração e uma redução no número de dias de hospitalização. As melhorias foram mantidas até 96 semanas nos pacientes que continuaram em estudo. A administração da antibioterapia em aerossol permite obter uma elevada concentração de antibiótico nas vias aéreas e uma baixa concentração sérica, com redução dos efeitos colaterais sistémico (Cheer, Waugh et al. 2003; Yankaskas, Marshall et al. 2004; Damas, Amorim et al. 2008).

Outro estudo demonstrou que quando a TOBI<sup>®</sup> é administrada no início da colonização por *P. aeruginosa*, esta bactéria é frequentemente erradicada. A TOBI<sup>®</sup> mostrou ainda maior eficácia do que colistina no que diz respeito ao FEV<sub>1</sub> em doentes com FQ e infecção crónica por *P. aeruginosa* (Yankaskas, Marshall et al., 2004; Kreindler, 2010; [www.cff.org](http://www.cff.org)).

Uma preocupação significativa no uso de antibioterapia crónica é o surgimento de resistência antimicrobiana. No entanto, ensaios clínicos não demonstraram um aumento na prevalência de organismos resistentes no grupo tratado com TOBI<sup>®</sup> (Yankaskas, Marshall et al. 2004). Mesmo assim, de modo a diminuir o risco de desenvolvimento de resistências,

devem usar-se associações de antibióticos com diferentes mecanismos de acção e diversificar os esquemas terapêuticos (Damas, Amorim et al. 2008).

O aztreonam apresenta actividade contra agentes patogénicos aeróbicos gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa*. Este fármaco liga-se às proteínas de ligação à penicilina de bactérias susceptíveis, o que conduz à inibição da síntese da parede celular bacteriana, seguida por filamentação e lise celular (Plosker 2011).

Em 2007 foram publicados os resultados de um estudo de fase III em pacientes com FQ infectados por *P. aeruginosa* que receberam um tratamento de 28 dias de aztreonam (na forma de lisina) inalado, os quais apresentaram melhoria significativa na função pulmonar e diminuição da densidade das bactérias na expectoração. Estes doentes também conseguiram passar longos períodos de tempo sem necessidade de usar qualquer outro tipo de antibióticos, não se tendo evidenciado neste estudo efeitos colaterais de relevo. Noutra estudo foi demonstrado não haver uma redução da susceptibilidade da bactéria ao fármaco mesmo após 18 meses de tratamento (Plosker 2011).

Com o nome comercial de Cayston<sup>®</sup>, o aztreonam (na forma de lisina) para inalação foi lançado no mercado em Março de 2010 dirigido para as pessoas cronicamente infectadas com *P. aeruginosa*, as quais frequentemente desenvolvem resistências aos antibióticos existentes (Plosker 2011). O Cayston<sup>®</sup> é administrado com o sistema nebulizador Altera<sup>®</sup>, o qual permite que os doentes tomem o medicamento em menos de cinco minutos e proporciona uma dose 4 a 5 vezes mais eficaz do que o nebulizador a jacto existente ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

É importante ter em conta que os microrganismos responsáveis pelas exacerbações pulmonares podem ser diferentes conforme a idade do doente, sendo que nos mais jovens se isolam mais frequentemente *S. aureus* ou *H. influenza*, o que condiciona a escolha da antibioterapia. A flucloxacilina é considerada o fármaco mais indicado numa abordagem

inicial da infecção por *S. aureus*, estando também indicadas outras cefalosporinas ou penicilinas semi-sintéticas (Damas, Amorim et al. 2008).

## **8.2 Cinesiterapia respiratória**

Existe uma grande variedade de técnicas de *clearence* das vias aéreas, as quais têm por objectivo reduzir as infecções e melhorar a função pulmonar (Jarad, Powell et al., 2010; [www.cff.org](http://www.cff.org)).

A técnica mais convencional consiste na drenagem postural com fisioterapia respiratória, na qual se efectua a percussão torácica em diferentes posições de forma a facilitar a remoção das secreções por acção da gravidade. Apesar dos evidentes benefícios, esta técnica pode estar associada a hipóxia e a refluxo gastroesofágico. Além disso, é fisicamente exigente e demorada, tanto para o paciente como para o terapeuta, resultando numa baixa adesão (Yankaskas, Marshall et al. 2004; Kreindler 2010).

À medida que os doentes crescem e se tornam mais independentes, procuram métodos que possam ser realizadas sem assistência. Várias modalidades alternativas têm sido desenvolvidas, incluindo a terapia com pressão expiratória positiva (PEP), onde a entrada de ar nos pulmões mantém as vias aéreas abertas, seguindo-se uma expiração contra resistência, e a terapia com pressão expiratória positiva oscilante (PEP oscilante) na qual a pessoa respira através de um dispositivo que provoca vibrações nas vias aéreas, soltando assim o muco. Existem vários tipos de dispositivos de PEP oscilante, tais como o Flutter<sup>TM</sup>, Acapella<sup>TM</sup>, Cornet<sup>TM</sup> e a ventilação percussiva intrapulmonar (VPI). Existe também o sistema de oscilação da parede torácica de alta frequência, também chamado de colete *Vest*, que produz vibrações transmitidas ao tórax. A técnica de respiração activa (ACBT) envolve um conjunto de exercícios de relaxamento, de expansão torácica e expiração forçada e a drenagem

autogénica usa diferentes tipos de fluxos de ar para remover o muco (Yankaskas, Marshall et al., 2004; www.cff.org).

Associado ao recurso à cinesiterapia, o uso de broncodilatadores, soluções salinas hipertónicas e agentes modificadores do muco parecem otimizar os resultados obtidos. Também os antibióticos inalados são úteis, e devem ser administrados depois da cinesiterapia, quando as vias aéreas estão abertas (Jarad, Powell et al., 2010; www.cff.org)

Caso o doente tolere, deve ser encorajado a praticar exercício físico, como por exemplo marcha, natação ou ciclismo (Damas, Amorim et al. 2008).

### **8.3 Agentes modificadores do muco**

Na FQ há um aumento da viscosidade das secreções devido à redução do teor em água, mas também devido à libertação do ADN dos neutrófilos que sofreram lise. Com base nesta informação recorre-se ao uso de dornase alfa, uma DNase recombinante humana (rh DNase) de nome comercial Pulmozyme<sup>®</sup> que degrada o ADN presente nas secreções, reduzindo assim a viscosidade das mesmas (Kreindler 2010). A utilização de rh DNase está associada a uma diminuição do número de exacerbações e hospitalizações e a melhoria da função pulmonar (Yankaskas, Marshall et al., 2004; www.cff.org).

A ideia da terapêutica inalatória com soro hipertónico surgiu quando surfistas australianos que sofriam de FQ referiram que sentiam melhorias nas suas vias aéreas após a exposição à brisa do mar. Isto porque as soluções hipertónicas actuam como um agente osmótico que impede a depleção do LSA (Kreindler 2010).

Estudos em doentes com FQ e com mais de 6 anos de idade demonstraram que nebulizações com soro hipertónico, precedidas por broncodilatadores, são uma terapêutica segura e eficaz nestes doentes, aumentando a *clearance* mucociliar e promovendo uma

melhoria da função pulmonar. Um estudo clínico adicional para determinar a segurança e eficácia em lactentes e crianças com menos de 4 anos de idade será concluído no final de 2011 (Damas, Amorim et al., 2008; [www.cff.org](http://www.cff.org)).

#### **8.4 Broncodilatadores**

A hiperreactividade brônquica é bastante frequente em pacientes com FQ, ocorrendo em aproximadamente metade desta população. Assim, os broncodilatadores inalados têm sido utilizados como parte integrante do tratamento base da FQ, sendo os agonistas beta os mais frequentemente usados. Muitas vezes são empregues antes da cinesiterapia respiratória para facilitar a limpeza das vias aéreas, apresentando a maioria dos pacientes melhoria da função pulmonar (Yankaskas, Marshall et al. 2004).

Várias acções lhes têm sido atribuídas, incluindo o relaxamento da musculatura lisa brônquica, o aumento da *clearence* mucociliar, efeitos directos sobre as células inflamatórias, alterações na aderência bacteriana e, possivelmente, efeitos na função do CFTR (Damas, Amorim et al. 2008).

#### **8.5 Agentes anti-inflamatórios**

A busca de uma estratégia anti-inflamatória que impeça a progressão do processo fisiopatológico na FQ tem sido alvo de numerosos estudos. Apesar desses esforços, ainda não foi identificada uma droga que seja eficaz e totalmente segura.

Apesar dos corticosteróides orais parecerem retardar a progressão da doença pulmonar, os benefícios são contrabalançados pelos efeitos adversos. Por esta razão não está indicada a corticoterapia oral a longo prazo (Kreindler 2010).



Os corticosteróides inalados também têm sido estudados na FQ, com o objectivo de reduzir o processo inflamatório e diminuir a lesão pulmonar. No entanto, as evidências actuais são insuficientes e mais estudos com dados a longo prazo serão necessários antes desta terapia poder ser recomendada (Dalcin Pde and Abreu 2008).

Doses elevadas de ibuprofeno foram estudadas em pacientes com FQ, evidenciando redução na taxa de declínio da função pulmonar, redução no número de hospitalizações e melhoria no estado nutricional. Estas melhorias foram mais pronunciadas em doentes com menos de 13 anos (www.cff.org). No entanto, em tais doses, o ibuprofeno também duplicou a incidência de insuficiência renal e hemorragia gastrointestinal. Há também a necessidade de monitorizar os níveis séricos do fármaco. Deste modo, os riscos potenciais devem ser cuidadosamente ponderados antes de se decidir optar por este tratamento, embora existam autores que defendem que os benefícios são superiores aos riscos (Kreindler 2010).

O montelucaste reduz a inflamação eosinofílica mas dada a escassez de dados em pacientes com FQ, não pode ser recomendado neste momento (Yankaskas, Marshall et al. 2004).

## **8.6 Oxigenoterapia e ventilação**

A necessidade de recorrer a suporte ventilatório (quer por técnicas invasivas ou não invasivas) é uma opção a considerar em doentes com FQ e com insuficiência respiratória. O recurso a oxigenoterapia de longa duração deve ser ponderada quando a  $pO_2$  é inferior a 55mmHg ou a saturação periférica de  $O_2$  é inferior a 88%. O objectivo essencial visa reduzir a hipóxia e, com isso, diminuir o risco de hipertensão pulmonar e *cor pulmonale*, os quais agravam o prognóstico e modificam a abordagem no que respeita ao transplante pulmonar. Nos doentes com dessaturação nocturna (valores de Sat  $O_2$  inferiores a 88% por um período

superior a 10% do total de tempo avaliado) ou dessaturação durante o exercício (valores de Sat O<sub>2</sub> inferiores a 88%), a oxigenoterapia também deve ser considerada (Yankaskas, Marshall et al., 2004).

Um artigo de revisão publicado em 2009 teve como objectivo avaliar o impacto da oxigenoterapia na sobrevida e na qualidade de vida dos doentes com FQ. Concluíram que não existiam estudos sobre a utilização crónica da oxigenoterapia em doentes com FQ e doença pulmonar avançada. Os estudos sobre a oxigenoterapia a curto prazo relatavam uma melhor oxigenação durante o sono e exercício, e uma menor abstinência na escola ou no trabalho. No entanto, de referir a necessidade de ensaios clínicos para avaliar os benefícios da oxigenoterapia a longo prazo administrada continuamente ou durante o exercício e/ou sono (Elphick and Mallory, 2009).

## **8.7 Suporte nutricional**

Um objectivo crucial da terapêutica da FQ é a manutenção de um estado nutricional adequado, pelo que uma dieta rica em gorduras, hipercalórica e com suplementos vitamínicos e enzimas pancreáticas é habitualmente estabelecida (Kreindler 2010). A recomendação inclui uma dieta com 35 a 40% das calorías provenientes de gordura, sendo que podem necessitar de 120 a 150% das necessidades calóricas diárias estimadas. O objectivo é manter um índice de massa corporal entre 20-25 kg/m<sup>2</sup> (Yankaskas, Marshall et al. 2004).

A prevalência de diabetes *mellitus* e intolerância à glicose aumenta com a idade. O acompanhamento regular através de testes de tolerância oral à glicose permitem a intervenção precoce com insulina (Kreindler 2010).

O tratamento da insuficiência pancreática exócrina consiste na administração oral de enzimas pancreáticas aquando das refeições. Recomenda-se para crianças com mais de 4 anos

e adultos 500 U de lipase/kg antes das principais refeições, até ao máximo de 2500 U/kg (Damas, Amorim et al. 2008).

Suplementos de enzimas digestivas têm sido preparados a partir de pâncreas de suínos. A FDA (*Food and Drug Administration*) tem exigido testes clínicos a fim de aprovar esses suplementos. Zenpep<sup>®</sup>, Creon<sup>®</sup> e Pancreaze<sup>®</sup> obtiveram aprovação da FDA e estão agora disponíveis para pessoas com FQ ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

Pacientes com insuficiência pancreática estão predispostos à má absorção das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K. A suplementação dessas vitaminas é uma recomendação de rotina (Yankaskas, Marshall et al. 2004; Damas, Amorim et al. 2008).

Um suplemento nutricional específico para pessoas com FQ que já se encontra disponível no mercado, de nome AquADEKs<sup>®</sup>, facilita a absorção de vitaminas e nutrientes lipossolúveis através de uma tecnologia de absorção em microesferas. Este sistema permite que as vitaminas e os nutrientes lipofílicos sejam colocados dentro esferas hidrofílicas, facilitando assim o seu transporte e absorção ([www.yasoo-products.com](http://www.yasoo-products.com)). Um ensaio clínico publicado em 2008 relatou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de vitaminas lipossolúveis e uma redução da inflamação nas vias aéreas de pacientes com FQ que tomaram AquADEKs<sup>®</sup>. Noutro estudo, concluiu-se que AquADEKs<sup>®</sup> contribuiu para o aumento dos níveis sistémicos de antioxidantes e para uma melhoria nos parâmetros de crescimento ([www.cff.org](http://www.cff.org); [www.yasoo-products.com](http://www.yasoo-products.com)).

## 9 - Terapêuticas em estudo

### 9.1 Antibioterapia

Actualmente, os únicos antibióticos em aerossol aprovados para o tratamento de infecções pulmonares crónicas por *P. aeruginosa* em pacientes com FQ são as soluções para inalação. No entanto, estes fármacos apresentam prolongados tempos de administração e limpeza, elevado número de administrações diárias e mecanismos nebulizadores complicados. Como tal, novas formulações de antibióticos têm vindo a ser testadas. Um exemplo é a tobramicina em pó para inalação (*TIP – Tobramycin Inhalation Powder*) concebida com o objectivo de melhorar a eficácia e reduzir o tempo de distribuição do fármaco nas vias aéreas, e, por outro, lado aumentar a comodidade para doentes com FQ infectados com *P. aeruginosa*. O revestimento lipídico das partículas de tobramicina em pó resultou numa tendência reduzida para aglomeração e em valores elevados de fracção fina de partículas, melhorando assim a deposição de fármaco. O baixo teor de excipientes desta formulação tem a vantagem de fornecer maiores concentrações de antibiótico directamente para o local da infecção, enquanto minimiza a exposição sistémica (112 mg de TIP produz o mesmo efeito que 300 mg de TOBI<sup>®</sup> em menos de um terço do tempo) (Bals, Hubert et al. 2011; Geller, Weers et al. 2011).

Um estudo publicado em 2011 foi concebido para avaliar a eficácia, a segurança e a conveniência da TIP versus TOBI<sup>®</sup> em doentes com idade igual ou superior a 6 anos infectados com *P. aeruginosa*. Concluiu-se que a TIP tem um perfil de segurança e eficácia comparável com a TOBI<sup>®</sup>, oferecendo no entanto uma opção de tratamento muito mais conveniente para os doentes, podendo melhorar a adesão ao tratamento e resultados terapêuticos (Konstan, Flume et al. 2011).

A levofloxacina é um potente antibiótico contra a *P. aeruginosa* e como tal foi proposto que uma formulação inalada do antibiótico poderia ser útil contra infecções pulmonares causadas por vários tipos de bactérias. Um estudo publicado em 2011 pretendeu avaliar a eficácia e a segurança de uma formulação em aerossol de levofloxacina num conjunto de doentes com FQ fortemente infectados com *P. aeruginosa*. Concluíram que a levofloxacina inalada propiciou uma redução de *P. aeruginosa* na expectoração dos doentes infectados, uma melhoria na função pulmonar com aumento do FEV<sub>1</sub>, uma redução significativa (61-79%) na necessidade de outros antibióticos e que foi bem tolerada pelos doentes (Geller, Flume et al. 2011).

Um estudo publicado em 2010 avaliou as actividades *in vitro* da levofloxacina, da ciprofloxacina, da tobramicina, da amicacina e do aztreonam contra *P. aeruginosa* e outras bactérias frequentemente isoladas nos doentes com FQ. A levofloxacina foi o antibiótico mais potente contra todas as bactérias testadas e o que actuou mais rapidamente contra a *P. aeruginosa*. A levofloxacina foi mais potente que os aminoglicosídeos e que o aztreonam contra biofilmes de *P. aeruginosa*, uma vez que a levofloxacina mantém actividade contra esta bactéria em áreas de baixa tensão de oxigénio, como as encontradas nas espessas camadas de muco presentes nos pulmões dos doentes com FQ. Os resultados do estudo permitem concluir que concentrações elevadas de levofloxacina que chegam rapidamente ao pulmão após a utilização do aerossol podem ser úteis para o tratamento de infecções pulmonares em doentes com FQ (King, Lomovskaya et al. 2010).

O muco anormal presente nas vias aéreas dos doentes com FQ representa uma barreira contra a eficaz entrega de fármacos por via inalatória. Surgiu então a hipótese de que o soro hipertónico, o manitol ou uma DNase pudessem servir como transportadores de antibióticos inaláveis, melhorando a sua penetração no muco e aumentando assim o seu efeito terapêutico (Yang, Tsifansky et al. 2011).

Um estudo publicado em 2010 teve como objectivo avaliar o efeito terapêutico de micropartículas contendo manitol (um açúcar com características osmóticas) e ciprofloxacina (uma fluoroquinolona antibacteriana) em pó seco para inalação (produzido por secagem de um pulverizado de solução aquosa com ciprofloxacina e manitol). Concluiu-se que a combinação de manitol e ciprofloxacina em pó seco para inalação foi significativamente mais eficaz na eliminação de *P. aeruginosa* do que a ciprofloxacina sozinha ou com outras combinações. A eficácia antibacteriana da combinação é atribuível ao aumento do conteúdo de água no muco, o que facilita a penetração do antibiótico e o tratamento de infecção local (Adi, Young et al. 2010).

Um outro estudo de 2010 concluiu que a combinação de antibióticos e de DNase, usando um sistema de partículas inaláveis, pode ser uma estratégia promissora para a terapia local antipseudomonas nos doentes com FQ (Yang, Tsifansky et al. 2010).

A amicacina lipossómica para inalação (Arikace™) consiste na introdução do antibiótico dentro de bolhas microscópicas chamadas lipossomas. Pensa-se que deste modo o antibiótico penetra mais facilmente no muco e permanece mais tempo, aumentando assim a eficácia no combate à *P. aeruginosa*. A Arikace™ é administrada através do nebulizador electrónico Pari eFlow®.

Em 2008 um grupo de investigadores avaliou a amicacina lipossómica para inalação no que diz respeito à sua penetração nas secreções, ao mecanismo de libertação e à actividade antimicrobiana. Observaram que o antibiótico na forma lipossómica foi libertado de uma forma lenta e sustentada nos pulmões e que teve uma eficácia superior comparando com o antibiótico livre (Meers, Neville et al. 2008). Estudos recentes de fase II em pessoas com FQ colonizadas por *P. aeruginosa* mostraram melhoria da função pulmonar, redução da densidade de bactérias e aumento do tempo até nova exacerbação pulmonar (Bals, Hubert et al., 2011; [www.cff.org](http://www.cff.org)).

Preparações lipossômicas usando outros antibióticos tais como a tobramicina e a polimixina B podem ser estratégias terapêuticas promissoras contra as infecções pulmonares (Bals, Hubert et al. 2011).

Um ensaio clínico de fase II testando a combinação dos antibióticos fosfomicina e tobramicina para inalação foi finalizado no início de 2010 concluindo que a combinação era segura e bem tolerada ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

## **9.2 Cinesiterapia respiratória**

Em Dezembro de 2005 Rogers e colaboradores apresentaram a terapia hidro-acústica (HAT), um novo método no qual ondas sonoras transmitidas pela água atingem a parede torácica enquanto o doente está imerso num banho de água morna. Testes preliminares mostraram que a HAT era bem tolerada e mais eficaz em termos de remoção de muco que o colete *Vest*.

Um outro estudo levado a cabo em 2010 teve como objectivo investigar a eficácia, segurança e aceitação do HAT em pacientes com FQ. Este estudo era composto por duas sessões de HAT, duas de *flutter* e duas sessões numa banheira com sons sem vibração (placebo). A quantidade de secreções libertadas foi semelhante nas três partes do estudo. No entanto, 70% dos pacientes afirmaram que escolheriam a HAT como o seu método ideal de fisioterapia, pois sentiram melhorias na respiração, na facilidade de libertação da expectoração e no relaxamento. Concluiu-se que a HAT era tão eficaz e segura como o *flutter* mas com melhor aceitação pelos doentes (Jarad, Powell et al. 2010).

### **9.3 Agentes modificadores do muco**

Um agente osmótico alternativo ao soro hipertônico é o pó seco de manitol inalado, com nome comercial Bronchitol<sup>®</sup>. Tem havido um interesse crescente na utilização deste agente terapêutico em pacientes com FQ, uma vez que estudos anteriores mostraram um aumento da *clearence* mucociliar devido à hidratação da via aérea (Kreindler, 2010).

Um estudo publicado em 2008 teve como objectivo determinar o efeito do pó seco de manitol inalado em crianças com FQ, uma vez que até à data não existiam estudos exclusivamente em crianças. Concluíram que 24% das crianças com FQ que utilizaram o pó seco de manitol inalado tiveram efeitos benéficos na função pulmonar, em comparação com os 12% obtidos num estudo anterior que incluiu adultos e crianças (Minasian, Wallis et al. 2008).

Um estudo de fase III foi publicado em 2011, tendo por objectivo determinar mudanças no FEV<sub>1</sub> e nas exacerbações pulmonares em consequência da toma de pó seco de manitol inalado. Após 26 semanas, houve uma melhoria significativa no FEV<sub>1</sub> dos indivíduos que receberam o pó seco de manitol inalado comparando com o grupo controlo, bem como uma redução de 35,4% na incidência de exacerbações. A incidência de eventos adversos foi semelhante em ambos os grupos, pelo que se concluiu que o pó seco de manitol inalado tem um perfil de segurança aceitável para pacientes com FQ (Bilton, Robinson et al. 2011).

Já foi aprovado na Austrália e a aprovação final está pendente da Comissão Europeia para que possa então estar disponível ([www.cff.org](http://www.cff.org)).



## **9.4 Agentes anti-inflamatórios**

Os macrólidos, nomeadamente a azitromicina, têm sido estudados como agentes anti-inflamatórios no tratamento da FQ, particularmente nas pessoas infectadas cronicamente com *P. aeruginosa*. Um ensaio clínico publicado em 2003 mostrou melhorias da função pulmonar em doentes com mais de 6 anos infectados cronicamente com *P. aeruginosa* (Damas, Amorim et al. 2008; Kreindler 2010). Uma meta-análise de 2009 concluiu que a azitromicina melhora a função pulmonar de pacientes com FQ, sendo essa melhoria superior no subgrupo colonizados com *Pseudomonas* (Florescu, Murphy et al. 2009). Outro estudo do mesmo ano concluiu que a azitromicina diminui a concentração de bactérias e reduz a inflamação pulmonar, melhorando os mecanismos de defesa imunológica em ratos com FQ (Tsai, Hershenson et al. 2009).

Contrariamente, um estudo publicado em 2010 com jovens dos 6 aos 18 anos com FQ não infectados com *P. aeruginosa* não obteve diferenças estatisticamente significativas entre o placebo e a azitromicina no que diz respeito ao aumento do FEV<sub>1</sub>, aumento do peso corporal, redução do número de hospitalizações e melhoria da qualidade de vida (Saiman, Anstead et al. 2010).

Em 2011 foi publicado um estudo que teve como objectivo investigar os efeitos da azitromicina nas vias inflamatórias envolvidas na FQ, no qual foram usadas células epiteliais brônquicas. Em todas as condições testadas, a azitromicina não teve um efeito anti-inflamatório (Saint-Criq, Ruffin et al. 2012).

Paradoxalmente, um artigo de investigação publicado em Setembro de 2011 sugeriu que o uso prolongado da azitromicina em doentes com FQ estaria associado a um aumento das infecções por micobactérias não tuberculosas resistentes. Descobriram que a azitromicina bloqueia a *clearence* dos fagossomas nos macrófagos, impedindo a acidificação dos lisossomas, prejudicando assim a degradação de micobactérias nos macrófagos e resultando

em infecção crónica com micobactérias não tuberculosas em ratos (Renna, Schaffner et al. 2011).

Devido às suas supostas propriedades anti-inflamatórias, a azitromicina tem sido amplamente prescrita a muitos pacientes com FQ (aproximadamente 15 mil doentes nos Estados Unidos); no entanto, é preciso ter em conta as conclusões destes recentes estudos e aguardar por uma melhor clarificação do papel deste fármaco no âmbito da FQ ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

Têm sido feitos vários estudos sobre a relação entre a diminuição dos agentes anti-oxidantes e os desequilíbrios inflamatórios da FQ, bem como sobre a capacidade de alguns fármacos em reverter esses desequilíbrios.

Num estudo publicado em 2006, concluiu-se que os neutrófilos no sangue de 18 pacientes com FQ (todos em condição clínica estável) eram deficitários no antioxidante glutatona em comparação com pessoas saudáveis. Uma vez que a depleção da glutatona parece afectar a função dos neutrófilos, contribuindo assim para a sua deslocação em grande número para as vias aéreas dos doentes com FQ e conseqüente dano tecidual, procurou-se aumentar os níveis de glutatona nos neutrófilos circulantes usando a N-acetilcisteína. Neste estudo, concluiu-se que a administração de N-acetilcisteína por via oral em doses elevadas conduzia a um aumento da glutatona nos neutrófilos e a uma conseqüente diminuição da quantidade de neutrófilos nas vias aéreas dos doentes com FQ. Nos indivíduos que apresentavam inflamação das vias aéreas, os efeitos positivos do tratamento foram mais pronunciados e incluíram a diminuição dos níveis de IL-8 da expectoração. Este tratamento mostrou-se seguro e bem tolerado. Assim, conclui-se que a N-acetilcisteína em alta dose por via oral tem potencial anti-oxidante, permitindo deste modo contrariar a inflamação pulmonar na FQ (Tirouvanziam, Conrad et al. 2006).

A inflamação desregulada na FQ é atribuída a uma anormal produção de mediadores inflamatórios derivados de lípidos poliinsaturados. Recentemente, um novo género de anti-inflamatórios lipídicos foi identificado, tratando-se de compostos derivados dos ácidos gordos poliinsaturados ácido araquidónico, ácido docosahexanóico (DHA) e ácido eicosapentanóico. Estes mediadores têm mostrado potentes efeitos anti-inflamatórios *in vitro* e *in vivo* em modelos de inflamação pulmonar (Eickmeier, Hilberath et al. 2011).

O ácido gordo ómega-3 DHA está a ser testado num estudo de fase II através de uma fórmula infantil enriquecida com DHA em 120 bebés recém-diagnosticados com FQ ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

O KB001 é um fragmento Fab de um anticorpo monoclonal que tem como alvo um factor de virulência da *P. aeruginosa*. Como tem a capacidade de reduzir a inflamação do pulmão associada a este factor de virulência, poderá estar indicado para pessoas cronicamente infectados com *P. aeruginosa* ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

O SB-656933 é um antagonista selectivo do receptor CXCR2 que bloqueia a ligação de quimiocinas, é seguro e bem tolerado em doses únicas e demonstra ter efeito sobre a activação e recrutamento de neutrófilos. A acção anti-inflamatória desta substância está a ser testada com vista a uma futura terapia de manutenção na FQ (Lazaar, Sweeney et al. 2011). De igual forma, o sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase, está a ser testado para a possibilidade de reduzir a inflamação das vias aéreas em doentes com FQ ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

## **9.5 Nutrição**

A maioria dos doentes com FQ apresenta insuficiência pancreática exócrina e necessita de suplementação com terapia de reposição enzimática. A liprotamase é um suplemento de enzimas pancreáticas que não é preparado a partir de fontes animais. Um estudo de fase III publicado em 2011 concluiu que a toma de uma cápsula de liprotamase a cada refeição leva a melhorias estatisticamente significativas na absorção dos lípidos e proteínas e a uma diminuição significativa no peso das fezes. A liprotamase foi bem tolerada e tem um perfil de segurança favorável (Borowitz, Stevens et al. 2011).

Ao longo dos anos, algumas pesquisas têm indicado que as pessoas com FQ têm níveis inferiores de antioxidantes naturais nos pulmões comparando com as pessoas saudáveis. Esta baixa protecção antioxidante está relacionada com alterações no metabolismo da glutathione, diminuição da ingestão e absorção de antioxidantes lipossolúveis (vitamina E, carotenóides, coenzima Q-10, alguns ácidos gordos poliinsaturados, etc) e de oligoelementos (Se, Cu e Zn), os quais participam nas reacções de eliminação das espécies reactivas de oxigénio. Sabe-se que a disfunção da proteína CFTR, para além de prejudicar o fluxo de iões através das células, também altera o fluxo de outros solutos, tais como a glutathione. A diminuição deste antioxidante natural está associada a um aumento do stress oxidativo e consequente disfunção de inúmeras moléculas. Estas lesões oxidativas são particularmente pronunciadas no pulmão, onde a elevada concentração de espécies reactivas de oxigénio contribui para a activação dos neutrófilos, resultando em inflamação e infecção pulmonar. Suplementos orais e formulações em aerossol têm sido testados como terapia antioxidante em doentes com FQ, tendo como objectivo reduzir a extensão das lesões oxidativas e a taxa de deterioração pulmonar (Galli, Battistoni et al. 2012).

Em 2010 foi publicado um artigo de revisão que tinha por objectivo avaliar o efeito da vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno e selénio na doença pulmonar dos doentes com FQ.

Conclui-se que a suplementação com antioxidantes melhora os seus níveis plasmáticos, no entanto, a correlação desse facto com a função pulmonar ainda não foi totalmente explorada, pelo que a suplementação com os antioxidantes aqui analisados não deve ser considerada como uma opção terapêutica para a melhoria da função pulmonar. Para tal, são necessários mais estudos clínicos (Shamseer, Adams et al. 2010).

As ceramidas são esfingolípidos envolvidos na estrutura das membranas celulares, mas também participam na resposta inflamatória e na apoptose. Sabe-se que os doentes com FQ têm baixas concentrações de ceramidas no plasma. Um artigo de revisão publicado em 2010 aborda vários estudos que têm investigado a importância das ceramidas no contexto da FQ. Concluiu-se que os resultados na área da FQ são contraditórios devido à discrepância dos modelos animais utilizados e dos métodos de detecção das ceramidas aplicados. Assim, de forma a uniformizar os estudos nesta área, devem ser usados protocolos equivalentes e principalmente tornar a espectrometria de massa o método *gold standard*. Apesar dos resultados divergentes, a análise dos níveis das ceramidas continua a ser uma área de grande interesse na investigação de novas terapias para a FQ (Wojewodka, De Sanctis et al. 2011).

## **9.6 Terapias específicas da CFTR**

Existem duas abordagens terapêuticas principais para corrigir o defeito de base da FQ, restaurando assim o transporte iónico através dos canais CFTR: a terapia genética, que consiste numa tentativa de repor a função em falta através da introdução de parte ou de todo o gene CFTR nas células epiteliais pulmonares, e por outro lado, os compostos farmacológicos projectados para corrigir a função da proteína CFTR anormal, os quais são específicos para as diferentes classes de mutações.

### 9.6.1 Terapia genética

O princípio da terapia genética envolve a introdução de cópias normais do gene CFTR nas células epiteliais das vias aéreas, a fim de anular o defeito genético.

As dificuldades técnicas incluem a necessidade de re-administrações contínuas devido ao *turnover* das células alvo. Além disso, para ser eficaz, os vetores de administração do material genético nas vias aéreas necessitam de ultrapassar o sistema imunitário (Kreindler 2010).

Foram já testadas três técnicas para a transferência do ADN normal para o interior das células, uma utilizando vetores virais (adenovírus e adenovírus-associados), outra utilizando partículas lipídicas (lipossomas) e outra utilizando polímeros.

A utilização de vetores virais para essa administração tem uma grande eficácia de transdução, porém não tem capacidade para transportar todo o material genético e conduz ao aparecimento de resposta imunitária (Kreindler 2010).

A utilização de vetores não-virais inclui a utilização de lípidos catiónicos que incorporam o ADN plasmídico e está associada a uma resposta imunológica bem menos intensa, porém, possui uma menor eficácia de transdução. Inclui também a utilização de polímeros catiónicos que formam complexos com o ADN para dar origem a nanopartículas de ADN compactadas de carga neutra (PLASmin™). Estudos clínicos de fase I com essas nanopartículas de ADN compactadas mostraram uma correção transitória da NPD dos doentes, sugerindo uma eficaz transferência de genes. Esta terapia está a ser reformulada antes de se iniciarem estudos clínicos adicionais, na tentativa de melhorar a quantidade e a duração da expressão genética (Kreindler 2010; [www.cff.org](http://www.cff.org)).

## 9.6.2 Modeladores da CFTR

### *Fármacos que promovem a leitura através das mutações nonsense*

Estudos mostraram que a supressão dos PTCs resulta na produção de uma proteína normal (Collawn, Fu et al. 2010). Este resultado pode ser obtido através de antibióticos aminoglicosídeos, os quais se ligam ao rRNA e permitem a incorporação de um aminoácido no codão mutado, o que leva à continuação da tradução até à terminação normal do transcrito (Sloane and Rowe 2010).

Foram feitos estudos que demonstraram a capacidade da gentamicina em suprimir os PTCs, o que foi comprovado pela correcção parcial da NPD dos doentes em causa. No entanto, a gentamicina apresenta elevadas ototoxidades e nefrotocidades, o que impossibilita a sua administração por longos períodos (Kreindler 2010; Sloane and Rowe 2010). A amicacina mostrou-se uma alternativa à gentamicina por ser mais potente e menos tóxica (Collawn, Fu et al. 2010).

A capacidade de supressão dos PTCs pelos aminoglicosídeos varia de acordo com os PTCs em causa. Alguns estudos revelaram também uma variabilidade de eficácia para PTCs iguais, pelo que se concluiu que além do codão stop, a sequência à volta deste também interfere (Collawn, Fu et al. 2010).

O Ataluren (anteriormente conhecido como PTC12) é uma pequena molécula sem toxicidade, candidata à terapêutica de supressão dos PTCs, uma vez que promove a leitura através dos PTCs do mRNA, produzindo uma proteína CFTR normal. Estudos de fase II demonstraram resultados encorajadores, com um bom perfil de segurança e um aumento da NPD nos doentes tratados com Ataluren, o que representa um acréscimo no transporte de Cl<sup>-</sup> em consequência de uma maior quantidade de células epiteliais nasais que expressam a proteína CFTR normal (Becq 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011). Um estudo publicado em 2011 avaliou os benefícios da terapêutica crónica com Ataluren em pessoas com uma mutação

*nonsense* e concluiu que o aumento da função da proteína CFTR depende da duração do tratamento e que este melhora a função pulmonar e diminui a tosse em doentes com FQ (Wilschanski, Miller et al. 2011).

### Correctores da CFTR-F508del

Estudos *in vitro* utilizando a proteína CFTR-F508del demonstraram que este polipeptídeo mutante pode funcionar como um canal de Cl<sup>-</sup> dependente de cAMP se for permitido que a CFTR-F508del atinja a membrana celular, o que acontece, por exemplo, em células com a mutação F508del que são incubadas a baixa temperatura (27°C) (Rogan, Stoltz et al. 2011). Desde então, a proteína CFTR-F508del tem sido alvo de intensa pesquisa no sentido de se encontrarem compostos que consigam superar os defeitos de processamento e tráfego, de modo a que a proteína mutante consiga sair do RE e atinja a superfície celular. A esses compostos dá-se o nome de correctores (Becq, Mall et al. 2011).

O ácido 4-fenilbutírico (4-PBA, Buphenyl®) foi o primeiro corrector a ser identificado e actua através da degradação do mRNA do *chaperone* Hsc70, levando a uma diminuição do complexo Hsc70-CFTR. Deste modo, é interrompido o processo de degradação da CFTR mutante, permitindo que esta saia do RE, seja glicosilada no Golgi e atinja a membrana plasmática, onde possui alguma actividade intrínseca. A sua eficácia foi comprovada *in vitro* e *in vivo*; no entanto, *in vivo* os efeitos são relativamente pequenos (Kreindler 2010).

Em estudos pré-clínicos foi demonstrado que os inibidores da bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPase, como a taspigargina e a curcumina, normalizaram o transporte de Na<sup>+</sup> e de Cl<sup>-</sup> no epitélio nasal. No entanto, tais resultados não se conseguiram obter em estudos clínicos de fase I (Becq 2010).

Um ensaio clínico mostrou que os inibidores da fosfodiesterase, incluindo o sildenafil e outros análogos activos como o KM11060, têm a capacidade de aumentar a quantidade de



proteína mutante localizada na superfície celular. Estudos recentes provaram que estes mesmos agentes contribuíram para a correcção da NPD em ratos com a mutação F508del. Mais recentemente, a glafanina foi identificada como sendo um composto com as mesmas propriedades (Sloane and Rowe 2010).

A triagem de alto rendimento (HTS) fez com que milhares de compostos candidatos fossem analisados em pouco tempo. O corr-2b e o corr-4a (compostos tiazólicos), o VRT-325 (composto de quinazolina) e o VX-809 são exemplos de correctores identificados utilizando a tecnologia HTS. Os três primeiros actualmente já não estão em desenvolvimento clínico (Rogan, Stoltz et al. 2011).

Em culturas de células epiteliais isoladas dos brônquios de doentes homozigóticos para a mutação F508del, o VX-809 melhorou o processamento da CFTR-F508del no RE e aumentou a secreção de Cl<sup>-</sup> para fora da célula. Após a correcção pelo VX-809, a proteína CFTR-F508del exibiu características bioquímicas e funcionais semelhantes à CFTR normal, incluindo a susceptibilidade à proteólise, o tempo de permanência na membrana plasmática e o tempo de abertura do canal iónico (Van Goor, Hadida et al. 2011). Baseado no êxito dos estudos pré-clínicos, o VX-809 foi testado em doentes homozigóticos para a mutação F508del num estudo clínico de Fase II (Davis and Ferkol 2010). O fármaco foi bem tolerado e conduziu a reduções na concentração de Cl<sup>-</sup> no suor dos doentes que receberam as maiores doses, apesar de não terem sido detectados benefícios na função pulmonar nem alterações da NPD (Sloane and Rowe 2010; Becq, Mall et al. 2011; Rogan, Stoltz et al. 2011).

O miglustat (Zavesca<sup>®</sup>), um inibidor da glicosilceramida sintetase e da  $\alpha$ -1,2-glicosidase utilizado no tratamento da doença de Gaucher tipo 1, também tem sido testado como corrector da proteína CFTR-F508del. Num estudo em que culturas de células epiteliais das vias aéreas foram tratadas com este fármaco, verificou-se uma recuperação da expressão da proteína CFTR-F508del, uma diminuição da hiperabsorção de Na<sup>+</sup> e uma regulação na

homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ . Baseado nestes resultados e nos de outros estudos igualmente encorajadores, foi iniciado no final de 2010 um ensaio clínico de fase IIa com doentes homocigóticos para a mutação F508del que testará o efeito do miglustat na NPD (Becq 2010; Becq, Mall et al. 2011; www.actelion.com).

### Potenciadores

Os potenciadores são agentes farmacológicos que aumentam o fluxo dos iões  $\text{Cl}^-$  através das proteínas CFTR disfuncionais presentes na membrana plasmática (mutações das classes III, IV, V e VI) (Sloane and Rowe 2010). Os potenciadores também podem aumentar o fluxo de iões através das proteínas CFTR com a mutação F508del (mutação da classe II), desde que esta esteja situada na membrana plasmática (Rogan, Stoltz et al. 2011). Ou seja, os potenciadores podem ser usados para aumentar a função das proteínas mutantes pertencentes a qualquer classe, desde que estas estejam à superfície da célula (Becq, Mall et al. 2011).

A actuação dos potenciadores consiste no aumento do fluxo iónico ATP dependente, através da amplificação do sinal do cAMP e da fosforilação da CFTR pela PKA (Belcher and Vij 2010; Becq, Mall et al. 2011).

Variadíssimos compostos podem funcionar como potenciadores dos canais iónicos CFTR e incluem as alquilxantinas (como a 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina e o flavonóide genisteína), o 3-isobutil-1-metilxantina (um inibidor da fosfodiesterase), a sulfonamida, a fenilglicina e o benzotiofeno entre outros (Kreindler 2010; Rogan, Stoltz et al. 2011).

A genisteína é um estimulador da proteína CFTR mutante. Estudos envolvendo este flavonóide revelaram ausência de eficácia a nível nasal, no entanto, um estudo recente demonstrou alguma actividade do flavonóide quercetina nas células do nariz (Sloane and Rowe 2010). Apesar disso, nenhum desses compostos tem progredido substancialmente de modo a que pudessem ser utilizados num futuro próximo em doentes com FQ.

Em contraste, o fármaco VX-770, um potente potencializador com biodisponibilidade oral, está bastante perto de estar disponível para os doentes com a mutação G551D (Rogan, Stoltz et al. 2011).

O VX-770 foi inicialmente testado em células que expressam a proteína CFTR-G551D, onde se verificou um aumento do transporte iónico transepitelial com aumento da secreção de  $\text{Cl}^-$  (Sloane and Rowe 2010; Becq, Mall et al. 2011). Os resultados de um estudo de fase II com doentes adultos com FQ e com pelo menos um alelo com a mutação G551D, os quais receberam por via oral VX-770 duas vezes por dia, revelaram-se bastante promissores (Sheridan 2011). A maioria dos doentes envolvidos no estudo era heterozigóticos (G551D/F508del). Apenas se verificaram alguns efeitos secundários leves ou moderados e nenhum grave. Para os doentes que receberam o VX-770 houve um aumento estatisticamente significativo do  $\text{FEV}_1$ , uma redução da concentração de  $\text{Cl}^-$  no suor e um aumento da NPD. Concluiu-se assim que o VX-770 originou melhorias na função dos canais iónicos CFTR do epitélio nasal e das glândulas sudoríparas, bem como melhorias na função pulmonar, sugerindo um potencial benefício clínico (Accurso, Rowe et al. 2010; Becq, Mall et al. 2011).

Após estes resultados extremamente favoráveis, iniciaram-se estudos de fase III para testar o VX-770 em crianças e adultos com FQ que têm pelo menos uma cópia da mutação G551D no gene CFTR (Opar 2011). Um desses estudos foi publicado recentemente, em Novembro de 2011, e pretendeu avaliar o efeito do VX-770 durante 48 semanas em doentes com 12 ou mais anos de idade e com pelo menos uma cópia da mutação G551D. Concluíram que o VX-770 é um medicamento seguro, com incidência de efeitos adversos semelhante ao placebo, que conduziu a uma melhoria da função pulmonar (com um aumento significativo do  $\text{FEV}_1$ ) e a uma redução no número das exacerbações (os doentes que receberam VX-770 tiveram menos 55% de exacerbações pulmonares do que os doentes que receberam placebo). O VX-770 foi ainda responsável por um aumento de peso (em média mais 2,7 kg do que os

doentes que receberam placebo), por uma diminuição da quantidade de  $Cl^-$  no suor e por um aumento da qualidade de vida (Ramsey, Davies et al. 2011).

Outros ensaios clínicos sobre este fármaco estão ainda a decorrer.

A companhia farmacêutica responsável por estes estudos está a tentar a aprovação do medicamento para doentes a partir dos 6 anos e com pelo menos uma cópia da mutação G551D. Estimaram ter uma resposta em meados de Abril de 2012. Se aprovado, o VX-770 será o primeiro medicamento no mercado que tem como alvo a causa da FQ e não apenas os sintomas da doença ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

### Corrector mais potenciador

Num estudo clínico acima referido, o corrector VX-809 foi testado em doentes homocigóticos para a mutação F508del e apresentou uma eficácia reduzida. Isto porque as proteínas CFTR-F508del que conseguem chegar até à membrana plasmática têm propriedades de condução normais mas apresentam um fluxo iónico reduzido, uma vez que a deleção F508 altera o domínio NBD1, impedindo assim a correcta ligação e hidrólise do ATP, o que altera a função do canal. Deste modo, pode dizer-se que a mutação F508del pertence tanto à classe II como à classe III, pelo que as estratégias farmacológicas para esta mutação devem abordar estes dois tipos de defeitos (Rogan, Stoltz et al. 2011).

Surgiu assim a ideia de que o efeito do VX-809 na proteína CFTR-F508del poderia ser potenciado pela adição do VX-770, ou seja, o VX-809 ajudaria a proteína a chegar à superfície da célula e de seguida o VX-770 aumentaria a função dessa mesma proteína (Rogan, Stoltz et al. 2011).

Num estudo clínico de fase II que tinha como objectivo avaliar a segurança e a eficácia da associação VX-809 com VX-770 em pessoas com FQ que têm pelo menos uma cópia do gene CFTR-F508del, os participantes tomaram VX-809 durante duas semanas e na

terceira semana tomaram VX-809 e VX-770 em conjunto. Em Junho de 2011 foram anunciados os resultados da primeira parte do ensaio clínico, em que se concluiu que o VX-770 potencia o efeito do VX-809, uma vez que se verificou uma maior diminuição nos níveis de  $\text{Cl}^-$  no suor aquando da toma simultânea dos dois fármacos. Estes resultados promissores contribuíram para que a segunda parte deste estudo, que irá avaliar a eficácia de diferentes dosagens da combinação VX-770 e VX-809 sobre os níveis de  $\text{Cl}^-$  no suor num período terapêutico maior, se iniciasse no final de 2011 ([www.cff.org](http://www.cff.org)).

## **9.7 Terapias que restauram o transporte iónico epitelial independentes do CFTR**

A quantidade e a composição dos fluidos epiteliais dependem do equilíbrio entre a absorção e a secreção de iões. Esses fluxos de iões são mediados por uma variedade de canais iónicos e transportadores. Os esforços para corrigir o transporte iónico disfuncional associado à FQ não se restringem à modulação da CFTR, pois, para além deste, as células epiteliais expressam outros canais de  $\text{Cl}^-$ , como os ORCC, os canais de  $\text{Cl}^-$  activados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (CaCC) e os canais de  $\text{Cl}^-$  regulados pelo volume (ClCx), e expressam também os canais epiteliais de  $\text{Na}^+$  (ENaC) (Becq, Mall et al. 2011).

Enquanto os ORCC são regulados pela CFTR e deste modo também estão afectados na FQ, a estimulação dos canais  $\text{Cl}^-$  alternativos, como os CaCC e os ClCx, e a inibição da absorção de  $\text{Na}^+$  pelos ENaC, podem compensar os defeitos na função da CFTR e deste modo serem potenciais alvos para o tratamento da FQ (Traynor-Kaplan, Moody et al. 2010).

### 9.7.1 Estimulação da secreção de $\text{Cl}^-$

Os estudos iniciais demonstraram que os CaCC estão presentes em número normal nos epitélios das vias aéreas das pessoas com FQ. Também revelaram que os CaCC são activados por nucleotídeos extracelulares (ATP e UTP) que se ligam aos receptores purinérgicos  $\text{P2Y}_2$  e desencadeiam um aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Além disso, a activação dos receptores  $\text{P2Y}_2$  também inibe a absorção de  $\text{Na}^+$  mediada pelos ENaC. Deste modo, têm sido desenvolvidos agonistas de longa duração dos receptores  $\text{P2Y}_2$  como sendo fortes candidatos à terapêutica da doença pulmonar na FQ (Becq 2010; Becq, Mall et al. 2011).

O denufosol tetrasodium (INS37217) é um desses agonistas selectivos  $\text{P2Y}_2$  que tem sido estudado. Em 2007 foi publicado um estudo de fase II que concluiu que o denufosol em aerossol administrado três vezes por dia durante 28 dias foi bem tolerado em adultos e crianças com FQ e doença pulmonar leve. Este estudo também forneceu evidências preliminares sobre o potencial benefício do denufosol na função pulmonar (Deterding, Lavange et al. 2007).

Em 2011 foi publicado um estudo de fase III que analisou a segurança e a eficácia do denufosol tetrasodium durante 24 semanas de tratamento em doentes com FQ e doença pulmonar inicial. Concluiu-se que o denufosol aumentou a secreção de  $\text{Cl}^-$ , diminuiu a absorção de  $\text{Na}^+$  e aumentou a frequência dos movimentos ciliares nas vias aéreas. Tudo isto contribuiu para um aumento da função pulmonar em comparação com o placebo. Os resultados deste estudo sugerem que o denufosol tem um perfil de segurança e eficácia adequado para uma potencial intervenção na fase precoce da doença pulmonar decorrente da FQ. Após a publicação do estudo anterior, iniciou-se um segundo estudo de fase III com um período de tratamento mais longo, com o objectivo de comprovar uma futura utilidade do denufosol para pacientes com FQ (Accurso, Moss et al. 2011).

A moli1901 (duramicina ou lancovutide) é um peptídeo que interage com os fosfolípidos das membranas celulares e dos organelos, aumentando o transporte de  $\text{Cl}^-$  e a secreção de LSA através do aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em estudos de fase I e fase II foi comprovado o aumento do transporte de  $\text{Cl}^-$  com a aplicação de moli1901 no epitélio respiratório, tanto em indivíduos saudáveis como em doentes com FQ (Becq 2010). Estudos adicionais de fase II foram realizados, e em 2007 foi publicado um artigo que teve como objectivo comprovar a eficácia clínica e a segurança da moli1901 em solução para inalação em três dosagens diferentes. A inalação da moli1901 foi bem tolerada em adolescentes e adultos com FQ e doença pulmonar leve, existindo pouca ou nenhuma absorção sistémica do moli1901 inalado. Os dados sugerem ainda um aumento dependente da dose da função pulmonar nos doentes com FQ. Mais ensaios clínicos serão necessários para comprovar este efeito (Grasemann, Stehling et al. 2007).

Os resultados de alguns estudos têm sido decepcionantes porque um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular nem sempre leva ao aumento de secreção de  $\text{Cl}^-$ . Demonstrou-se que a molécula de sinalização intracelular inositol tetrafosfato dissocia a secreção de  $\text{Cl}^-$  do aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Daí surgiu a hipótese de que análogos antagonistas do inositol tetrafosfato pudessem estimular os CaCC. Um exemplo desses análogos é o INO-4995 (Traynor-Kaplan, Moody et al. 2010). Em 2010 foi publicado um estudo que evidenciou que o INO-4995 inibe a absorção de  $\text{Na}^+$  e aumenta a secreção de  $\text{Cl}^-$ , é selectivo para as células epiteliais com o gene da FQ quando comparando com células normais, tem uma longa duração de acção e um bom perfil de segurança (Becq 2010; Traynor-Kaplan, Moody et al. 2010).

### 9.7.2 Inibição da absorção de Na<sup>+</sup>

Para além de funcionar como um canal de Cl<sup>-</sup>, a CFTR regula a absorção de Na<sup>+</sup> no epitélio das vias aéreas através da inibição dos ENaC. Quando a CFTR está ausente ou é expressa em quantidades diminutas, a absorção de Na<sup>+</sup> através dos ENaC aumenta, contribuindo deste modo para a depleção do LSA, visto que a absorção de iões estimula a absorção líquida (Becq, Mall et al. 2011).

A inibição da absorção de Na<sup>+</sup> nos ENaC poderá ser um alvo terapêutico com grande potencial na FQ. Um fármaco proposto para tal é a amilorida em aerossol, um agente bloqueador dos ENaC (Becq 2010).

Os estudos clínicos iniciais da amilorida em aerossol em doentes com FQ demonstraram tratar-se de um fármaco seguro e bem tolerado, com melhoria na *clearence* mucociliar, mas com efeito de curta duração. No entanto, os estudos fase II não revelaram melhorias na função pulmonar em pacientes com FQ com doença pulmonar estabelecida (Becq 2010).

Em estudos pré-clínicos recentes verificou-se que a administração de amilorida antes da doença pulmonar estabelecida reduz significativamente a hipersecreção de muco e a consequente obstrução das vias aéreas, a inflamação e a mortalidade de causa pulmonar. Estes resultados demonstram de forma convincente que, se a amilorida for administrada antes do início da doença pulmonar poderá retardar a sua evolução. Sugerem também que a obstrução das vias aéreas com muco e a sua remodelação podem contribuir para a falta de eficácia de amilorida em aerossol numa fase mais tardia (Becq, Mall et al. 2011).

Com o objectivo de desenvolver um bloqueador dos ENaC mais eficaz, mais selectivo e com maior duração de acção do que a amilorida, foram sintetizados e testados vários análogos deste fármaco. Descobriu-se então o benzamil, com eficácia semelhante à amilorida



mas com maior semi-vida, e o parion 552-02, muito mais potente que a amilorida, menos reversível e com uma semi-vida maior (Becq 2010; Becq, Mall et al. 2011).

Nos epitélios das vias aéreas, a actividade dos ENaC é regulada por proteases endógenas. Deste modo, a actividade de inibidores da serina protease (aprotinina e bikunina placentária) e de inibidores da tripsina-like protease (camostat ou QUA145) estão a ser testadas como bloqueadores da absorção de  $\text{Na}^+$  no tratamento da doença pulmonar da FQ (Becq 2010; Becq, Mall et al. 2011).

## 10 - Conclusão

Cerca de duas décadas após a identificação do defeito genético responsável pela FQ, terapias baseadas numa compreensão molecular da doença começam a ser testadas na clínica. Os primeiros resultados desses estudos foram animadores e podemos estar a um passo de encontrar uma cura para a doença. Eles encaixam-se no conceito da medicina personalizada, em que terapias específicas são projectadas para suprimir os defeitos genéticos presentes em indivíduos com FQ.

No entanto, é preciso estar ciente da necessidade de dados a longo prazo sobre a eficácia e a segurança destes fármacos, e que pode levar vários anos até que estes agentes façam parte do arsenal terapêutico na FQ. Além disso, é importante salientar que estes fármacos provavelmente não vão reverter a doença pulmonar já estabelecida em milhares de pacientes com FQ.

Embora exista um grande entusiasmo sobre o desenvolvimento de terapêuticas dirigidas às fases precoces da doença, mantém-se a necessidade de aperfeiçoar e enriquecer o espectro de medicamentos utilizados para aliviar os sintomas e as complicações já estabelecidas, decorrentes da disfunção da CFTR.

Também a evolução a nível da investigação da fisiopatologia da FQ pode proporcionar evidências que sejam igualmente úteis para o desenvolvimento de estudos relacionados com o tratamento.

Com a eventual existência de terapêuticas inovadoras e mais direccionadas às necessidades dos doentes, poder-se-á proporcionar a estes indivíduos uma melhoria significativa na sua qualidade de vida, permitindo que estes vivam não só mais anos, mas que os possam aproveitar da melhor maneira possível.

## **11 – Agradecimentos**

Deixo expresso o meu agradecimento à Dra. Sara Freitas e à Dra. Fernanda Gamboa pela orientação e disponibilidade demonstradas durante a realização deste Artigo de Revisão.

Agradeço também aos meus pais e irmã pela sua fulcral contribuição na minha formação pessoal e académica. Um agradecimento especial a todos os meus amigos por toda a compreensão e apoio incondicional demonstrados ao longo do meu percurso académico.

## 12 – Bibliografia

- Accurso, F. J., R. B. Moss, et al. (2011). "Denufosol tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function." Am J Respir Crit Care Med **183**(5): 627-634.
- Accurso, F. J., S. M. Rowe, et al. (2010). "Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation." N Engl J Med **363**(21): 1991-2003.
- Adi, H., P. M. Young, et al. (2010). "Co-spray-dried mannitol-ciprofloxacin dry powder inhaler formulation for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease." Eur J Pharm Sci **40**(3): 239-247.
- Amaral, M. D. (2004). "CFTR and chaperones: processing and degradation." J Mol Neurosci **23**(1-2): 41-48.
- Bals, R., D. Hubert, et al. (2011). "Antibiotic treatment of CF lung disease: from bench to bedside." J Cyst Fibros **10 Suppl 2**: S146-151.
- Becq, F. (2010). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators for personalized drug treatment of cystic fibrosis: progress to date." Drugs **70**(3): 241-259.
- Becq, F., M. A. Mall, et al. (2011). "Pharmacological therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside." J Cyst Fibros **10 Suppl 2**: S129-145.
- Belcher, C. N. and N. Vij (2010). "Protein processing and inflammatory signaling in Cystic Fibrosis: challenges and therapeutic strategies." Curr Mol Med **10**(1): 82-94.
- Bilton, D., P. Robinson, et al. (2011). "Inhaled dry powder mannitol in cystic fibrosis: an efficacy and safety study." Eur Respir J **38**(5): 1071-1080.
- Borowitz, D., C. Stevens, et al. (2011). "International phase III trial of liprotamase efficacy and safety in pancreatic-insufficient cystic fibrosis patients." J Cyst Fibros **10**(6): 443-452.

- Castellani, C., H. Cuppens, et al. (2008). "Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice." J Cyst Fibros **7**(3): 179-196.
- Cheer, S. M., J. Waugh, et al. (2003). "Inhaled tobramycin (TOBI): a review of its use in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis." Drugs **63**(22): 2501-2520.
- Chmiel, J. F. and P. B. Davis (2003). "State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?" Respir Res **4**: 8.
- Collawn, J. F., L. Fu, et al. (2010). "Targets for cystic fibrosis therapy: proteomic analysis and correction of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Expert Rev Proteomics **7**(4): 495-506.
- Dalcin Pde, T. and E. S. F. A. Abreu (2008). "Cystic fibrosis in adults: diagnostic and therapeutic aspects." J Bras Pneumol **34**(2): 107-117.
- Damas, C., A. Amorim, et al. (2008). "[Cystic fibrosis: review]." Rev Port Pneumol **14**(1): 89-112.
- Davis, S. D. and T. W. Ferkol (2010). "Hitting the target: new treatments for cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **182**(12): 1460-1461.
- Deterding, R. R., L. M. Lavange, et al. (2007). "Phase 2 randomized safety and efficacy trial of nebulized denufosol tetrasodium in cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **176**(4): 362-369.
- Eickmeier, O., J. N. Hilberath, et al. (2011). "[Pro-resolving lipid mediators in inflammatory lung diseases]." Pneumologie **65**(3): 149-158.
- Elphick, H. E. and G. Mallory (2009). "Oxygen therapy for cystic fibrosis." Cochrane Database Syst Rev(1): CD003884.
- Florescu, D. F., P. J. Murphy, et al. (2009). "Effects of prolonged use of azithromycin in patients with cystic fibrosis: a meta-analysis." Pulm Pharmacol Ther **22**(6): 467-472.

- Gadsby, D. C. and A. C. Nairn (1999). "Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S77-S107.
- Galli, F., A. Battistoni, et al. (2012). "Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis." Biochim Biophys Acta **1822**(5): 690-713.
- Geller, D. E., P. A. Flume, et al. (2011). "Levofloxacin inhalation solution (MP-376) in patients with cystic fibrosis with *Pseudomonas aeruginosa*." Am J Respir Crit Care Med **183**(11): 1510-1516.
- Geller, D. E., J. Weers, et al. (2011). "Development of an inhaled dry-powder formulation of tobramycin using PulmoSphere technology." J Aerosol Med Pulm Drug Deliv **24**(4): 175-182.
- Grasemann, H., F. Stehling, et al. (2007). "Inhalation of Moli1901 in patients with cystic fibrosis." Chest **131**(5): 1461-1466.
- Guggino, W. B. and B. A. Stanton (2006). "New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(6): 426-436.
- Guo, Y., M. Su, et al. (2009). "Expression and distribution of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in neurons of the human brain." J Histochem Cytochem **57**(12): 1113-1120.
- Jarad, N. A., T. Powell, et al. (2010). "Evaluation of a novel sputum clearance technique--hydro-acoustic therapy (HAT) in adult patients with cystic fibrosis: a feasibility study." Chron Respir Dis **7**(4): 217-227.
- King, P., O. Lomovskaya, et al. (2010). "In vitro pharmacodynamics of levofloxacin and other aerosolized antibiotics under multiple conditions relevant to chronic pulmonary infection in cystic fibrosis." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 143-148.

- Konstan, M. W., P. A. Flume, et al. (2011). "Safety, efficacy and convenience of tobramycin inhalation powder in cystic fibrosis patients: The EAGER trial." J Cyst Fibros **10**(1): 54-61.
- Kreindler, J. L. (2010). "Cystic fibrosis: exploiting its genetic basis in the hunt for new therapies." Pharmacol Ther **125**(2): 219-229.
- Lazaar, A. L., L. E. Sweeney, et al. (2011). "SB-656933, a novel CXCR2 selective antagonist, inhibits ex vivo neutrophil activation and ozone-induced airway inflammation in humans." Br J Clin Pharmacol **72**(2): 282-293.
- Li, C. and A. P. Naren (2005). "Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners." Pharmacol Ther **108**(2): 208-223.
- Lin, S., J. Sui, et al. (2010). "Identification of synergistic combinations of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators." Assay Drug Dev Technol **8**(6): 669-684.
- Lommatzsch, S. T. and R. Aris (2009). "Genetics of cystic fibrosis." Semin Respir Crit Care Med **30**(5): 531-538.
- Meers, P., M. Neville, et al. (2008). "Biofilm penetration, triggered release and in vivo activity of inhaled liposomal amikacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections." J Antimicrob Chemother **61**(4): 859-868.
- Minasian, C., C. Wallis, et al. (2008). "Bronchial provocation testing with dry powder mannitol in children with cystic fibrosis." Pediatr Pulmonol **43**(11): 1078-1084.
- Mishra, A., R. Greaves, et al. (2005). "The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era." Clin Biochem Rev **26**(4): 135-153.
- Opar, A. (2011). "Excitement mounts for first disease-modifying cystic fibrosis drugs." Nat Rev Drug Discov **10**(7): 479-480.

- Plosker, G. L. (2011). "Aztreonam lysine for inhalation solution in cystic fibrosis: profile report." Paediatr Drugs **13**(2): 129-131.
- Ramsey, B. W., J. Davies, et al. (2011). "A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation." N Engl J Med **365**(18): 1663-1672.
- Renna, M., C. Schaffner, et al. (2011). "Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection." J Clin Invest **121**(9): 3554-3563.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-1073.
- Rogan, M. P., D. A. Stoltz, et al. (2011). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment." Chest **139**(6): 1480-1490.
- Saiman, L., M. Anstead, et al. (2010). "Effect of azithromycin on pulmonary function in patients with cystic fibrosis uninfected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial." JAMA **303**(17): 1707-1715.
- Saint-Criq, V., M. Ruffin, et al. (2012). "Azithromycin fails to reduce inflammation in cystic fibrosis airway epithelial cells." Eur J Pharmacol **674**(1): 1-6.
- Schwiebert, E. M., D. J. Benos, et al. (1999). "CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S145-166.
- Shamseer, L., D. Adams, et al. (2010). "Antioxidant micronutrients for lung disease in cystic fibrosis." Cochrane Database Syst Rev(12): CD007020.
- Sheridan, C. (2011). "First cystic fibrosis drug advances towards approval." Nat Biotechnol **29**(6): 465-466.



- Sloane, P. A. and S. M. Rowe (2010). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis." Curr Opin Pulm Med **16**(6): 591-597.
- Tirouvanziam, R., C. K. Conrad, et al. (2006). "High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4628-4633.
- Traynor-Kaplan, A. E., M. Moody, et al. (2010). "INO-4995 therapeutic efficacy is enhanced with repeat dosing in cystic fibrosis knockout mice and human epithelia." Am J Respir Cell Mol Biol **42**(1): 105-112.
- Tsai, W. C., M. B. Hershenson, et al. (2009). "Azithromycin increases survival and reduces lung inflammation in cystic fibrosis mice." Inflamm Res **58**(8): 491-501.
- Van Goor, F., S. Hadida, et al. (2011). "Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(46): 18843-18848.
- Vankeerberghen, A., H. Cuppens, et al. (2002). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions." J Cyst Fibros **1**(1): 13-29.
- Varelogianni, G., I. Oliynyk, et al. (2010). "The effect of N-acetylcysteine on chloride efflux from airway epithelial cells." Cell Biol Int **34**(3): 245-252.
- Wilschanski, M., L. L. Miller, et al. (2011). "Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis." Eur Respir J **38**(1): 59-69.
- Wojewodka, G., J. B. De Sanctis, et al. (2011). "Ceramide in cystic fibrosis: a potential new target for therapeutic intervention." J Lipids **2011**: 674968.
- Yang, Y., M. D. Tsifansky, et al. (2011). "Mannitol-guided delivery of Ciprofloxacin in artificial cystic fibrosis mucus model." Biotechnol Bioeng **108**(6): 1441-1449.

Yang, Y., M. D. Tsifansky, et al. (2010). "Inhalable antibiotic delivery using a dry powder co-delivering recombinant deoxyribonuclease and ciprofloxacin for treatment of cystic fibrosis." Pharm Res **27**(1): 151-160.

Yankaskas, J. R., B. C. Marshall, et al. (2004). "Cystic fibrosis adult care: consensus conference report." Chest **125**(1 Suppl): 1S-39S.

[www.actelion.com](http://www.actelion.com)

[www.apfq.pt](http://www.apfq.pt)

[www.cff.org](http://www.cff.org)

[www.yasoo-products.com](http://www.yasoo-products.com)

[www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)