



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pneumologia

**Papel do CFTR nas doenças
respiratórias. Possibilidade de novas
abordagens terapêuticas.**

Nome do aluno:

Rita Alçada

JUNHO'2017



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pneumologia

Papel do CFTR nas doenças respiratórias. Possibilidade de novas abordagens terapêuticas.

Nome do aluno:

Rita Alçada

Orientado por:

Dr. Carlos Lopes

JUNHO'2017

Resumo

O *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) é um transportador aniónico com um papel essencial na regulação da absorção e secreção de iões e água em tecidos epiteliais, nomeadamente nas vias aéreas. Nestas, o CFTR está envolvido na regulação de mecanismos de defesa essenciais, sendo crucial para a manutenção do líquido de superfície epitelial e de uma adequada *clearance* mucociliar. A fibrose quística (FQ) resulta da deficiência ou disfunção do CFTR determinada geneticamente. Evidências recentes sugerem que a disfunção do CFTR, determinada por mutações genéticas ou adquirida em proteínas CFTR *wild type*, pode ter um papel noutras doenças das vias respiratórias, como na doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), na asma, na aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), nas bronquiectasias difusas (DB), e na doença pulmonar associada a micobactérias não tuberculosas (PNTM). Mutações do gene do CFTR mesmo em apenas um alelo podem ter um papel fisiopatológico nas doenças referidas. Adicionalmente, fatores ambientais como a exposição ao fumo do tabaco, a álcool e a metais pesados, a hipóxia e acidose locais, o stress oxidativo e a inflamação, podem condicionar disfunção do CFTR *wild type*, com um potencial papel patogénico na DPOC, na asma, nas DB e na infeção PNTM, havendo igualmente evidência de correlação desta disfunção com o fenótipo clínico e gravidade da DPOC e, de forma menos clara, das DB e da ABPA. O desenvolvimento recente de novas abordagens terapêuticas direcionadas a corrigir a disfunção do CFTR na FQ permite considerar o recurso a terapêutica dirigida noutras doenças pulmonares com alterações da função do CFTR, nomeadamente utilizando, por exemplo, moduladores do CFTR, secretagagogs do cloro ou antagonistas da fosfodiesterase-4. Destaca-se a doença pulmonar obstrutiva crónica onde existe já evidência *in vivo* e *in vitro* da eficácia da terapêutica de substituição proteica.

Palavras-Chave: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, *clearance* de muco, bronquite crónica, bronquiectasias.

Abstract

The *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) is an anionic channel with an essential role in the regulation of the absorption and secretion of ions and water in the epithelial tissues, namely in the airways. In the airways, CFTR is involved in regulating the defence mechanisms, having a central role in keeping the airway surface liquid and an adequate mucociliary clearance. The Cystic Fibrosis (CF) results of the deficiency or malfunction of the CFTR genetically determined. Recent evidences suggest that CFTR dysfunction, genetically inherited or acquired in a wild type CFTR, may have a role in other airway diseases such as in chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in asthma, in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), in the diffuse bronchiectasis (DB) and in nontuberculous mycobacteria associated lung disease (PNTM). CFTR gene mutations even in only one allele may have a pathogenic role in the referred diseases. Additionally, environmental factors as exposure to cigarette smoke, alcohol, heavy metals, local hypoxia and acidosis, oxidative stress and inflammation may lead to wild type CFTR dysfunction, with a potential pathogenic role in COPD, in asthma, in DB and in PNTM. Moreover, there is also evidence that this dysfunction may correlate with the clinical phenotype and severity of COPD and, less clearly, of DB and ABPA. The recent development of CFTR targeted therapeutics for CF, leads to considering the use of that new therapeutic approaches targeted to correct CFTR dysfunction in other airway diseases, using, for example, CFTR modulators, Cl⁻ secretagogues or phosphodiesterase 4 inhibitors. It is particularly relevant to mention that in COPD there is already evidence *in vivo* and *in vitro* of the efficacy of this targeted therapy.

Keywords: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, mucus clearance, chronic bronchitis, bronchiectasis.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML

Índice

Introdução	1
Gene CFTR Função e Disfunção	3
CFTR e suas funções.....	3
Disfunção do CFTR	4
Disfunção do CFTR determinada geneticamente	5
Disfunção do CFTR Adquirida.....	7
<u>Exposição do fumo do tabaco e disfunção adquirida de CFTR.....</u>	<u>8</u>
<u>Outros fatores ambientais que podem condicionar disfunção do CFTR</u>	<u>12</u>
Disfunção do CFTR e doenças respiratórias	14
Implicações da disfunção do CFTR na DPOC	14
Semelhanças DPOC – FQ.....	15
Disfunção CFTR e DPOC.....	16
Causas da disfunção do CFTR na DPOC	17
Disfunção do CFTR e clínica da DPOC	18
Implicações da disfunção do CFTR na Asma.....	19
Implicações da disfunção do CFTR na Aspergilose Broncopulmonar Alérgica	22
Implicações da disfunção do CFTR nas Bronquiectasias Difusas (DB) não associadas a FQ	24
Implicações da disfunção do CFTR na Infecção Pulmonar por Micobactérias não Tuberculosas	25
Potenciais Implicações Terapêuticas.....	28
Terapêuticas dirigidas na FQ	28
Terapêutica dirigida ao CFTR e doenças das vias aéreas.....	30
Terapêuticas dirigidas ao CFTR na DPOC.....	30
Terapêuticas dirigidas ao CFTR noutras doenças das vias aéreas	34
Conclusões sobre terapêuticas dirigidas ao CFTR e doenças das vias aéreas	35
Perspetivas Futuras	36
Conclusão.....	38
Agradecimentos.....	39
Bibliografia	40

Introdução

Com a realização desta revisão procurou esclarecer-se de que forma uma alteração da função do *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator* (CFTR) poderá ter influência em doenças das vias aéreas além da fibrose quística (FQ). Importa, pois, explicitar o papel que este transportador pode ter na suscetibilidade, na fisiopatologia, nas manifestações clínicas, na gravidade e nas abordagens terapêuticas de doenças das vias aéreas, destacando-se neste trabalho final de mestrado a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), a asma, a aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), as bronquiectasias difusas (DB) não associadas a FQ e a doença pulmonar associada a micobactérias não tuberculosas (PNTM).

Reveste-se de particular importância esclarecer de que modo uma abordagem terapêutica dirigida ao CFTR, nomeadamente com fármacos desenvolvidos para o tratamento da FQ, poderá ter um impacto significativo nas patologias respiratórias em causa.

Neste sentido, procura-se, inicialmente, explicitar qual o papel do CFTR na fisiologia dos epitélios, de que forma a sua funcionalidade pode ser afetada, tanto através de alterações genéticas como por ação de agentes ambientais que condicionam uma disfunção adquirida.

Posteriormente, clarifica-se de que forma esta disfunção do CFTR pode contribuir para o desenvolvimento, fisiopatologia, manifestações clínicas e gravidade das patologias das vias respiratórias referidas. E, em seguida, procura-se compreender de que forma abordagens terapêuticas dirigidas à disfunção do CFTR nestas doenças em que a hipofunção do CFTR, determinada geneticamente ou adquirida, é relevante poderão ter um papel no tratamento das mesmas, sugerindo-se a necessidade de mais investigação clínica que comprove a eficácia destas abordagens e que permita delinear em que doenças e em que doentes podem ter maior relevância clínica. Por último, várias áreas de investigação poderão ser úteis no futuro e ter implicações terapêuticas, nomeadamente: uma melhor compreensão do papel de outros canais iónicos na fisiopatologia das doenças das vias respiratórias em causa; a identificação e

modulação de genes modificadores da expressão do CFTR; e a possibilidade de realização de um *bypass* da disfunção do CFTR.

Gene CFTR Função e Disfunção

CFTR e suas funções

O CFTR é um canal aniônico (responsável pelo transporte de cloro e bicarbonato) epitelial transmembranar regulado pelo *cAMP*, este tem um papel essencial na regulação da absorção e secreção de fluidos e eletrólitos em diversos tecidos epiteliais, nomeadamente nas vias aéreas, nos tratos gastrointestinal (GI) e reprodutor, nas glândulas sudoríparas e salivares (1,2).

O CFTR está envolvido na regulação de diversos mecanismos essenciais da fisiologia epitelial, como a regulação do pH luminal e a manutenção da hidratação da superfície epitelial. De facto, diversos estudos têm identificado o pH como importante fator para a função de barreira do epitélio e para a imunidade inata, particularmente nas vias aéreas e no GI.

No âmbito desta revisão revestem-se de particular importância as funções do CFTR ao nível das vias aéreas, estando este presente na membrana apical de células epiteliais da mucosa das vias aéreas e das glândulas submucosas (3).

Os mecanismos de defesa inatos do pulmão são cruciais na remoção de patógenos inalados e toxinas, estes mecanismos incluem a *clearence* de muco (que continuamente efetua uma limpeza do trato respiratório). Para que esta *clearence* se mantenha sal e água têm de ser secretados para as vias aéreas juntamente com as mucinas “secas”. Posteriormente, estes elementos constituem o líquido periciliar (ASL), que é depois removido pelos batimentos ciliares ou pela tosse. Quando é despoletada uma resposta inflamatória ao nível das vias aéreas, usualmente, a secreção de sal, água e mucina tende a aumentar, com o intuito de incrementar as taxas de *clearence* de muco de forma a permitir uma mais frequente lavagem das vias aéreas até que a causa da infeção/agressão seja removida (4).

Uma das proteínas essenciais para a secreção de sal/água é o CFTR. De facto, uma função crucial do CFTR trata-se de modular a camada de muco das vias aéreas em resposta a estímulos ambientais, através maioritariamente da regulação da secreção de cloro e bicarbonato (3).

A secreção de cloro conduz à hidratação do líquido periciliar e da camada mucosa, enquanto o bicarbonato alcaliniza o meio extracelular. Uma adequada regulação do cloro e bicarbonato no muco presente nas vias aéreas é essencial para uma adequada eliminação de patógenos, bem como para proteção do epitélio contra xenobióticos e produtos tóxicos libertados pelos mesmos. Neste sentido, para uma adequada função do CFTR tem de haver uma constante resposta adaptativa mediada por este transportador para que o líquido periciliar e a camada mucosa tenham uma constituição adequada, tendo em conta o ambiente das vias aéreas, dotado de necessidades físico-químicas distintas ao longo do tempo (3). Efetivamente, a abundância e viscosidade relativas do muco mudam rapidamente na presença de exposições ambientais adversas, nomeadamente de oxidantes, proteases e xenobióticos. Perante estes estímulos o muco torna-se rapidamente mais abundante, rico em mucinas e as suas características físico-químicas sofrem alterações significativas, dependentes, como referido, do CFTR (3).

Deste modo, em resposta a estímulos como alguns patógenos ambientais, citocinas pró-inflamatórias e oxidantes, ocorre um aumento do transporte aniónico mediado pelo CFTR nas células epiteliais em causa. Esta ativação conduz ao aumento do conteúdo aquoso do muco, levando a que este seja mais rápida e facilmente removido da superfície epitelial, permitindo afastar elementos potencialmente lesivos (3).

Por último, é também evidente que o CFTR tem outras funções de sinalização e/ou transporte (além da sua bem documentada função no efluxo de cloro) que estão envolvidos no controlo da resposta inflamatória (5).

Disfunção do CFTR

Tendo em conta a relevância significativa das funções desempenhadas pelo CFTR, torna-se evidente que defeitos na sua função estejam associados a doença, nomeadamente à doença genética FQ. Mais recentemente, a disfunção do CFTR tem sido associada à fisiopatologia de outras doenças, como, por exemplo, Pancreatite Aguda, DPOC e à hiperreactividade na Asma Brônquica (1).

Nas vias aéreas a disfunção do CFTR conduz, previsivelmente, à diminuição do ASL e da *clearance* mucociliar, à infecção bacteriana crónica e à inflamação excessiva (6).

A disfunção do CFTR pode ocorrer na sequência de uma alteração genética ou, por outro lado, constituir uma disfunção adquirida durante a vida influenciada por diversos fatores como explicitado em seguida.

Disfunção do CFTR determinada geneticamente

Como referido, a disfunção do CFTR pode ter origem numa alteração genética de base, sendo o exemplo mais estudado o caso da FQ. Uma mutação nos dois alelos do gene do CFTR conduz então a esta doença autossómica recessiva (7).

O gene CFTR encontra-se no braço longo do cromossoma 7, mais de 2000 variações da sequência deste gene já foram identificadas desde a descoberta do gene em 1989, contudo uma compreensão detalhada de como estas mutações afetam a função do CFTR está limitada a uma pequena percentagem das mesmas. Neste sentido, há uma lista relativamente pequena de mutações que se sabe que causam a FQ, enquanto as consequências funcionais de várias variações de sequência raras continuam desconhecidas ou foram demonstradas como não causadoras de FQ. Das mais de 2000 mutações do gene CFTR conhecidas, a maioria constituem mutações pontuais ou pequenas deleções e apenas cerca de 5 têm uma prevalência superior a 1%: F508del (a mutação mais comum, com uma frequência nos alelos mutados de 30-89%, dependendo dos grupos étnicos), G551D, W1282X, G542X e N1303K. (2,7).

A maioria das mutações do CFTR identificadas fazem parte de uma de seis classes responsáveis por cerca de 80% de todos os doentes com FQ. Relativamente às classes das mutações, as classes I e II caracterizam-se por uma redução na expressão da proteína CFTR, no caso da classe I esta pode resultar de mutações *non-sense*, *frame-shift* e de defeitos do *splicing* do mRNA, como por exemplo a G542X (mutação *non-sense* ou *stop* que conduz a uma paragem prematura da tradução e à produção de uma proteína truncada). Na classe II há defeitos do *folding* ou da maturação da proteína, podendo conduzir a uma degradação prematura do CFTR produzido, a mutação mais frequentemente associada à FQ, a F508del, faz parte desta

classe. Por outro lado, as classes III e IV caracterizam-se por uma função alterada do canal iónico e não por uma quantidade reduzida de CFTR. Na classe III ocorre um *gating* (abertura e fecho) do canal limitado, sendo a mutação G551D (2-3% das mutações do CFTR) um exemplo. Quanto à classe IV, o defeito genético traduz-se num defeito da condutância do canal, dificultando a passagem dos iões de cloro e bicarbonato. Relativamente às mutações de classe V, apesar de permitirem a formação de um CFTR normal, uma limitação da regulação da transcrição resulta numa quantidade diminuída de proteína produzida. Por último, as mutações de classe VI condicionam um elevado *turnover* do CFTR na superfície dos canais (2).

Esta disfunção do CFTR na FQ afeta, portanto, a função de diversos órgãos limitados por epitélio. Esta alteração conduz a uma grande variedade de manifestações da doença, incluindo patologia das vias aéreas, insuficiência pancreática, ileus meconial, infertilidade masculina e níveis elevados de sal no suor (8).

Ao nível das vias aéreas, a disfunção do CFTR induzida por mutações destrói o equilíbrio delicado dependente deste transportador, levando a doença pulmonar obstrutiva grave, com redução da secreção de sal, aumento da viscosidade e adesão do muco (muco desidratado) e pH e quantidade do ASL diminuídos. Com efeito, a FQ é uma doença que se caracteriza por infeções brônquicas recorrentes, inflamação aumentada e mantida, bem como progressiva obstrução das vias aéreas e, por fim, insuficiência respiratória (3,4,9).

O diagnóstico de FQ implica um fenótipo consistente e evidência de disfunção do CFTR (prova do suor positiva ou alteração da diferença de potencial nasal) ou identificação de dois alelos do gene em causa mutados (10). A heterogeneidade clínica na FQ pode ser explicada, até certo ponto, pelas diferentes consequências a nível molecular condicionadas pelas várias mutações do gene do CFTR envolvidas. Contudo, outros genes e fatores ambientais parecem modificar o fenótipo. De facto, verifica-se que certas patologias podem resultar de disfunção do CFTR sem no entanto preencherem os critérios de FQ (11).

Neste sentido tem-se, por um lado, uma variação desta doença designada FQ atípica ou não clássica, que corresponde a cerca de 2% das pessoas afetadas, apresentando estes doentes um fenótipo ligeiro. Esta entidade inclui doentes com pelo

menos um sistema de órgãos afetado e concentração de cloro no suor normal ou *borderline*. Geralmente estes casos manifestam-se apenas na idade adulta ou adolescência e têm suficiência pancreática e doença pulmonar mais leve, possuindo igualmente duas mutações do CFTR (11,12).

Por outro lado, os portadores de mutações do CFTR (heterozigóticos), geralmente não sofrem de patologia determinada por esta alteração genética. No entanto, reconhece-se a existência de doenças associadas ao CFTR (*CFTR-related diseases*), referindo-se a entidades patológicas conhecidas que parecem ser influenciadas pelo genótipo do CFTR, sem no entanto completarem critérios para o diagnóstico de FQ ou seguirem um padrão mendeliano de hereditariedade (11). Neste âmbito, sabe-se que mutações do gene do CFTR poderão ter influência na fisiopatologia de patologias pulmonares como nas DB, ABPA, sinusite, DPOC, asma e enfisema pulmonar. Provavelmente, estas doenças serão condicionadas de forma multifatorial por fatores genéticos não relacionados com o CFTR, assim como por influências ambientais não genéticas, além do potencial papel fisiopatológico de mutações do gene do CFTR. De igual forma, alterações genéticas do CFTR surgem associadas a outras patologias não respiratórias como a ausência congênita bilateral de vasos deferentes (CBAVD, doença associada ao CFTR melhor caracterizada), azoospermia obstrutiva, pancreatite crónica e hipertripsinemia neonatal (7–9,12,13).

Disfunção do CFTR Adquirida

Tal como referido anteriormente, é, efetivamente, possível que a disfunção do CFTR seja adquirida durante a vida, apesar de não determinada geneticamente, havendo recentemente uma crescente evidência deste facto. Com efeito, o processamento, reciclagem endocítica e função do CFTR *wild-type* podem, de facto, ser significativamente reduzidos por influência de diferentes insultos ambientais, incluindo, nomeadamente, a exposição a fumo de tabaco, álcool e metais pesados, a hipóxia e acidose locais e a inflamação, contribuindo potencialmente estes insultos para a fisiopatologia de várias patologias das vias aéreas, como, por exemplo, a DPOC (9).

Efetivamente, apesar de poder ser observado um aumento transitório da função do CFTR após uma exposição aguda a alguns agentes ambientais como toxinas, citocinas pró-inflamatórias e oxidantes, a exposição mantida a estes agentes, leva a uma redução significativa da função do CFTR. Assim, enquanto um aumento do transporte de iônico dependente do CFTR em resposta a tais estímulos agudos poderá ter como objetivo uma mais fácil eliminação de produtos potencialmente danosos da superfície epitelial das vias aéreas (secreções mais fluídas), por outro lado, a diminuição da função do CFTR em resposta a uma exposição crónica aos mesmos agressores permite um aumento da abundância e viscosidade do muco, que provavelmente reflete uma necessidade adaptativa de proteção das vias aéreas. No entanto, este mecanismo fisiológico adaptativo poderá também contribuir para a fisiopatologia de determinadas doenças da *clearance* de muco (MCC), como a DPOC, tal como explicitado à frente (3).

Em seguida discriminam-se os agentes ambientais que se sabe poderem conduzir a disfunção adquirida do CFTR, possíveis mecanismos envolvidos e evidência científica que serve de base a esta informação.

Exposição do fumo do tabaco e disfunção adquirida de CFTR

O fumo do tabaco (FT) é um dos agentes ambientais melhor estudados no que toca à indução de disfunção do CFTR. Dados científicos publicados por múltiplos laboratórios indicam com um grau elevado de certeza que a exposição ao fumo do tabaco conduz a uma inibição do CFTR, levando a atraso no transporte mucociliar e estase de muco. Estudos recentes *in vivo* em humanos mostram adicionalmente a ocorrência de disfunção adquirida do CFTR em doentes com DPOC e que este defeito pode persistir tanto no pulmão como em outros órgãos apesar da cessação tabágica (14).

Dados experimentais *in vitro* têm demonstrado desde 1983, que exposições a fumo de tabaco induzem disfunção do CFTR, tendo sido esta relação extensamente estudada desde então. Com efeito, quatro estudos independentes reportaram uma associação robusta entre o fumo do tabaco e uma atividade diminuída do CFTR *in vitro*, tendo cada um deles chegado a esta conclusão através de diferentes avaliações (diferença de potencial nasal- NPD; diferença de potencial nasal nas vias aéreas

baixas, concentração de cloro no suor e taxa de produção de suor). Outros estudos demonstraram também que em resposta à exposição ao fumo do tabaco (com extrato de fumo de tabaco – EFT) ocorria uma diminuição dos níveis do RNA mensageiro (mRNA) do CFTR, da expressão proteica e da função deste canal iónico.

Note-se que ainda em estudos *in vitro* envolvendo células epiteliais das vias aéreas foi possível apurar que esta redução é dose-dependente no transporte iónico de cloro mediado pelo CFTR após exposição a EFT.

Raju e colegas confirmaram *in vivo* a inibição do CFTR pelo FT num modelo de rato, tendo demonstrado que exposição ao FT leva a uma diminuição da atividade do CFTR (14).

Importa referir que a alteração da função do CFTR dos macrófagos expostos a fumo de tabaco afeta a capacidade de fagocitose e eliminação de bactérias por estas células e pode contribuir para a sobrevivência aumentada das bactérias nas vias aéreas de ratos expostos repetidamente ao fumo de tabaco por três semanas (3).

Apesar de a inibição da atividade do CFTR induzida pelo fumo do tabaco ser apenas parcial esta diminuição funcional é equivalente à observada em doentes com mutações do CFTR classificadas como ligeiras/variáveis associadas a FQ clínica (6).

Adicionalmente, foi demonstrado que o FT reduz a profundidade do ASL por internalização parcial do CFTR, sendo que estes efeitos da exposição ao EFT não se limitaram às vias aéreas, tendo-se observado efeitos semelhantes em células epiteliais intestinais e dos seios perinasais (14). De facto, uma *cohort* publicada em 2013 de fumadores e ex-fumadores com e sem DPOC descreveu um aumento da concentração de cloro no suor nestes indivíduos quando comparados com os controlos (nunca fumadores e saudáveis), bem como certas doenças extrapulmonares associadas a mutações do gene do CFTR se correlacionam independentemente com a exposição FT/fumadores, apoiando estes factos que a diminuição de função do CFTR ocorre não só nas vias respiratórias, mas também noutros tecidos (15,16).

Relativamente aos mecanismos moleculares e celulares que medeiam o efeito em causa, a exposição ao fumo do tabaco demonstrou afetar a transcrição do gene do CFTR, a probabilidade de abertura deste canal, assim como reduziu a quantidade e estabilidade do mRNA e da proteína madura do CFTR, podendo inclusive conduzir a

remoção do CFTR da membrana plasmática através de um aumento do cálcio citoplasmático (3,4,14).

No que diz respeito aos elementos do fumo do tabaco que conduzem aos mecanismos referidos e, posteriormente, às alterações da função do CFTR, importa referir as evidências conhecidas (14).

Neste âmbito, estudos indicam que a nicotina e a cotinina não terão um papel preponderante na mediação da disfunção do CFTR induzida pelo fumo do tabaco.

Por outro lado, o cádmio e a acroleína parecem ser elementos de elevada relevância na indução de disfunção do CFTR pelo fumo do tabaco, sendo que estes seus efeitos nocivos parecem ser atenuados com o recurso a antioxidantes (3). Destaca-se, portanto, o stress oxidativo, sendo que os fumadores têm um número aumentado de macrófagos alveolares, os quais são constantemente estimulados a libertar quantidades aumentadas de espécies reativas de oxigénio, simultaneamente há uma libertação aumentada de IL-8 pelo epitélio respiratório que leva a migração de um grande número de neutrófilos, contribuindo ainda mais para o stress oxidativo na superfície do epitélio respiratório. Por outro lado, o fumo do tabaco em si constitui uma fonte significativa de oxidantes, incluindo radicais livres e metais tóxicos (como cádmio e acroleína). Estudos de linhagens celulares com CFTR *wild type* demonstraram que uma exposição prolongada das células a stress oxidativo conduz a uma diminuição da expressão do gene, dos níveis proteicos e da função do CFTR, juntamente com outras alterações fisiológicas que fazem parte da resposta antioxidante. Assim, estas observações apoiam fortemente a hipótese de que a modulação da expressão do CFTR após várias exposições a oxidantes representa uma resposta fisiológica coordenada, com efeitos nocivos ao nível da MCC (3).

Quanto às substâncias que podem condicionar este stress oxidativo, demonstrou-se que a acroleína (é um composto de aldeído insaturado obtido pela desidratação da glicerina) presente no fumo do tabaco inibe a função de canal do CFTR, sendo este efeito parcialmente atenuado com recurso a antioxidantes. Em estudos *in vitro* e *in vivo* a acroleína causou reduções agudas e dose dependentes da função do CFTR nas vias aéreas e em tecidos extrapulmonares. (3,14). Em adição, o cádmio é um metal pesado tóxico com 20 a 30 anos de semi-vida, que se acumula nos pulmões de fumadores. Este diminui a expressão e função da proteína CFTR nas

células brônquicas epiteliais humanas, relacionando-se os níveis de cádmio no pulmão, independentemente da duração dos hábitos tabágicos, com a gravidade da DPOC em doentes. Assim, estes dados sugerem que a acroleína e o cádmio são importantes contribuidores para a disfunção do CFTR causada pelo fumo do tabaco (3,14).

Por outro lado, o nível de arsénio, outro elemento do fumo do tabaco altamente tóxico, está aumentado nos fumadores e diminui a expressão de CFTR. Por último, o tabaco constitui um aerossol ácido, expondo as vias aéreas a um pH reduzido, o que, por si só, é suficiente para diminuir a função do CFTR, podendo, inclusive, aumentar de forma sinérgica os efeitos inibitórios sobre o CFTR dos outros componentes do fumo do tabaco (3,14).

Assim, o tabaco pode afetar a expressão e função do CFTR através de mais do que um mecanismo, destacando-se que mesmo a exposição passiva a fumo de tabaco pode condicionar uma diminuição da função do CFTR. De facto, um estudo demonstrou que, *in vitro*, ocorre uma diminuição da função do CFTR após exposição a FT, assim como a exposição a FT se associa a um aumento da acroleína e a um atraso da MCC (3,14).

Por último, relativamente aos efeitos do tabaco na disfunção do CFTR, coloca-se a questão de que se esta função reduzida se mantém ou não após a cessação tabágica. Apesar de o NPD em ex-fumadores com DPOC poder revelar valores normais de transporte de cloro, sugerindo uma recuperação da função do CFTR, a recuperação da função do CFTR parece ser diferente nos pulmões e nas vias aéreas da cavidade nasal, sendo importante medir a diferença de potencial nas vias aéreas inferiores (LAPD). De facto, a correlação entre a LAPD e a NPD pode ser fraca, sobretudo em ex-fumadores, onde um defeito parcial do transporte de cloro pode manter-se apesar da cessação tabágica, o que sugere que um defeito parcial da função do CFTR pode manter-se. Com efeito, fatores locais únicos das vias aéreas inferiores poderão contribuir para esta diferença, nomeadamente insultos adicionais como, por exemplo, uma degradação mantida do CFTR pela elastase neutrofílica humana, bem como a hipoxia local nas vias aéreas inferiores (6,17). Assim, existe evidência de que, mesmo após a cessação tabágica, alguma disfunção tabágica pode persistir tanto no pulmão (sobretudo nas vias aéreas inferiores) como em outros órgãos e sistemas (14).

A diminuição do transporte aniônico mediado pelo CFTR como consequência do fumo do tabaco foi extensamente validada por diversos estudos, sendo que os mecanismos envolvidos claramente implicam disfunção do CFTR. Destacam-se os estudos que demonstram, *in vivo*, que a exposição a fumo de tabaco afeta marcadamente a função do CFTR em fumadores saudáveis e com DPOC. Conseqüentemente, as vias aéreas da nasofaringe, o parênquima pulmonar e tecidos sistêmicos de indivíduos expostos ao fumo de tabaco estão todos em risco de conseqüências significativas da disfunção do CFTR, como explicitado à frente (3).

Outros fatores ambientais que podem condicionar disfunção do CFTR

Tal como referido, existem outros fatores além da exposição ao fumo do tabaco que podem condicionar uma disfunção do CFTR.

Em primeiro lugar, a exposição a determinadas substâncias pode condicionar as alterações do CFTR em causa, nomeadamente a exposição ao álcool. Efetivamente um consumo abusivo de álcool está associado a um risco aumentado de infeções respiratórias, sendo que a exposição *in vitro* de células epiteliais ao etanol condiciona uma redução dose dependente do transporte iônico de cloro mediado pelo CFTR, sugerindo então que *in vivo* poder-se-á verificar a mesma disfunção do CFTR (16,18). Adicionalmente, metais pesados como o cádmio (já referido e presente no fumo do tabaco) também já foram descritos como responsáveis por efeitos negativos na função do CFTR (6,19).

Por outro lado, condições locais como estados pró-inflamatórios, hipóxia, acidose e stress oxidativo também podem condicionar alterações da função do CFTR.

Com efeito, os níveis de oxigénio, nomeadamente a hipóxia, podem condicionar em células humanas uma diminuição significativa e reversível do mRNA, proteína e função do CFTR, sendo os mesmos efeitos verificados em ratos *in vivo*. De referir ainda que, em tecidos pulmonares hipoxémicos humanos (retirados antes de um transplante pulmonar), encontra-se, também, uma diminuição do mRNA do CFTR. Um estudo recente demonstrou uma redução de cerca de 60% da função do CFTR em alpinistas. Neste sentido, uma diminuição da MCC pode obstruir segmentos extensos da superfície pulmonar em doenças como a FQ, DPOC e asma, sabendo-se que

camadas espessas de muco cobrindo significativas regiões do pulmão podem afetar o suprimento de oxigênio local. Posto isto, os estudos referidos apontam para a possibilidade de este estado de hipóxia local e deficiência de mRNA do CFTR consequente poderem ser potenciais contribuidores para a obstrução mediada pelo muco, formação de bronquiectasias e lesão pulmonar num contexto clínico, fazendo parte da fisiopatologia da FQ bem como de outras doenças pulmonares com alterações da MCC mais comuns. Assim, fatores ambientais que induzem hipoxia regulam o mRNA do CFTR e o transporte epitelial de cloro *in vitro* e *in vivo*, podendo ter implicações clínicas relevantes (20).

Em adição, a reposta a um estado de stress oxidativo elevado, assim como um estado de acidose local, condicionados pela exposição ao aerossol ácido do fumo do tabaco ou por outros estímulos ambientais com os mesmos efeitos, como já referido, podem igualmente conduzir a uma disfunção do CFTR (3).

Por último, estados pró-inflamatórios também se associam a disfunção do CFTR. Tal como demonstrado por Rab *et al.*, ambientes pró-inflamatórios induzem UPR (*unfolded protein response*) e, consequentemente reduzem a função do CFTR (6). Também existe evidência de que, especificamente, a inflamação neutrofílica pode reduzir a função do transportador iónico referido, nomeadamente demonstrou-se que a elastase neutrofílica degrada o CFTR e inibe o transporte iónico mediado pelo mesmo (14).

Assim, constata-se que diversos elementos, além da exposição ao fumo do tabaco, podem conduzir a disfunção adquirida do CFTR, sendo que mais estudos serão necessários para compreender qual a contribuição relativa de cada um destes fatores para a alteração da função do transportador iónico em causa. Denote-se que estes elementos poderão contribuir para a manutenção da disfunção do CFTR observada após a cessação tabágica nos fumadores.

Disfunção do CFTR e doenças respiratórias

Após explicitadas as formas como diversos fatores podem conduzir a disfunção do CFTR (adquirida ou não) e às alterações consequentes do transporte iónico e da MCC, importa agora compreender de que forma esta disfunção pode ter de facto um papel na fisiopatologia e, eventualmente, na gravidade de certas doenças das vias respiratórias.

Implicações da disfunção do CFTR na DPOC

A DPOC é uma doença associada aos hábitos tabágicos com grande e crescente relevância socioeconómica, sobretudo nos países desenvolvidos, prevendo-se que, em 2030, seja a terceira causa de morte e morbidade no Mundo. Esta patologia caracteriza-se por obstrução do fluxo aéreo expiratório persistente (não totalmente reversível) e progressiva, associando-se a um conjunto de sintomas e sinais respiratórios e sistémicos. Com efeito, dispneia, tosse, sibilos, fadiga, distúrbios do sono, bem como ansiedade e depressão são frequentes nestes doentes. Apesar das diversas estratégias terapêuticas aplicadas a estes doentes, muitos continuam a ter sintomas regulares que afetam as suas atividades da vida diária, conduzindo a uma significativa morbidade (21,22).

Na DPOC, existem três componentes, o enfisema (definido anatomicamente), a bronquite crónica (definida clinicamente) e também doença das pequenas vias aéreas (com estreitamento dos bronquíolos distais). Os doentes com DPOC, historicamente, foram agrupados em duas categorias, conforme o componente da DPOC predominante (enfisema ou bronquite). No entanto, a maior parte os doentes apresenta elementos de ambas as componentes e o exame físico não permite diferenciá-las adequadamente. Evidência científica mais recente permitiu evidenciar características adicionais da DPOC que contribuem para o fenótipo dos doentes, incluindo a propensão para desenvolver exacerbações frequentes, caquexia e hiperreactividade brônquica. De facto, há necessidade de uma abordagem mais dirigida que identifique as subpopulações de doentes com DPOC, através de características clínicas ou moleculares discretas, que permita definir subfenótipos.

Estes subfenótipos poderiam permitir, por exemplo, uma terapêutica personalizada mais eficaz (14).

Semelhanças DPOC – FQ

Existe uma sobreposição considerável no fenótipo clínico de pacientes com FQ e DPOC, estando ambas associadas a alterações da *clearance* e hipersecreção de muco e, conseqüentemente a doença obstrutiva das vias aéreas (14).

Indivíduos com DPOC apresentam, frequentemente, características fisiopatológicas semelhantes às da FQ, incluindo estase e acumulação de muco e, tal como na FQ, na DPOC a principal característica trata-se da restrição do fluxo de ar (6,14). Em ambas estas patologias ocorre hipersecreção e acumulação de muco e hiperplasia de células caliciformes, assim como, já foi reportada uma alta incidência de bronquiectasias nos doentes com DPOC. Estas alterações patológicas conduzem a ineficaz MCC, colonização bacteriana crónica e inflamação neutrofílica persistente, tal como na FQ (6,14).

Características comuns entre a DPOC e a FQ estendem-se além dos tecidos pulmonares, nomeadamente alterações ósseas, da regulação da vitamina D e patologia cardiovascular. Estas manifestações extrapulmonares da DPOC e FQ são áreas ainda em investigação e que podem estar associadas a disfunção do CFTR (3).

À medida que a DPOC se agrava, os doentes desenvolvem agravamento da obstrução das vias respiratórias, dispneia progressiva, inflamação mantida das vias aéreas, infeções brônquicas crónicas e exacerbações respiratórias agudas. Sendo que cada uma destas manifestações também constituiu uma característica cardinal da doença pulmonar na FQ, levantando a possibilidade da existência de vias comuns nos mecanismos que conduzem a DPOC e FQ. Tendo em conta também a supressão do CFTR causada pelo tabaco, inflamação neutrofílica e hipóxia referidas anteriormente, existe então uma forte probabilidade de que a disfunção do CFTR pode ter um papel relevante na fisiopatologia da DPOC, podendo esta condicionar as tais vias comuns (3,14).

Por fim, tal como referido, determinantes das variantes fenotípicas da DPOC não são completamente compreendidos e provavelmente refletem a heterogeneidade

dos modificadores genéticos desta doença, tal como já foi reportado em relação à FQ (3).

Disfunção CFTR e DPOC

Efetivamente, nos doentes com DPOC tende a ocorrer uma atividade reduzida do CFTR, tanto nas vias aéreas superiores como nas inferiores.

De facto, doentes com DPOC apresentam níveis reduzidos de expressão e atividade (diminuição em cerca de 50%) do CFTR, medidos através da NPD. Este defeito no transporte do cloro observado não é explicado por alterações da integridade da mucosa do nariz e parece ser específico do CFTR. No sentido de confirmar que estas alterações se encontram igualmente presentes nos pulmões, também foi medida a LAPD nos doentes com DPOC (sedados), tendo-se verificado igualmente um declínio marcado da atividade do CFTR (também uma diminuição em cerca de 50%) (14).

Por último, a alteração da função do CFTR descrita na DPOC reflete-se igualmente fora das vias respiratórias, nomeadamente nas glândulas sudoríparas e em intestino humano, verificando-se uma redução da função do CFTR semelhante à observada em doenças associadas ao CFTR (redução de cerca de 50% nas glândulas e de 60% no intestino). Assim, estes resultados sugerem que anomalias da função do CFTR na DPOC podem igualmente ocorrer em locais longe da inalação direta, mesmo em indivíduos que já não fumam (14).

Concluindo, níveis relevantes de disfunção do CFTR estão presentes nos pulmões e tecidos extrapulmonares dos doentes com DPOC e podem ser detetados através de marcadores *in vivo* (14).

Apesar de a relação da disfunção do CFTR ser mais evidente ao nível das manifestações da bronquite crónica (ao condicionar alterações da *clearence* e acumulação de muco, por exemplo), esta alteração da função também se associa à ocorrência enfisema.

Com efeito, o CFTR está envolvido na regulação da síntese de ceramida e na sinalização na lesão pulmonar e enfisema, sendo que a disfunção do CFTR leva a

acumulação de ceramida. Por sua vez esta acumulação associa-se ao desenvolvimento de DPOC e inflamação pulmonar crónica, correlacionando-se a quantidade de ceramida de forma direta com a gravidade do enfisema e inversamente com a função do CFTR. A ceramida é um lípido composto pelo álcool esfingosina e um ácido gordo de cadeia longa, é a molécula base dos esfingolípidos, muito abundantes na bicamada lipídica das membranas celulares. Neste sentido, a hipofunção do CFTR conduz a acumulação de ceramida, lesão pulmonar e enfisema, o que poderá ter implicações terapêuticas como referido à frente (5).

Além disso, em diversos modelos de ratos, reduções da abundância da proteína CFTR observaram-se em associação com o enfisema induzido pelo tabaco (3). Por fim, a obstrução mucosa (associada a disfunção do CFTR) ocorre na maioria dos doentes com DPOC, incluindo nos que apresentam um fenótipo predominantemente enfisematoso, apesar de esta característica ser clinicamente mais evidente nos doentes com bronquite crónica (22).

Causas da disfunção do CFTR na DPOC

Relativamente às causas que podem potenciar a disfunção do CFTR na DPOC, tem-se, por um lado, os fatores ambientais já explicitados que com frequência se associam a esta patologia. Neste âmbito importa referir a exposição ao fumo do tabaco, hipóxia e acidose local, stress oxidativo e estado pró inflamatório, destacando-se relativamente a este último os níveis elevados de elastase neutrofílica (induz degradação do CFTR) presentes nas vias aéreas dos doentes com DPOC (14).

Por outro lado, a disfunção do CFTR presente na DPOC parece ser influenciada pelo património genético dos doentes, assim como pode influenciar os padrões de expressão genética. De facto, devido às semelhanças em diversas manifestações clínicas da FQ e DPOC, alguns investigadores tentaram perceber se havia uma correlação entre mutações do gene do CFTR e o risco de DPOC. Logicamente, no início grande foco foi colocado na mutação que mais frequentemente causa FQ, F508del, a qual condiciona uma redução de 50% da função do CFTR. No entanto, apesar de portadores da mutação em causa apresentarem reduções do FEV1 (volume de ar expirado no primeiro segundo de uma expiração forçada) e da FVC (capacidade vital forçada) quando comparados com uma

população sem mutação, estudos foram incapazes de demonstrar um risco aumentado de DPOC nestes indivíduos heterozigóticos. Contudo, em alguns estudos reportou-se uma incidência aumentada dos alelos R57Q e M470V do CFTR em indivíduos com DPOC. Sendo mesmo que a variante M470V tem sido associada a uma diminuição de 3 a 4 vezes o risco de DPOC grave. Assim, mutações do CFTR poderão efetivamente contribuir para a disfunção do CFTR e influenciar o fenótipo na DPOC (3,23).

Disfunção do CFTR e clínica da DPOC

A disfunção do CFTR observada na DPOC leva, portanto, a alterações do transporte mucociliar com uma diminuição da MCC, contribuindo para a estase do muco e obstrução das vias aéreas, além da já referida associação com o enfisema (6).

Neste sentido, existe, efetivamente, evidência científica de que a disfunção do CFTR pode correlacionar-se de forma significativa com o fenótipo na DPOC, condicionando as manifestações clínicas e, inclusive, a gravidade desta patologia. Este facto reveste-se de lógica dado que a estase de muco (propiciada pela hipofunção do CFTR) é um importante preditor da morbidade e da mortalidade na DPOC (6).

Com efeito, *in vivo*, a diminuição da atividade do CFTR medida através NPD foi preditiva da gravidade dos sintomas de bronquite (determinados através da escala *Breathless Cough and Sputum Score - BCSS*). Mais, doentes com DPOC e história de exacerbações no último ano demonstraram uma função do CFTR inferior em 35% face àqueles sem história de exacerbações. Tal como na NPD, na LAPD e nos tecidos extrapulmonares (intestino e glândulas sudoríparas) as diminuições de função do CFTR associaram-se a dispneia e a bronquite crónica, influenciando a gravidade da DPOC (14). Por último, um estudo confirmou que doentes com disfunção mantida do CFTR estão mais predispostos a sintomas secundários ao atraso do transporte mucociliar, havendo uma relação desta hipofunção com a gravidade da tosse crónica diária, independentemente da cessação tabágica (6).

Assim, estes resultados apontam para o facto de as deficiências adquiridas da atividade do CFTR estarem proporcionalmente relacionadas com a clínica dos doentes, nomeadamente, nos sintomas de bronquite crónica, dispneia, gravidade da DPOC e frequência de exacerbações (14).

Resumindo, existem semelhanças patológicas e fenotípicas entre a DPOC e a FQ, sendo que, de facto, a disfunção do CFTR parece contribuir para o desenvolvimento da DPOC, podendo esta mesma disfunção ser adquirida e/ou ser influenciada por características genéticas do indivíduo. Esta relação da função do CFTR com a DPOC reveste-se de particular importância por se correlacionar com as manifestações clínicas, incluindo a gravidade da doença, o que poderá ter implicações terapêuticas, como referido à frente.

Implicações da disfunção do CFTR na Asma

A asma é uma doença multifatorial associada a uma interação complexa entre fatores ambientais e genéticos. A asma pode definir-se como uma doença inflamatória crónica das vias aéreas, em que ocorrem obstruções do fluxo episódicas e reversíveis. Esta inflamação caracteriza-se patologicamente por infiltração eosinofílica proeminente e recrutamento de células Th2, funcionalmente por hiperreactividade brônquica e clinicamente por tosse, sibilos e dispneia (8,24). Simultaneamente, ocorre alguma remodelação das vias aéreas, com lesão epitelial, espessamento da membrana basal por deposição de colagénio e hipertrofia da camada de músculo liso e das glândulas mucosas. As exacerbações de asma são episódios agudos ou subagudos de agravamento progressivo de sintomas e sinais como dispneia, tosse, sibilos e sensação de aperto torácico. Diversos fatores podem influenciar o desencadear duma exacerbação (14,24).

Neste sentido, o muco resultante do processo inflamatório referido é anatomopatologicamente distinto do dos indivíduos saudáveis, particularmente durante as exacerbações. Este muco alterado na asma apresenta algumas características em comum com o muco presente na FQ, incluindo uma densidade aumentada, alta concentração de proteínas plasmáticas e níveis particularmente elevados de proteases (como a elastase neutrofílica). Com efeito, na asma ocorrem alterações da MCC, podendo também ocorrer dismotilidade ciliar (na sequência de anomalias epiteliais) e bronquiectasias na asma grave. No caso da asma com bronquiectasias, esta tem um prognóstico particularmente mau, incluindo aumento da ocorrência de infeções e da frequência de exacerbações e reduzida resposta à

terapêutica, remetendo estas características igualmente para uma forma ligeira de FQ. Assim, na asma encontram-se, igualmente, características anatomopatológicas e clínicas que remetem para a FQ e sugerem a possibilidade da existência de vias comuns na fisiopatologia destas duas doenças (14).

Posto isto, tem-se investigado de forma extensa de que forma alterações genéticas do gene do CFTR poderão surgir associadas a suscetibilidade aumentada para asma. No entanto, as evidências disponíveis atualmente são inconclusivas e mesmo contraditórias (tendo reportado diferentes estudos uma associação positiva, protetora e nula entre asma e mutações do CFTR), para determinar se os doentes com asma terão disfunção do CFTR determinada geneticamente (8,14). De facto, um estudo de Schroeder e colegas reportou, inicialmente, um efeito protetor para a doença asmática em heterozigóticos para a mutação F508del, enquanto um estudo maior dinamarquês refutou esta associação e reportou uma correlação da heterozigotia para a mutação F508del com uma obstrução das vias aéreas mais grave (14). Simultaneamente, uma evidência mais recente sugeriu uma associação entre a asma brônquica do tipo neutrofílica e heterozigotia para a mutação F508del (14). Estes resultados contraditórios podem dever-se a diferenças nos grupos étnicos selecionados para os estudos ou à influência significativa dos fatores ambientais na patogénese da asma (8).

Destaca-se, adicionalmente, um estudo mais recente do que os referidos, com foco na população indiana que analisou a frequência de 6 mutações (F508del, G542X, G551D, R117H, W1282X, e S549N) e um polimorfismo (IVS8 T5) do gene CFTR, tendo encontrado resultados interessantes (7). Verificou-se, nomeadamente, uma prevalência aumentada, de cerca de 24% de heterozigotia destas alterações do CFTR nos doentes asmáticos (face a 9,3% no grupo controlo), sendo a alteração mais frequente o polimorfismo IVS8 T5 (este alelo conduz a uma proteína CFTR com uma condutância de cloro alterada, podendo aumentar a suscetibilidade para doenças obstrutivas pulmonares), presente em 42% destes doentes heterozigóticos, seguido, por ordem decrescente de frequência, pelas mutações G551D (23%), G542X (18%), S549N (8%), F508del (7%) e R117H (2%) (7). Em relação à mutação G551D, um estudo caso controlo dos mesmos autores em crianças indianas demonstrou uma frequência aumentada da mutação G551D nos doentes asmáticos e uma redução mais marcada do FEV1 e da FVC nos portadores dessa mutação, remetendo para um risco

aumentado de asma e da gravidade dessa doença nestes doentes (24). Neste sentido, apesar de uma influência contraditória da mutação mais frequente na FQ (F508del) encontrada em diferentes estudos, há evidência de que outras mutações e polimorfismos do CFTR poderão ter um papel singular e relevante na fisiopatologia e, mesmo, na gravidade da asma, dada a sua prevalência aumentada (7,24).

Concluindo, há necessidade de mais investigação em diferentes populações com asma e com critérios bem definidos para compreender que influência poderão ter as diferentes mutações e polimorfismos do gene do CFTR na etiologia e fenótipo dos doentes com asma (8,14). Assim, mais evidência científica poderá de facto permitir compreender a importância relativa dos efeitos compostos dos múltiplos alelos do CFTR existentes, dos genes modificadores, dos fatores ambientais e de características étnicas na asma.

Por outro lado, colocou-se igualmente a hipótese de poder ocorrer disfunção adquirida do CFTR nos doentes asmáticos, nomeadamente induzida pela inflamação crónica que caracteriza esta patologia (na ausência de mutações genéticas). No sentido de clarificar esta hipótese realizaram-se estudos *in vitro* e *in vivo*, com exposição a interleucinas Th2 que têm um papel central na asma alérgica, como a IL-13 e a IL-4. Com efeito, estudos *in vitro* analisaram os efeitos da exposição à IL-13 em células humanas epiteliais das vias aéreas, sendo que, uma exposição aguda reduzia os níveis da proteína madura CFTR na superfície da membrana celular destas células. Por outro lado, uma exposição crónica a esta interleucina e à IL-4 aumentou a condutância de cloro dependente do CFTR. Igualmente, estudos *in vivo* demonstraram aumento da atividade do CFTR na traqueia excisada de ratos após exposição a IL-13. Apesar destes modelos sugerirem um aumento e não uma redução do transporte mediado pelo CFTR, estes focaram-se em vias inflamatórias características da asma alérgica, podendo não se aplicar aos casos de asma grave e durante as exacerbações em que há uma tendência no sentido do predomínio de uma inflamação neutrofílica, que se aproxima mais do padrão da FQ e da bronquite crónica (14). Resumindo, permanece a possibilidade de a disfunção adquirida do CFTR ter um papel importante na asma neutrofílica, apesar de na asma com domínio eosinofílico na inflamação parecer protegida deste mecanismo mal adaptativo com hipofunção do CFTR. Destaca-se igualmente a possibilidade de outros fatores ambientais, como a hipóxia

local (uma diminuição da *clearence* de muco pode obstruir segmentos extensos da superfície pulmonar e afetar o suprimento de oxigénio local), poderem condicionar disfunção do CFTR (20), podendo ser relevante medir o transporte dependente do CFTR em doentes asmáticos, nomeadamente através da NPD. Preconiza-se, pois, mais investigação nesta área de forma a permitir eventuais aplicações terapêuticas dirigidas ao CFTR nesta patologia (14).

Concluindo, a disfunção do CFTR seja esta adquirida ou determinada geneticamente parece ter um papel relevante na asma, no entanto as evidências atualmente disponíveis não são claras e importa realizar estudos dirigidos a populações específicas (em termos de etnia e fenótipo da asma, por exemplo) por forma a clarificar o papel da hipofunção do CFTR nesta doença.

Implicações da disfunção do CFTR na Aspergilose Broncopulmonar Alérgica

A ABPA constitui uma complexa reação de hipersensibilidade secundária à presença de *Aspergillus fumigatus* na árvore traqueobrônquica. Esta reação complica o curso clínico de 2-32% dos asmáticos e 1-15% dos doentes com FQ. A ABPA apresenta-se com diversas manifestações clínicas e radiológicas, geralmente com asma não controlada, infiltrados pulmonares e bronquiectasias centrais. Esta doença responde aos glicocorticoides e um diagnóstico e tratamentos precoces podem evitar o desenvolvimento de bronquiectasias, uma manifestação irreversível de lesão pulmonar. O desenvolvimento ou não de ABPA parece ser influenciado por fatores genéticos, tendo sido reportada incidência familiar desta patologia (10).

A ABPA partilha diversas características com a doença pulmonar associada à FQ, incluindo ocorrência de sibilos, infiltrados pulmonares, bronquiectasias proximais e impaction mucóide. Adicionalmente, a ABPA pode também complicar o curso clínico da FQ, sugerindo que a disfunção do CFTR pode estar envolvida na fisiopatologia da ABPA (10).

Em doentes com FQ, a disfunção do CFTR afeta não só as células epiteliais, mas também os linfócitos, sendo este transportador importante para manter uma relação adequada Th1/Th2 nos linfócitos TCD4. De facto, *in vivo* na ausência do CFTR ocorre uma resposta inflamatória Th2 excessiva em resposta aos antígenos do *A.*

fumigatus. Neste sentido, o CFTR tem influência na diferenciação de células T CD4+, tendo provavelmente um papel importante no desenvolvimento duma resposta imune adequada ao *A. Fumigatus* (10).

Face a esta provável associação de hipofunção do CFTR e ocorrência do ABPA, averiguou-se a possibilidade de mutações do gene deste transportador poderem ter um papel na patogenia da ABPA. De facto, verificou-se uma ocorrência aumentada de uma mutação do CFTR em doentes com ABPA quando comparados com a população em geral, com uma razão de probabilidades (OR) de cerca de 10,39. Também em comparação com a população asmática no geral se verificou uma maior incidência de heterozigotia para mutações do gene do CFTR na ABPA, com um OR de 5,53. Estes resultados apoiam a possibilidade de mutações do CFTR terem um papel na ABPA (10).

Contudo, nem todos os doentes com ABPA apresentaram mutações do gene do CFTR, o que aponta para a existência de outros genes modificadores que podem influenciar a ocorrência desta patologia. Por outro lado, pode pensar-se também que as mutações do gene do CFTR influenciem a gravidade da ABPA apesar de não serem um fator necessário para o desenvolvimento desta doença. Efetivamente, há uma maior prevalência das mutações em causa em doentes com ABPA grave, assim como, quanto maior o grau de disfunção que se sabe que é condicionado por uma mutação, maior a gravidade da ABPA. Por exemplo, num estudo, doentes com CFTR com uma função menor (mutações classes I-III), apresentaram uma doença mais grave do que doentes com mutações que condicionam menor disfunção deste transportador (IV-V). Assim, a ABPA parece poder constituir uma doença associada ao CFTR (10).

Concluindo, parece haver uma associação entre mutações do gene do CFTR e a ABPA, podendo estas mutações, inclusive, condicionar a gravidade da doença. Este facto pode ajudar a identificar grupos com risco de desenvolver ABPA, permitindo uma intervenção e eventual prevenção precoces. Por último, a ABPA parece ser uma doença com herança poligénica, onde mutações em diferentes vias interagem com fatores ambientais, culminando no fenótipo dos doentes (10).

Implicações da disfunção do CFTR nas Bronquiectasias Difusas (DB) não associadas a FQ

As DB são definidas como uma dilatação anormal e irreversível dos subsegmentos proximais dos brônquios. Os sintomas principais incluem tosse crónica, expectoração purulenta e infeções respiratórias inferiores recorrentes, assim como a maioria dos doentes apresenta um grau variável de obstrução brônquica. Existem diversas causas de DB como FQ, infeções na infância, defeitos da imunidade, ABPA, aspiração de irritantes, discinesia ciliar primária, doenças do tecido conjuntivo, colite ulcerosa, défice de alfa-1 antitripsina, entre outros. Contudo, em cerca de 50% dos casos não é possível identificar uma causa (25).

No caso de DB causadas por FQ, podem surgir associadas outras características típicas da FQ (por exemplo insuficiência pancreática e infertilidade masculina), podendo no entanto as DB ser o único sintoma clínico. O diagnóstico baseia-se em valores anormais do teste do suor (concentração de cloro no suor superior a 60 mmol/L), identificação de duas mutações causadoras de FQ no gene CFTR e/ou uma NPD anormal (25).

Um estudo de Bienvenu e colegas procurou explorar a associação entre: heterozigotia para mutações do gene do CFTR, disfunção deste transportador nas vias aéreas (através da medição da NPD) e fenótipo clínico nas DB, em doentes com prova do suor normal. O estudo teve como ponto de partida, uma frequência aumentada (30-53%) de mutações do CFTR em doentes com DB e prova de suor normal, reportada anteriormente, o que sugeria que uma heterozigotia do gene do CFTR poderia ter consequências patológicas. No entanto, faltava a estes estudos prévios comprovar uma disfunção do CFTR nas vias aéreas e relacioná-la com o fenótipo clínico (25).

Bienvenu e colegas encontraram, então, um contínuo de disfunção do CFTR (medido através da NPD) na população estudada, desde valores normais nos controlos saudáveis, valores intermédios nos doentes com DB (não associada a FQ) e valores significativamente anormais nos doentes com FQ. Mais, esta disfunção do CFTR relaciona-se com o genótipo, sendo maior nos doentes com DB e mutações do CFTR do que sem mutações (DB0) e, inclusive, a NPD está mais alterada nos doentes com DB e duas mutações do gene do CFTR (DB2) do que nos que apresentam apenas uma mutação do mesmo gene (DB1). Esta correlação do genótipo com a NPD relacionou-

se ainda com características clínicas, nomeadamente com a colonização brônquica por *Staphylococcus Aureus* e *Pseudomonas Aeruginosa*, visto que se demonstrou com uma frequência crescente nos grupos DB0, DB1 e DB2 e correlacionou-se igualmente com o grau de disfunção do CFTR. Por outro lado, correlações entre genótipo, fenótipo electrofisiológico e clínica não se verificaram noutros parâmetros, como foi o caso da avaliação da função respiratória (FEV₁ e FVC) e da idade de início dos sintomas (25).

Os doentes DB2 foram diagnosticados com DB associada a FQ atípica, já que apresentaram um genótipo e fenótipos clínico e electrofisiológico diferentes do esperado numa FQ típica (25).

Assim, verifica-se que mesmo apenas uma mutação do gene do CFTR pode ter consequências patológicas em doentes com DB. De destacar que existem indivíduos heterozigóticos para mutações do gene do CFTR saudáveis, pelo que a heterozigotia por si não é suficiente para desenvolver doença, havendo influência de outros fatores genéticos e ambientais influenciando estes, eventualmente, outros canais iónicos importantes (25).

Concluindo, uma disfunção do transportador do CFTR determinada geneticamente pode contribuir para o desenvolvimento e curso clínico de DB, havendo uma relação entre o genótipo do CFTR (incluindo uma mutação heterozigótica do gene do CFTR) e a disfunção deste nas vias aéreas (medida pela NPD) e o fenótipo clínico dos doentes com DB.

Implicações da disfunção do CFTR na Infecção Pulmonar por Micobactérias não Tuberculosas

As Micobactérias não tuberculosas (NTM) são ubiqüitárias no ambiente, mas raramente causam doença. As NTM historicamente eram vistas como microrganismos de relevância clínica limitada, ofuscadas pela agressiva micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Foi então o surgimento da pandemia do HIV que alertou para o papel das NTM como infecções disseminadas oportunistas *major* (26). Estas infecções micobacterianas não tuberculosas disseminadas ocorrem em contexto de

imunodeficiência. Pelo contrário, infecções pulmonares isoladas por micobactérias não tuberculosas (PNTMI) podem surgir em imunocompetentes (27).

As NTM podem ser transitoriamente isoladas de amostras como expectoração e podem colonizar locais como o pulmão, ou, pelo contrário, causar infecção e doença. A distinção destes dois estados clínicos pode ser complicada, contudo, é importante fazê-lo, pois vai condicionar as decisões clínicas e o prognóstico. Uma definição aceitável de doença pulmonar associada a NTM engloba a existência de manifestações clínicas compatíveis com esta doença em indivíduos com isolamentos repetidos de NTM ao longo do tempo. O tratamento pode ser mal tolerado e é menos eficaz que o da tuberculose. Assim, uma identificação das pessoas em risco é importante pois permite a realização de intervenções dirigidas e de uma potencial prevenção da doença (26).

PNTMI surgem geralmente associadas a doenças com MCC alterada, como a FQ ou discinesia ciliar primária. A suscetibilidade aumentada dos doentes com FQ para PNTMI é clara, sendo que as culturas do trato respiratório de doentes com FQ apresenta uma prevalência 10.000 vezes superior de NTM do que a população em geral (26,27).

Adicionalmente, infecções PNTM também ocorrem num grupo distinto de doentes, nos quais, não se identifica nenhuma causa de base que possa predispor para a ocorrência desta infecção. Em geral, estes doentes costumam ser mulheres de raça branca no período pós menopausa com um morfotipo característico (altas e magras), diagnosticadas na sua sexta década de vida. Verificou-se que estes doentes apresentam uma frequência superior de escoliose, *pectus excavatum*, prolapso da válvula mitral e mutações do gene do CFTR, quando comparada com a observada no grupo controlo. Mais, estes doentes parecem apresentar uma frequência de batimentos ciliares inferior à dos indivíduos saudáveis controlo. Estas características clínicas associadas a uma incidência familiar de infecções PNTM, sugerem que elementos genéticos podem ser importantes na suscetibilidade a esta doença (27).

Dado que as infecções PNTM ocorrem com frequência em doentes com patologias que condicionam uma MCC alterada, inclusive na FQ, torna-se lógico considerar uma possível influência de alterações genéticas do CFTR no desenvolvimento desta infecção. De facto, sabe-se que o grupo de doentes com infecções PNTM sem doença de base conhecida apresenta uma taxa de heterozigotia para mutações do gene CFTR superior à do grupo controlo (27).

Com o objetivo de esclarecer esta influência genética na PNTM foi feita sequenciação genética completa dos exomas de 69 doentes de raça branca com PNTM, tendo sido comparada com as do grupo de controlo. Com efeito, neste estudo verificou-se que os doentes com PNTM têm uma taxa aumentada de variantes de genes do sistema imunitário, do CFTR, dos cílios e do tecido conjuntivo, assim como uma maior probabilidade de apresentarem variantes em múltiplas categorias de genes, quando comparados com os indivíduos do grupo controlo e com os seus familiares não afetados (27).

Destaca-se que ocorre uma associação de doença pulmonar por NTM em pessoas com doenças estruturais pulmonares, nomeadamente DPOC e bronquiectasias (prevalência NTM nas bronquiectasias, de cerca 9,3%), sendo que em ambas as doenças a disfunção do CFTR parece igualmente ter um contributo (26).

Assim, a suscetibilidade para infeções PNTM parece ser multigénica, resultando o fenótipo dos doentes da combinação de variações em diferentes categorias genéticas, incluindo mutações do CFTR, combinadas com influência de fatores ambientais (27).

Potenciais Implicações Terapêuticas

Perante a evidência referida de que existe influência do CFTR no desenvolvimento das diversas doenças respiratórias referidas, torna-se interessante e lógico procurar novas opções terapêuticas para as patologias em causa dirigidas a este defeito.

Terapêuticas dirigidas na FQ

Atualmente existem estratégias terapêuticas cujo mecanismo de ação é dirigido ao defeito do CFTR, estando em investigação diversas abordagens e dois fármacos já foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da FQ.

Por um lado, existem os moduladores do CFTR, que têm como alvo o defeito da proteína do CFTR condicionado pela(s) mutação(ões) do gene do CFTR em causa. Estes moduladores são pequenas moléculas dirigidas a defeitos distintos do CFTR, constituindo os potenciadores, corretores e agentes *read-through* da tradução / supressões de codões *stop* prematuros, que intervêm no *gating*, processamento e síntese do CFTR, respetivamente. Deste modo, os potenciadores aumentam a probabilidade de abertura do canal do CFTR, sendo úteis nas mutações classe III e IV, e, eventualmente (necessitam que o CFTR esteja na membrana celular), quando combinado com outros agentes nas classes I e II. Os corretores parecem ser úteis nas mutações tipo II, aumentando a disponibilidade de CFTR funcional na superfície celular e os agentes *read-through* poderão ser úteis sobretudo nas mutações classe I, conduzindo à produção de uma proteína CFTR completa. Por último, existem ainda outros moduladores do CFTR em desenvolvimento clínico (fase Ib), incluindo agentes que modulam a via do NO (monóxido de azoto) (2,28,29).

Por outro lado, a terapia génica poderá também vir a ser uma opção terapêutica na FQ, esta procura fornecer cópias da sequência codificadora *wild-type*, permitindo a formação de uma proteína CFTR normal. No entanto, ainda tem de haver uma otimização desta terapêutica para que seja uma opção viável, sendo logisticamente de difícil aplicação e cara (28).

O *Ivacaftor* constitui o primeiro modulador aprovado pela FDA para a terapêutica da FQ, trata-se de um potenciador (existindo outros em investigação) com capacidade de ativar múltiplas formas do CFTR, incluindo o *wild type*, com mutações tipo III G551D e também outras mutações classe III, IV e V. Em estudos controlados aleatorizados conduziu a um aumento do FEV1 e da MCC, bem como a uma redução das exacerbações, dos sintomas em doentes, da ocorrência de bronquiectasias e da colonização por *P. aeruginosa*, sem efeitos adversos significativos em doentes com FQ e pelo menos uma mutação G551D ou outras mutações da classe III. Este fármaco parece também ter efeitos benéficos no tratamento de doentes com mutações classe IV (28). O *Lumacaftor*, um corretor do CFTR, associado ao *Ivacaftor* no tratamento de doentes com FQ homozigóticos para a mutação F508del, permitiu um aumento da FEV1, estando aprovados pela FDA neste contexto. O uso isolado do *Lumacaftor* não surtiu estes benefícios, sugerindo que o aumento do CFTR na superfície celular nestes doentes não será suficiente, havendo necessidade de potenciar a sua função. Quanto aos agentes *read-through*, os primeiros encontrados foram os aminoglicosídeos como a gentamicina que, em estudos piloto, demonstrou aumentar o transporte de cloro (verificado através da medição da NPD) em doentes com FQ e pelo menos uma mutação *nonsense*. Na mesma população, o *Ataluren*, outro agente *read-through*, num ensaio fase III não demonstrou aumento do FEV1 ou outros parâmetros clínicos, podendo os seus efeitos benéficos ter sido condicionados pela toma crónica simultânea de tobramicina inalada (28).

Por último, existe evidência de que micro RNAs podem regular a expressão do CFTR, como é o caso do miRNA-138, que quando utilizado em células humanas epiteliais das vias aéreas aumentou a produção de CFTR e o transporte de cloro, inclusive, na presença da mutação F508del, podendo ser útil futuramente no tratamento da FQ (30).

Assim, o tratamento da FQ parece estar a entrar numa nova era pautada pela possibilidade de uma terapêutica dirigida e personalizada, que poderá servir de modelo para a implementação desta medicina de precisão noutras patologias, nomeadamente nas doenças das vias aéreas onde a disfunção do CFTR parece ter um contributo significativo (28).

Terapêutica dirigida ao CFTR e doenças das vias aéreas

Com a recente descoberta e validação clínica de potentes moduladores da atividade do canal iónico CFTR, surge a possibilidade de que uma melhoria farmacológica da atividade do CFTR (*wild type* ou mutado) poderá ter significativa importância clínica não só na FQ, mas também em outras doenças com estase de muco associada à disfunção do CFTR. Assim, existe um considerável interesse em avaliar os efeitos da estimulação do CFTR em doenças nas quais a hipofunção deste transportador tem um papel fisiopatológico, como, por exemplo na DPOC (14).

Em seguida desenvolve-se essa possibilidade, fazendo referência a evidências recentes neste âmbito.

Terapêuticas dirigidas ao CFTR na DPOC

Dado haver mais conhecimento acerca do papel do CFTR na DPOC, existe também maior evidência acerca dos efeitos de terapêuticas dirigidas a este transportador na DPOC, como agora explicitado.

Apesar de a DPOC ser uma das principais causas de morte no Mundo, não existe atualmente nenhum tratamento medicamentoso que altere a sua história natural. Os broncodilatadores inalados combinados com os corticoides são os principais fármacos utilizados e permitem reduzir as exacerbações e a dispneia e aumentar a qualidade de vida, no entanto, não alteram a mortalidade. Adicionalmente, os próprios corticoides aumentam o risco de pneumonia e não alteram a reduzida *clearance* e obstrução mucosa (29).

De facto, na DPOC a hipersecreção de muco crónica, estando presente em 60% dos doentes, é particularmente problemática porque se associa à taxa de declínio da função respiratória e à morte de forma independente, não existindo tratamento eficaz para este problema (14). A terapêutica mucolítica experimentada na DPOC obteve apenas efeitos marginais, tendo sido esta falência terapêutica atribuída à baixa biodisponibilidade e atividade dos agentes disponíveis e à dificuldade de acesso pelos fármacos inalados às vias aéreas distais obstruídas pelo muco. Reconhece-se, portanto, a necessidade de novos fármacos para o tratamento da DPOC, sendo que, apesar de o tabaco ser o principal fator de risco e modificável, mesmo com a cessação tabágica a DPOC mantém a sua progressão, e a obstrução ao fluxo aéreo está presente numa

percentagem substancial de ex-fumadores, dos quais mais de metade apresenta bronquite crónica (6,29).

Neste sentido, uma nova estratégia terapêutica através de um agente oral potente direcionado às pequenas vias aéreas (obstruídas), poderia ultrapassar as limitações referidas e certamente melhorar a estase de muco, uma importante causa de obstrução das vias aéreas associada a mortalidade e declínio da função respiratória, que não é atenuada pelas terapêuticas farmacológicas disponíveis. Neste âmbito, face à partilha de características fisiopatológicas entre a DPOC e a FQ, diversos investigadores procuraram avaliar o papel que agentes terapêuticos desenvolvidos para uma destas doenças poderiam ter no tratamento da outra, tendo encontrado alguns benefícios partilhados (29).

Com efeito, apesar de os modificadores do CFTR terem sido inicialmente desenvolvidos para restaurar a atividade do CFTR mutado, alguns aumentam igualmente o CFTR *wild type*, como é o caso do Ivacaftor e de outros potenciadores que aumentam a probabilidade de abertura do canal (diminuída na disfunção adquirida, nomeadamente na induzida pela exposição ao fumo do tabaco). Esta capacidade de aumentar a função do CFTR pode ter elevada relevância na DPOC, já que o CFTR regula o ASL e, conseqüentemente, a MCC, podendo os fármacos referidos, ultimamente, reduzir a taxa de declínio da função pulmonar e a mortalidade nesta doença (29).

Em estudos *in vitro* com células epiteliais expostas a fumo de tabaco, o ivacaftor potenciou as correntes curto-circuito dependentes do CFTR, para níveis superiores à atividade do CFTR *wild type* e de forma independente do grau de exposição ao fumo. Os mesmos efeitos foram verificados em traqueia humana normal excisada, independentemente de se tratar de um fumador ou não fumador. Simultaneamente, verificou-se um aumento do ASL e do transporte mucociliar (MCT) em epitélio exposto ao fumo do tabaco. Este efeito do Ivacaftor verificado ao nível da MCT foi desproporcionalmente maior quando comparado com o aumento do ASL ou dos batimentos ciliares, sugerindo que o MCT é altamente sensível à secreção de fluídos. De destacar que todas as exposições ao fumo do tabaco mimetizaram uma exposição crónica (24h), apesar de não contemplarem outras alterações patológicas que o tabaco pode induzir *in vivo*, como a metaplasia escamosa, hipertrofia glandular ou inflamação.

Assim, estes dados apoiam fortemente a possibilidade de potenciadores do CFTR e outros agonistas do transporte iónico poderem reverter a disfunção do CFTR induzida pelo tabaco (6,14,29).

Neste contexto, o próximo passo na investigação envolve a realização de estudos *in vivo*, sendo que, nos estudos realizados para avaliação da eficácia do ivacaftor na FQ, os efeitos verificados *in vitro* no modelo de células epiteliais usado, foram bastante fiéis aos verificados posteriormente *in vivo*, o que apoia adicionalmente o potencial sucesso do ivacaftor no tratamento da DPOC (6,14).

Entre janeiro e maio de 2015, foi realizado um estudo piloto randomizado duplamente cego e controlado por placebo para averiguar a eficácia, segurança e farmacocinética do ivacaftor em doentes com bronquite crónica. Selecionaram apenas 12 doentes, com uma concentração média de cloro no suor inferior às reportadas noutros grupos semelhantes, sugerindo uma disfunção do CFTR pouco marcada. Após 14 dias de terapêutica com ivacaftor, verificou-se, em relação ao grupo controlo, um aumento da função do CFTR através da avaliação de concentração de cloro no suor e da medição da NPD, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa devido à amostra reduzida de doentes. As melhorias médias do NPD e das concentrações de cloro no suor demonstram um aumento substancial da atividade do CFTR *wild type* (cerca de 20%), apesar dos níveis baixos de disfunção inicial do CFTR nestes doentes, sendo que as melhorias mais significativas da função do CFTR foram registadas nos doentes com uma disfunção inicial maior. Em adição, também os sintomas medidos pela BCSS melhoraram de forma estatisticamente não significativa no grupo de doentes que recebeu ivacaftor. O doente que apresentou uma maior melhoria segundo a BCSS apresentou também a maior melhoria em termos de função CFTR, apesar de, devido mais uma vez à reduzida amostra, não ter sido possível estabelecer uma associação entre as alterações da concentração de cloro e os sintomas de bronquite. Não se verificou um aumento do FEV1 no grupo tratado com ivacaftor, provavelmente devido à duração demasiado curta do ensaio para que melhorias da função respiratória se verificassem. Assim, o ivacaftor mostrou-se seguro e bem tolerado, e, apesar do ensaio ter sido subdimensionado em termos de amostra e duração para detetar alterações da função pulmonar, observaram-se melhorias da função do CFTR e dos sintomas respiratórios. Estes resultados sugerem a necessidade de ensaios clínicos mais longos para avaliar os efeitos da utilização de potenciadores do CFTR em

doentes com bronquite crónica e uma substancial disfunção do CFTR de base, a qual ocorre em cerca de 30-40% dos doentes (22).

Desta forma, tal como referido anteriormente, na DPOC existe necessidade de uma abordagem mais dirigida que identifique subpopulações de doentes com DPOC, através de características clínicas ou moleculares distintas, permitindo definir subfenótipos. Estes subfenótipos poderiam permitir, por exemplo, uma terapêutica personalizada e, desejavelmente, mais eficaz. Neste contexto, uma possível terapêutica poderá ser, como referido, dirigida à disfunção de canais iónicos presentes em alguns doentes com DPOC, nomeadamente do CFTR. É, pois, importante definir claramente os fenótipos clínicos que beneficiarão mais de fármacos como os potenciadores do CFTR, como é o caso da bronquite crónica e dos fenótipos com hipersecreção mucosa no geral, visto a terapêutica com estes fármacos surtir aparentemente efeitos mais significativos em doentes com uma maior disfunção do CFTR de base e, por exemplo, ser demasiado cara para uma aplicação terapêutica geral e não dirigida nos numerosos doentes com DPOC (6,14,22).

Importa referir ainda um outro fármaco, o roflumiltast, um inibidor da fosfodiesterase-4 (PDE-4), aprovado para o tratamento da DPOC pelos seus efeitos anti-inflamatórios (a PDE-4 é expressa em várias células inflamatórias). Curiosamente, apenas é eficaz nos doentes com bronquite crónica, colocando a hipótese de o efeito anti-inflamatório não ser o seu único mecanismo de ação. De facto, ao inibir a PDE-4 o roflumilast conduz, *in vitro*, a um aumento do cAMP e, conseqüentemente, à ativação do CFTR, tendo-se verificado efeitos semelhantes em células humanas epiteliais brônquicas expostas ao fumo do tabaco. Simultânea e coerentemente, o roflumilast produziu um aumento do ASL, inclusivamente nas células afetadas pelo fumo do tabaco, bem como o roflumilaste-N-óxido (o metabolito mais estável e potente do roflumilast) teve um efeito protetor relativamente à redução dos batimentos ciliares e destruição do epitélio ciliado induzidos pelo tabaco. Paralelamente, o roflumilast também condiciona a ativação do CFTR no intestino, com aumento da secreção de fluídos, o que pode justificar a diarreia como efeito secundário deste fármaco (poderá ser prevenido recorrendo-se à via inalatória). Assim, a bioatividade do roflumilast explica parcialmente o seu benefício terapêutico superior nos doentes com DPOC e bronquite crónica com exacerbações frequentes (em comparação com os outros doentes com DPOC), visto haver uma maior prevalência de disfunção do CFTR neste fenótipo.

Ao mesmo tempo, estas evidências acrescentam credibilidade à hipótese de os potenciadores do CFTR poderem ser benéficos na DPOC (29).

Por último, poder-se-á procurar adotar uma atitude preventiva no que toca à disfunção adquirida do CFTR, tentando atenuar esta hipofunção causada pelo stress oxidativo na sequência de exposição ao fumo do tabaco, além de, obviamente, incentivar a cessação tabágica. De facto, como referido, a acroleína é um componente do fumo do tabaco que condiciona stress oxidativo, sendo que a disfunção do CFTR propiciada por esta (poderá manter-se após cessação tabágica) é antagonizada com administração do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) *in vitro* e *in vivo* em ratos. A NAC já foi experimentada como terapêutica na DPOC pelos seus efeitos mucolíticos e antioxidantes, tendo-se revelado benefícios modestos e inconsistentes ao nível da função respiratória, no entanto, as doses testadas foram insuficientes para permitir uma concentração sérica e tecidual adequada para antagonismo dos eventos mediados pela acroleína, podendo ser substancialmente mais benéfica em doses superiores. Também os efeitos nocivos já referidos do cádmio (metal pesado presente no fumo do tabaco e produtor de stress oxidativo) sobre a função do CFTR podem ser antagonizados pela vitamina E, podendo esta ter aplicações terapêuticas (3,16).

Terapêuticas dirigidas ao CFTR noutras doenças das vias aéreas

As abordagens terapêuticas dirigidas ao CFTR referidas no contexto da DPOC e da FQ poderão igualmente trazer benefícios quando aplicadas às restantes doenças onde a disfunção do CFTR tem impacto, devendo estas opções ser exploradas no âmbito, nomeadamente, da asma, da ABPA, das DB e das infeções PNTM.

Relativamente ao caso específico da **asma**, apesar de as evidências quanto ao papel do CFTR na sua fisiopatologia serem ainda pouco esclarecedoras, houve de facto estudos que reportaram uma incidência aumentada de mutações do gene deste transportador na asma. Destaca-se o aumento da incidência da mutação G551D nos doentes asmáticos, associada a risco de função respiratória reduzida. Esta evidência justifica uma avaliação da eficácia terapêutica do ivacaftor nos doentes com asma e a mutação G551D, já que este fármaco permite melhorar substancialmente a função respiratória de doentes com FQ e a mesma mutação (24,28).

Por último, determinados fármacos têm demonstrado efeitos benéficos na Rinosinusite ao modularem o transporte iónico de cloro, sendo que, portanto, poderão igualmente ser úteis noutras doenças das vias aéreas com disfunção deste transportador. Nomeadamente, fármacos secretagogos do cloro como o resveratrol (aumenta o transporte de cloro dependente do CFTR nos seios perinasais e das cavidades nasais num grau comparável ao conseguido com o ivacaftor), o ácido ascórbico (a aplicação tópica da vitamina C aumenta em mais 50% a função do CFTR nos seios perinasais) e o *sinupret* (considerado um suplemento vegetal e permite aumentar a secreção epitelial de cloro, a MCC e a frequência de batimentos ciliares) representam mais uma abordagem terapêutica vanguardista para ultrapassar os defeitos do CFTR presentes nas vias aéreas em doenças respiratórias com alterações da MCC, podendo a sua eficácia ser testada noutras patologias desta natureza além da RS (9).

Conclusões sobre terapêuticas dirigidas ao CFTR e doenças das vias aéreas

Concluindo, perante a evidência de semelhanças fisiopatológicas e, nalguns casos, clínicas, entre a FQ e as doenças das vias aéreas referidas, bem como perante a demonstração de que a disfunção do CFTR tem um papel no desenvolvimento e, por vezes, na gravidade dessas patologias, torna-se pertinente procurar recorrer a terapêuticas dirigidas aos defeitos do CFTR para o tratamento destas patologias das vias aéreas.

Neste sentido, a recente descoberta de terapêuticas capazes de aumentar a função do CFTR como os potentes moduladores do CFTR, a terapia génica, certos análogos de micro RNAs (como o miRNA-138), alguns antioxidantes (como NAC, vitamina E e C), um antagonista da PDE-4 e três secretagogos do cloro e a evidência de eficácia de algumas destas terapêuticas em patologias como a DPOC e a FQ, abre caminho para uma avaliação futura da eficácia destes fármacos noutras doenças com disfunção do CFTR (de origem genética ou adquirida) e reduzida MCC. Entre estas doenças candidatas às estratégias terapêuticas referidas encontra-se a asma, a ABPA, as bronquiectasias difusas não associadas a FQ, as infeções PNTM e, também, a DPOC. Por fim, estratégias terapêuticas em causa devem ser aplicadas de forma personalizada, tendo em conta os defeitos específicos do CFTR presentes em cada doença e em cada doente específico, de forma a constituírem tratamentos personalizados, eficazes e relevantes e não se traduzirem, pelo contrário, em sobretratamento ineficaz e gastos desnecessários.

Perspetivas Futuras

Relativamente a perspetivas futuras, importa ter uma visão global da função do CFTR, incluindo um conhecimento de fatores envolvidos na sua regulação e de outros transportadores iónicos epiteliais, bem como a possibilidade de realizar um “*bypass*” à disfunção do CFTR.

Destaca-se uma meta análise de 13 *microarray data sets* que permitiu encontrar potenciais reguladores da expressão do CFTR que poderão ter relevância no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas moduladoras do gene do CFTR (23).

Por outro lado, existem estratégias que permitem realizar um “*bypass*” à disfunção do CFTR, nomeadamente através do bloqueio da síntese de novo da ceramida e através do recurso a uma solução salina hipertónica. A acumulação de ceramida, como referido, é regulada pelo CFTR e está envolvida na fisiopatologia da lesão pulmonar na DPOC, correlacionando-se com a gravidade do enfisema. Uma disfunção do CFTR, associa-se, portanto, a acumulação de ceramida que pode ser reduzida pela inibição da sua síntese de novo, com recurso, por exemplo, ao inibidor da ceramida sintetase, fumonisina 1. Este *bypass* pode ver-se como uma terapêutica mais específica que o ivacaftor para colmatar disfunção do CFTR observada no enfisema, pois o ivacaftor é dirigido à capacidade de transporte de cloro do CFTR, sendo que no enfisema a acumulação de ceramida poderá ser mais relevante e não corrigida pelo ivacaftor (5). Também a utilização de uma solução salina hipertónica pode funcionar como *bypass* da disfunção do CFTR, sendo que, *in vitro*, aumentou o ASL por aumento da pressão osmótica e o MCT, mostrando potencial como mucolítico (14,29).

Ainda no âmbito das perspetivas futuras, tal como aconteceu com o aprofundamento do conhecimento e compreensão da estrutura e função do CFTR que permitiu desenvolver terapêuticas dirigidas à disfunção deste transportador e algumas delas já foram, inclusive, aprovadas para utilização clínica, também uma melhor compreensão da fisiologia do transporte iónico epitelial no geral poderá ajudar a desenvolver estratégias terapêuticas dirigidas a disfunções de outros canais que podem igualmente ser relevantes em patologias das vias aéreas.

De facto, apesar de os defeitos observados na mucosa de doentes com FQ realçarem o papel fisiopatológico do CFTR, vários outros canais epiteliais estão envolvidos na regulação do transporte de cloro no epitélio das vias aéreas. Estes canais funcionam em conjunto para gerar um gradiente de cloro que permita mobilizar o sódio e água paracelulares, mantendo as secreções mucosas isosmóticas. Portanto, os canais de cloro não funcionam isoladamente, estando coordenados electroquimicamente com outros canais apicais de sódio, trocadores de aniões, bombas sódio/potássio basolaterais e canais de potássio, de forma a poderem manter a osmolalidade luminal (29). Efectivamente, fatores ambientais como a inflamação e a hipoxia, por exemplo, demonstraram induzir não só disfunção do CFTR como de outros canais, nomeadamente a exposição a IL-13 *in vitro* reduziu a actividade do canal epitelial de sódio (ENaC), enquanto a hipóxia parece aumentar a reabsorção de sódio mediada pelo ENaC, estando em desenvolvimento estratégias terapêuticas que inibam o ENaC de forma a reduzir a desidratação das vias aéreas nestes casos de disfunção (9,14). Assim, também defeitos genéticos ou adquiridos em outros canais iónicos epiteliais poderão, pois, estar envolvidos no desenvolvimento de doenças das vias respiratórias como as referidas nesta revisão, sendo potenciais alvos terapêuticos. Com efeito, a combinação de defeitos no CFTR com defeitos noutros transportadores poderá permitir compreender ainda melhor a fisiopatologia de várias doenças respiratórias. Por exemplo, nas DB não associadas a FQ há um papel das mutações heterozigóticas do gene do CFTR no desenvolvimento da doença, no entanto nem todos os doentes apresentam mutações deste gene, podendo os doentes sem mutações identificadas ter, por outro lado, mutações dos genes codificadores de outros canais iónicos como o ENaC (25).

Conclusão

Em jeito de conclusão, ao longo deste trabalho final de mestrado, foi possível explicitar qual o papel do transportador CFTR na fisiologia dos epitélios com particular destaque nas vias respiratórias. Explanou-se de que forma a sua funcionalidade pode ser afetada, tanto através de alterações genéticas como por ação de agentes ambientais que condicionam uma disfunção adquirida.

Posteriormente, clarificou-se de que forma esta disfunção do CFTR pode estar a contribuir para o desenvolvimento de alterações fisiopatológicas, manifestações clínicas e gravidade de diversas doenças respiratórias, como a DPOC, a asma, a ABPA, as DB não associadas a FQ e, também, as infeções PNTM. E, por fim, procurou-se compreender de que forma terapêuticas dirigidas à disfunção do CFTR nestas doenças em que a hipofunção do CFTR é relevante poderão ter um papel determinante no tratamento das mesmas. Concluiu-se depois que a terapêutica dirigida a disfunções do CFTR, sejam elas determinadas geneticamente ou adquiridas, parece ser promissora e carece de mais investigação clínica comprovando a sua eficácia e permitindo delinear em que doenças e em que doentes podem ser extremamente relevantes e clinicamente eficazes. Por último, genes modificadores da expressão do CFTR, a possibilidade de realizar um *bypass* da disfunção do CFTR e uma melhor compreensão do papel de outros canais iónicos da fisiopatologia das doenças das vias respiratórias em causa, poderão ser úteis no futuro e ter significativas implicações terapêuticas.

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à minha família, sobretudo à minha mãe pelo apoio e ajuda na realização deste trabalho final de mestrado.

Ao António pela paciência e motivação.

Ao Dr. Carlos Lopes, por aceitar ser o meu orientador deste trabalho final de mestrado, bem como toda a disponibilidade demonstrada e apoio proporcionado.

Bibliografia

1. Saint-Criq, V.; Gray, M.A. Role of CFTR in epithelial physiology. Cellular and Molecular Life Sciences Springer International Publishing: 2016, 1–23.
2. Derichs, N. Targeting a genetic defect: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators in cystic fibrosis. European Respiratory Review 2013, 22(127), 58–65.
3. Cantin, A.M. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Implications in Cystic Fibrosis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Annals of the American Thoracic Society 2016, 13(Supplement 2).
4. Rasmussen, J.E.; Sheridan, J.T.; Polk, W.; Davies, C.M.; Tarran, R. Cigarette Smoke-induced Ca²⁺ Release Leads to Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Dysfunction. The Journal of biological chemistry 2014, 289(11), 7671–81.
5. Bodas, M.; Min, T.; Mazur, S.; Vij, N. Critical Modifier Role of Membrane-Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Dependent Ceramide Signaling in Lung Injury and Emphysema. The Journal of Immunology 2011, 186(1), 602–613.
6. Sloane, P.A.; Shastry, S.; Wilhelm, A.; Courville, C.; Tang, L.P.; Backer, K.; et al. A pharmacologic approach to acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in smoking related lung disease. PLoS ONE 2012.
7. Muthuswamy, S.; Agarwal, S.; Awasthi, S.; Singh, S.; Dixit, P.; Maurya, N.; et al. Spectrum and distribution of CFTR gene mutations in asthma and chronic pancreatitis cases of North Indian population. Gene Elsevier B.V.: 2014, 539(1), 125–131.
8. Maurya, N.; Awasthi, S.; Dixit, P. Association of CFTR gene mutation with bronchial asthma. 2012, (April), 469–478.
9. Cho, D.-Y.; Woodworth, B.A. Acquired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficiency. Advances in oto-rhino-laryngology 2016.
10. Agarwal, R.; Khan, A.; Aggarwal, A.N.; Gupta, D. Link between CFTR mutations and ABPA: A systematic review and meta-analysis. Mycoses 2012, 55(4), 357–365.
11. Southern, K.W. Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease. Respiration 2007, 74(3), 241–251.
12. Paranjape, S.M.; Zeitlin, P.L. Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. Clinical Reviews in Allergy and Immunology 2008, 35(3), 116–123 .
13. Gonska, T.; Choi, P.; Stephenson, A.; Ellis, L.; Martin, S.; Solomon, M.; et al. Role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in patients with chronic sinopulmonary disease. Chest The American College of Chest Physicians: 2012, 142(4), 996–1004.

14. Raju, S.V.; Solomon, G.M.; Dransfield, M.T.; Rowe, S.M. Acquired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dysfunction in Chronic Bronchitis and Other Diseases of Mucus Clearance. *Clinics in Chest Medicine* Elsevier Inc: 2016, 37(1), 147–158.
15. Courville, C.A.; Tidwell, S.; Liu, B.; Accurso, F.J.; Dransfield, M.T.; Rowe, S.M. Acquired defects in CFTR-dependent beta-adrenergic sweat secretion in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory research* Respiratory Research: 2014.
16. Raju, S.V.; Jackson, P.L.; Courville, C. a; McNicholas, C.M.; Sloane, P. a; Sabbatini, G.; et al. Cigarette Smoke Induces Systemic Defects in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Function. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2013.
17. Dransfield, M.T.; Wilhelm, A.M.; Flanagan, B.; Courville, C.; Tidwell, S.L.; Raju, S.V.; et al. Acquired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in the lower airways in COPD. *Chest The American College of Chest Physicians*: 2013, 144(2), 498–506.
18. Raju, S. V.; Wang, G. Suppression of adenosine-activated chloride transport by ethanol in airway epithelia. *PLoS ONE* 2012, 7(3), 3–8.
19. Rab, A.; Rowe, S.M.; Raju, S.V. et al Cigarette smoke and CFTR: implications in the pathogenesis of COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013, 305(8), L530–L541.
20. Guimbellot, J.S.; Fortenberry, J.A.; Siegal, G.P.; Moore, B.; Wen, H.; Venglarik, C.; et al. Role of oxygen availability in CFTR expression and function. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2008, 39(5), 514–521.
21. Singh, D.; Miravittles, M.; Vogelmeier, C. *Chronic Obstructive Pulmonary Disease Individualized Therapy: Tailored Approach to Symptom Management. Advances in Therapy* Springer Healthcare: 2016.
22. Solomon, G.M.; Hathorne, H.; Liu, B.; Raju, S.V.; Reeves, G.; Acosta, E.P.; et al. Pilot evaluation of ivacaftor for chronic bronchitis; *Lancet Publishing Group*: 2016, e32–e33.
23. Clarke, L.A.; Botelho, H.M.; Sousa, L.; Falcao, A.O.; Amaral, M.D. Transcriptome meta-analysis reveals common differential and global gene expression profiles in cystic fibrosis and other respiratory disorders and identifies CFTR regulators. *Genomics Elsevier B.V.*: 2015, 106(5), 268–277.
24. Awasthi, S.; Maurya, N.; Agarwal, S.; Dixit, P.; Muthuswamy, S.; Singh, S. Association of CFTR gene mutation with bronchial asthma and its severity in Indian children: A case-control study. *Annals of Human Biology* 2012, 39(2), 113–121.
25. Bienvenu, T.; Sermet-Gaudelus, I.; Burgel, P.-R.; Hubert, D.; Crestani, B.; Bassinet, L.; et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel dysfunction in non-cystic fibrosis bronchiectasis.; 2010.

26. Lake, M.A.; Ambrose, L.R.; Lipman, M.C.I.; Lowe, D.M. "Why me, why now?" Using clinical immunology and epidemiology to explain who gets nontuberculous mycobacterial infection. *BMC medicine BMC Medicine*: 2016.
27. Szymanski, E.P.; Leung, J.M.; Fowler, C.J.; Haney, C.; Hsu, A.P.; Chen, F.; et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial infection a multisystem, multigenic disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2015, 192(5), 618–628.
28. Quon, B.S.; Rowe, S.M. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ (Clinical research ed.)* 2016.
29. Solomon, G.M.; Vamsee Raju, S.; Dransfield, M.T.; Rowe, S.M. Therapeutic Approaches to Acquired Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Dysfunction in Chronic Bronchitis. *Ann Am Thorac Soc.* 2016, 13(S2), S169–S176.
30. Ramachandran, S.; Karp, P.H.; Jiang, P.; Ostedgaard, L.S.; Walz, A.E.; Fisher, J.T.; et al. A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109(33), 13362–7.