

---

## CANAIS IÔNICOS E FIBROSE CÍSTICA ION CHANNEL AND CYSTIC FIBROSIS

---

COUTINHO, Henrique D. M.\*; FIGUEREDO, Fernando G.; TINTINO, Saulo R.; LIMA, Luciene F.;  
FERREIRA, João Victor A.; MARTINS, Gioconda M.A.B.; FREITAS, Maria A.

Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Regional  
do Cariri, Crato (CE), Brasil

Recebido em: 02/06/2014; aceito: 03/09/2014; publicado em 19/11/2014

---

ARTIGO DE REVISÃO

### RESUMO

*Introdução:* A Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva letal, que acomete preferencialmente crianças brancas. *Objetivo:* Descrever e discutir os mecanismos moleculares envolvidos na FC. *Materiais e métodos:* Artigos obtidos nos bancos de dados internacionais SCIELO, PUBMED, BIOLINE, DOAJ e HIGHWIRE que tratam dos mecanismos moleculares envolvidos na FC. *Resultados e discussões:* Decorre de mutações no gene que codifica a proteína “regulador de condutância transmembrana da fibrose cística” (CFTR). Esta contribui para a regulação do fluxo iônico nas superfícies apicais das células epiteliais, e é um canal de cloreto. A fisiopatologia da FC envolve o bloqueio da secreção do cloreto através da membrana apical das células epiteliais glandulares, resultando em seu acúmulo intracelular, acompanhado do influxo de sódio e água para este compartimento. Como consequência, ocorre desidratação da superfície celular com formação de secreções espessas - características da doença. O diagnóstico é baseado na clínica, demonstração laboratorial de concentrações elevadas de cloreto no suor e análise genética. O tratamento inclui: fluidificação das vias aéreas, antibioticoterapia, broncodilatadores, suporte nutricional e reposição enzimas. Na tentativa de aumentar o efluxo epitelial de Cl<sup>-</sup> ou inibir o influxo do Na<sup>+</sup>, alvos moleculares podem ser atacados por diferentes drogas como reguladores de migração citoplasmática, ativadores da expressão gênica, entre outros, para o primeiro, e inativação dos ENaC (amilorida ou benzamil) ou inibição do influxo de sódio (ouabaína, digoxina ou loperamida). *Considerações Finais:* Novas modalidades terapêuticas e a detecção precoce da FC por genotipagem podem melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos afetados.

**Palavras – chave:** Fibrose Cística, Canalopatias, CFTR, EnaC, ΔF508.

### ABSTRACT

*Introduction:* Cystic Fibrosis (CF) is a lethal autosomic recessive disease occurring mainly in white kids. *Objective:* Describe and discuss the molecular mechanisms involved in the CF. *Material and methods:* article obtained from the international databanks SCIELO, PUBMED, BIOLINE, DOAJ and HIGHWIRE about the molecular mechanisms of CF. *Results and discussions:* Its due mutations on the gene of cystic fibrosis Transmembrane conductance regulator (CFTR). This protein contributes for the regulation of the ionic flow in the apical surfaces of the epithelial cells, and is a chloride canal. The physiopathology of the CF involves the blockade of the chloride secretion through the apical membrane of the epithelial cells, resulting in intracellular accumulation, followed by the sodium and water influx. As consequence will occur a dehydration of the cellular surface with thick secretion. The diagnosis is based on the clinic, the laboratorial identification of high concentrations of chloride in the sweat and genetic analysis. The treatment includes: rehydration of the airway, antibioticotherapy, nutritional support and enzyme replacement. In a attempt to increase the epithelial efflux of chloride or inhibit the influx of the sodium, molecular targets can be attacked by different drugs, as regulators of the cytoplasmatic traffick, activators of gene expression and inactivation of ENaC (by amiloride or benzamil) or the sodium influx (by ouabaïne, loperamide, digoxine). *Final considerations:* New therapeutical treatments and the early detention of the CF for genotyping can improve the prognostic and the quality of life of the affected patients.

**Keywords:** Cystic fibrosis, channelopathies, CFTR, EnaC, ΔF508.

## 1 INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) ou mucoviscidose é uma doença genética autossômica recessiva grave em crianças que compromete o funcionamento de praticamente todos os órgãos e sistemas orgânicos, através da alteração da função das glândulas exócrinas<sup>(1,2)</sup>. Foi identificada e descrita, pela primeira vez, entre os anos de 1930 e 1940, como uma doença genética fatal da infância. Naquela época, 80% das crianças afetadas morriam no primeiro ano de vida, e a sobrevivência após os cinco anos de idade era considerada muito rara. Nas últimas décadas, os avanços no diagnóstico e tratamento dessa patologia têm elevado a expectativa de vida desses pacientes, embora 15 a 20% dos portadores desse distúrbio morram antes de completar dez anos de idade<sup>(3)</sup>.

A doença é mais comum nas crianças da raça branca (1: 2.500 nascimentos de caucasianos)<sup>(4,7)</sup>, enquanto sua incidência é considerada rara na raça negra (um para 17 mil negros americanos) e nos Orientais (1: 25.000)<sup>(8,7,2)</sup>. No Brasil, estudos realizados em cinco estados do Sul e Sudeste estimam uma incidência de 1: 10.000 recém-nascidos da raça caucasóide<sup>(9)</sup>.

A doença é causada por mutações no gene que codifica uma proteína denominada regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), localizado no braço longo do cromossomo 7 (sete). No organismo, a proteína CFTR contribui para a regulação do fluxo iônico nas superfícies apicais das células epiteliais e é um canal de cloreto<sup>(7,10,13)</sup>. Na fisiopatologia, este gene mutante prejudica a secreção de cloreto na membrana apical das células epiteliais, e há aumento da reabsorção de sódio e água da luz do órgão afetado, o que concentra as secreções, tornando-as mais viscosas e espessas<sup>(14)</sup>.

Clinicamente, a extensa disfunção das glândulas exócrinas, com alteração da qualidade das secreções respiratórias, digestivas e genitais, manifesta-se através de infecções pulmonares crônicas e recorrentes, insuficiência pancreática e infertilidade, entre outras alterações<sup>(2,11)</sup>. O diagnóstico é baseado nos achados clínicos, e confirmado pela demonstração laboratorial de concentrações anormalmente elevadas de cloreto no suor (> 60 mEq/ l)

<sup>(7,8,12)</sup> e pela análise genética<sup>(7,13)</sup>. O aumento da suspeição clínica e o diagnóstico através de análise genética têm levado à identificação de pacientes adolescentes e adultos com esta patologia<sup>(13,14)</sup>.

O tratamento da FC inclui limpeza broncoalveolar vigorosa, antibioticoterapia, broncodilatadores, fisioterapia e suporte nutricional, incluindo reposição de enzimas pancreáticas. O uso de agentes inalantes para fluidificar as secreções das vias aéreas, ou mesmo o transplante pulmonar, tem contribuído de modo substancial para um melhor prognóstico e qualidade de vida desses pacientes<sup>(2,3,7)</sup>. A identificação e a clonagem do gene CFTR oferecem o potencial de terapia gênica<sup>(13,15)</sup>.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho tem como objetivo relatar as características genéticas, moleculares e sintomatológicas da FC, bem como seu tratamento e as consequências desta doença.

Para tanto, foi realizada uma revisão bibliográfica utilizando o acervo disponível nos bancos de dados internacionais como SCIELO, PUBMED, HIGHWIRE, SCIRUS e outros.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1 O GENE DA FIBROSE CÍSTICA E CFTR

O gene da FC está localizado no cromossomo 7 (sete), braço longo, locus q31 (cromossomo 7q31), éxon 10; é composto por aproximadamente 250.000 pares de bases nitrogenadas e 27 éxons, e codifica uma proteína de 170 kDa e 1.480 aminoácidos denominada regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR). Mais de mil mutações diferentes do gene CFTR têm sido reportadas<sup>(4,7,12,16)</sup>.

Com base nas anomalias fisiológicas do transporte transmembranar de íons observados na FC, o polipeptídeo codificado pelo gene da FC foi denominado de proteína CFTR. Sua sequência primária de aminoácidos

indica que ela pertence à família ABC (ligadas ao trifosfato de adenosina cíclico – ATP) de proteínas de transporte que apresentam domínios de fosforilação por ATP <sup>(5,17)</sup>, entretanto, é um fato muito característico em CFTR a capacidade de que, sendo membro de uma família de proteínas transportadoras, funcione como um canal iônico <sup>(18)</sup>.

O canal CFTR-cloreto é caracterizado por cinco domínios: dois domínios transmembrana (MSDs), cada um com seis sequências transmembranares, dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD 1 e NBD 2) e um domínio de regulação R que contém múltiplos sítios de fosforilação. Dentre estes sítios, as serinas Ser-660 e Ser-813 são essenciais para o funcionamento do canal <sup>(5)</sup>. “inserir figura 1 aqui”. Seu poro é formado por doze segmentos transmembranares <sup>(5,7)</sup>.

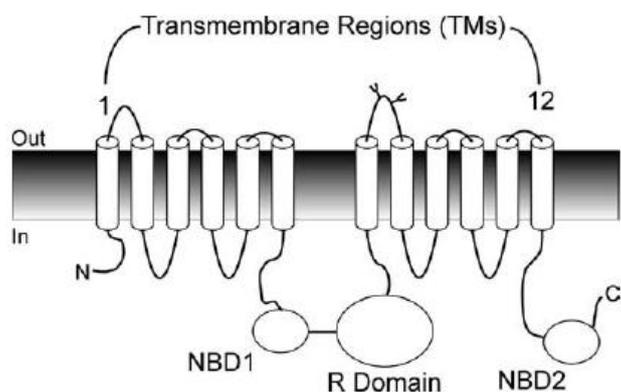


Figura 1 – Topologia completa de CFTR. CFTR apresenta 12 regiões transmembrana (organizadas em 2 grupos de 6), 2 NBDs e o domínio R, ambos intracelulares (LINSDELL, 2006).

Em condições normais, a CFTR é regulada positivamente por fosforilação. Diversas proteínas podem desempenhar esta função como cinase de tirosina, proteína cinase C – PKC e a proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico - GMPc <sup>(19)</sup>. Porém, esta fosforilação é mediada principalmente por Proteína Cinase A – PKA. Na via de fosforilação por PKA, essa proteína é ativada pelo aumento da concentração de AMPc via ciclase de adenilil (AC). Uma vez fosforilada, CFTR torna-se ativa e possibilita o efluxo de Cl<sup>-</sup> através da membrana apical da célula <sup>(20)</sup>.

No organismo, a proteína CFTR se localiza nas superfícies apicais das células epiteliais, embora possa executar outras funções, além da condutância de íons. Os

níveis mais elevados de expressão do gene CFTR são encontrados no pâncreas, nas glândulas salivares, sudoríparas e intestinais e no trato reprodutor <sup>(5,7)</sup>.

Já foram mapeadas alterações de CFTR relacionadas diretamente com infertilidade masculina (ausência bilateral congênita de “vas deferens” – CBAVD) <sup>(21)</sup>, doença pulmonar média associada à bronquiectasia, pancreatite idiopática crônica (ICP) <sup>(22,23)</sup>.

Outras doenças também estão relacionadas a alterações em CFTR, mas sofrem uma influência ambiental muito forte como sinusite <sup>(24)</sup>, aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA) e asma, apesar dos dados serem conflitantes neste caso <sup>(21)</sup>.

Embora não se conheça a maioria das anormalidades bioquímicas associadas às mutações da FC, quatro mecanismos gerais de disfunção protéica foram descritos. As mutações de classe I estão associadas a um defeito na produção da proteína (proteína ausente); as de classe II estão relacionadas com algum defeito no seu processamento em nível de retículo endoplasmático (RE) ou complexo de Golgi, acarretando um mau dobramento da proteína. O mutante delta F508 ( $\Delta$ F508) faz parte desta classe; ele não promove uma dobra suficiente para permitir sua saída do RE <sup>(5)</sup>, e, em consequência, a proteína será degradada dentro da organela ao invés de prosseguir às células secretoras para exercer suas funções <sup>(25)</sup>. É o defeito mais comum, contribuindo com cerca de 70% de todos os alelos FC nas populações caucasianas <sup>(4,5,7,12,17)</sup>.

Mutações que perturbam a regulação da proteína nos NBDs e no domínio de fosforilação R compreendem a classe III, enquanto as mutações de classe IV estão situadas em MSDs e, compatível com esta localização, têm condução defeituosa de cloreto <sup>(5)</sup>.

A primeira mutação de FC identificada foi a  $\Delta$ F508 que consiste em uma deleção de três pares de bases nitrogenadas no éxon 10 do gene FC e acarreta a ausência de um resíduo de aminoácido (fenilalanina) na posição 508 da proteína codificada pelo gene <sup>(4,5,7,12)</sup>. Esta mutação ocorre em aproximadamente 70% dos cromossomos FC no Norte da Europa e nos Estados Unidos da América, embora tenha sido demonstrado que a frequência desta mutação sofre variações, principalmente entre grupos étnicos,

variando de 26% na Turquia a 88% na Dinamarca <sup>(12)</sup>. No Brasil, estudos com 108 pacientes com FC demonstraram 44,5% de alelos afetados. Esta frequência menor da mutação  $\Delta F508$  em relação aos achados na Europa e América do Norte deve-se, provavelmente, à elevada miscigenação racial brasileira <sup>(12)</sup>.

### 3.2 FISIOPATOLOGIA

Os epitélios secretores de líquido incluem o túbulo renal, as glândulas salivares, o trato gastrointestinal (TGI) e o epitélio das vias aéreas. Em cada um deles, as células epiteliais se dispõem em camadas, separando o compartimento interno (perfundido por sangue) do compartimento luminal externo, de onde ou para onde ocorre o processo de secreção, que envolve o transporte de sódio e de cloreto <sup>(26)</sup>.

As células do epitélio ciliado expressam os canais epiteliais de sódio (ENaC) e bombas de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{trifosfatase}$  (ATPase) para mediar a absorção transcelular do  $\text{Na}^+$ . As células ciliadas também expressam canais de cloreto na porção apical (CFTR e canais de cloreto ativados por cálcio) e co-transportadores de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  na porção basolateral, para secretar cloreto quando os ENaC estão bloqueados e forças secretórias de cloreto são formadas <sup>(27)</sup>.

Fisiologicamente, há reabsorção passiva dos íons sódio e de cloreto a partir da luz das glândulas exócrinas, diminuindo-se a perda de eletrólitos nas secreções. A molécula-chave no transporte epitelial dos íons cloreto é o CFTR <sup>(1)</sup> e este tipo de transporte é particularmente importante nas vias aéreas (VA) e no trato gastrointestinal. Nas primeiras, é essencial para a secreção ao passo que no TGI media a reabsorção de líquido <sup>(26)</sup>.

A perda de condutância do ânion mediada pela CFTR explica uma grande variedade de sintomas como o aumento de cloreto no suor (um defeito na absorção de sal pelos ductos das glândulas sudoríparas) e o íleo meconial (defeito na secreção pelas células intestinais). Quando a função da CFTR é perdida, a condutância ao sódio é marcadamente aumentada nas células epiteliais das vias aéreas humanas, mas aparentemente não o é nos ductos sudoríparos <sup>(28)</sup>.

Nas glândulas sudoríparas, a absorção de sal (NaCl) no ducto está associada a uma alta condução apical para sódio e cloreto e baixa condutividade para a água, permitindo que haja uma absorção hipertônica, ou seja, que o sal seja reabsorvido em excesso. Consequentemente forma-se um fluido luminal hipotônico. No ducto, o CFTR é a única via de condutância de ânions disponível, e, quando ele perde a função na FC, o lúmen rapidamente se torna altamente eletronegativo e o transporte virtualmente cessa, resultando em um alto teor luminal de sal <sup>(28)</sup>.

Com relação à absorção de fluido, no epitélio com alta permeabilidade eletrolítica, a água será absorvida osmoticamente com sal, para diminuir o volume do fluido luminal. Se nenhuma força osmótica estiver presente, a concentração de NaCl permanecerá inalterada <sup>(28)</sup>.

A regulação do volume do líquido periciliar (PLC) é realizada pelo transporte epitelial de sódio e cloreto. Quando há excesso de líquido na superfície das vias aéreas (ASL), há predomínio da ação dos ENaC, permitindo o influxo de sódio e água, e o cloreto é absorvido passivamente por uma via paracelular. Ao contrário, quando o volume de ASL está reduzido, os ENaC são inibidos e ocorre direcionamento das forças elétricas para que o cloreto seja secretado na porção apical. O cloreto é projetado para dentro da célula, via co-transportador basolateral ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ ) e então flui passivamente para o lúmen via CFTR, devido ao fato de não haver um gradiente eletroquímico que favoreça a saída do cloreto de dentro da célula. No epitélio secretor não há uma via apical significativa para conduzir o sódio ao lúmen, e este íon flui para a luz dos órgãos pela via paracelular. Desta forma, a estabilidade do PLC é mantida pelo equilíbrio entre a absorção de  $\text{Na}^+$  e a secreção de  $\text{Cl}^-$ , e a secreção do cloreto induzida pela inibição dos ENaC é mediada pelo CFTR <sup>(26,28)</sup>.

Na FC, há bloqueio da secreção do cloreto através da membrana apical das células epiteliais glandulares, resultando em seu acúmulo intracelular, acompanhado do movimento passivo de sódio e água para esse compartimento, para manter a eletro neutralidade com consequente influxo de água, o que leva a uma desidratação

da superfície celular, com formação de muco espesso característico da doença <sup>(10)</sup>.

Estudo dos canais iônicos de membrana apical pela técnica de “Patch clamp” revelaram um aumento da atividade dos ENaC (aumento da probabilidade de abertura do canal) em células de pacientes com FC quando comparadas a células normais, sugerindo que a proteína CFTR tem dupla função no epitélio das VA: conduzir os íons cloreto e regular os ENaC. A ausência do CFTR produz um “upregulation” da expressão do gene ENaC, aumentando a absorção de sódio e provocando uma falência da secreção do cloreto regulada por AMPc. Anormalidades nos dois processos podem levar à depleção do volume do PLC, depleção dos mecanismos de “clearance” muco ciliar e culminar com a produção de placas de muco espessas e aderentes na superfície das VA dos pacientes fibrocísticos <sup>(27)</sup>.

O nível de atividade do CFTR parece ser governado por agentes sinalizadores na porção apical da célula, e o transporte epitelial de sódio e de cloreto, regulado por mensageiros intracelulares, em especial o cálcio e o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), sendo este último o responsável pela ativação de proteínas cinases e, portanto, pela fosforilação de canais e transportadores como o CFTR <sup>(26,27)</sup>.

Uma importante parte dos estudos sobre FC está envolvida na correlação genótipo-fenótipo da doença. Sendo possível prever a gravidade das manifestações fenotípicas órgão específicas de acordo com o genótipo, com alto poder preditivo para as alterações nas glândulas sudoríparas, no pâncreas e no sistema reprodutor. No entanto, tem sido difícil identificar correlações entre genótipo e fenótipo em relação à gravidade da doença pulmonar. Esta dificuldade pode ser decorrente do fato de que pacientes homocigóticos para a mutação  $\Delta F508$  apresentam quadro pulmonar variável quanto à sua gravidade. Este fato levou à constatação de que fatores ambientais juntamente com o “background” genético do hospedeiro contribuiriam para o desenvolvimento da doença pulmonar na FC <sup>(27)</sup>.

As manifestações clínicas da FC são muito variadas, até mesmo quando se obtém o controle da mutação do CFTR. Este fato tem levantado hipóteses sobre a

importância de modificações de genes nesse distúrbio. Mutações no gene que codifica o fator transformador de crescimento beta-1 (TGF- $\beta$ 1), aumentando sua expressão ou atividade, podem influenciar negativamente na resposta pulmonar às infecções (evidenciando a participação da resposta do hospedeiro à infecção). A modificação genética diminuindo a atividade do fator de inibição de macrófagos, mediador antiinflamatório, associa-se com menor infecção por *Pseudomonas aeruginosa* e menos insuficiência pancreática, confirmando uma importante participação da inflamação na patogênese da FC <sup>(13)</sup>.

A participação do processo inflamatório na FC parece ser mediada por produtos de neutrófilos, incluindo proteases e agentes oxidantes liberados nas VA, e recentes estudos têm relatado a participação da interleucina 8 (IL-8) e do óxido nítrico nos processos inflamatório e infeccioso desses pacientes <sup>(13)</sup>.

### 3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

#### 3.3.1 Acometimento das vias respiratórias

As principais causas de óbito na FC são: a insuficiência respiratória, o “cor pulmonale” e a desnutrição <sup>(7)</sup>.

Clinicamente o comprometimento pulmonar pode manifestar-se por bronquiolite, bronquite, bronquiectasias, pneumotórax, hemoptise, pneumonias recorrentes, fibrose pulmonar, colabamento dos brônquios, enfisema pulmonar, “cor pulmonale” e insuficiência respiratória <sup>(2)</sup>. A sintomatologia mais frequentemente observada inclui: tosse seca e curta, cansaço aos esforços, expiração prolongada, roncocal, atelectasia inexplicada e, com a evolução do quadro clínico, ocorrem episódios repetidos de infecções, taquipnéia, broncoespasmo e sinais de doença pulmonar obstrutiva crônica <sup>(29)</sup>.

Pacientes com FC, ao nascimento, apresentam pulmões aparentemente normais, seguido do desenvolvimento de infecções crônicas e recorrentes das vias aéreas nos primeiros anos de vida. Ou seja, a doença pulmonar da FC reflete falha nos mecanismos de defesa inatos dos pulmões contra agentes bacterianos inalados. Adicionalmente, há uma ligação entre o transporte epitelial

de íons e a defesa inata das vias aéreas contra patógenos bacterianos inalados <sup>(27)</sup>.

Em condições normais, o “clearance” do muco provê remoção mecânica das bactérias das vias aéreas em até 6 horas. Para que isto ocorra, é necessário que a camada de líquido periciliar (PLC) apresente altura e viscosidade adequadas para realizar batimento ciliar efetivo e lubrificação da superfície celular. Aliado a isso, há produção contínua de mucina no muco do PLC já desidratado e imobilizado, formação de tampões mucosos e uma relativa depleção de oxigênio nas áreas de placas próximas da superfície celular. Neste ambiente de hipóxia, bactérias como as da espécie da *P. aeruginosa* são capazes de se adaptar e crescer, de forma dependente de nitrato. Adicionalmente, os macrófagos e antibióticos apresentam dificuldade em penetrar nessas placas de muco <sup>(27)</sup>. A falta de um “clearance” mucociliar das vias aéreas (VA) facilita, portanto, a instalação e a recorrência de infecções, especialmente por *P. aeruginosa* e *S. aureus*, e a presença dessas placas de muco leva à obstrução das vias aéreas, desencadeando processos inflamatórios e infecciosos crônicos <sup>(7)</sup>.

As alterações otorrinolaringológicas incluem: produção de saliva espessa com dilatação e fibrose dos ductos glandulares; otites médias de repetição e de difícil tratamento; sinusopatia crônica e polipose nasossinusal <sup>(1)</sup>. Esta última é considerada a manifestação otorinolaringológica clássica da doença (rinorréia e obstrução nasal em mais de 65% dos indivíduos) <sup>(1,7)</sup>.

### 3.3.2 Acometimento do trato gastrointestinal

No aparelho digestivo, ocorre insuficiência pancreática por obstrução dos ductos excretores da glândula, ocasionando síndrome de má absorção, cirrose biliar, obstrução intestinal por estase fecal e, frequentemente, refluxo gastroesofágico. Dez a 15 % dos pacientes com FC apresentam íleo meconial (obstrução pós-natal do trato intestinal inferior), logo ao nascimento, dentro das primeiras 48 horas de vida, decorrente de impactação de rolhas de mecônio espesso no íleo terminal <sup>(1,7)</sup>. No Brasil, foram encontradas manifestações clínicas digestivas em 59,6% de 104 pacientes com FC, o balanço de gorduras nas fezes

esteve alterado em 67,9% destes, e íleo meconial foi detectado em 5,8% dos casos <sup>(6)</sup>.

A síndrome de má absorção, nessa doença, resulta, predominantemente, de disfunção pré-epitelial e é secundária à rejeição de nutrientes não hidrolisados no lúmen intestinal pela secreção pancreática insuficiente. Os ductos ficam obstruídos por muco espesso que impedem a chegada do suco pancreático no duodeno. Em 85% dos casos, o pâncreas produz enzimas (tripsina, lipase e amilase) em quantidades anormais. Ao ocorrer diminuição ou ausência de secreção destas enzimas, haverá uma absorção deficiente de lipídeos, proteínas e, em menor quantidade, de carboidratos; com isso, o paciente pode desenvolver esteatorréia, azotorréia e perda de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) <sup>(10,29)</sup>.

Aproximadamente 15% dos pacientes fibrocísticos têm função exócrina pancreática residual suficiente para a digestão normal e são chamados “suficientes pancreáticos”. Estes doentes apresentam um curso clínico mais suave, melhor estado nutricional, melhor crescimento e funcionamento pulmonar, bem como prognóstico geral melhor quando comparados aos “insuficientes pancreáticos”, que representam a maioria dos doentes <sup>(5,8)</sup>.

O tecido endócrino pancreático é preservado inicialmente, mas, com o passar dos anos, as células e o tecido glandular (completamente substituído por fibrose e gordura) são perdidos, podendo ocorrer intolerância à glicose e Diabetes *mellitus* em oito a 15 % dos pacientes <sup>(10,13)</sup>.

A desnutrição é considerada um dos principais fatores de mau prognóstico <sup>(3)</sup>. O quadro policarencial pode manifestar-se através de parada do crescimento, emagrecimento acentuado, deficiências nutricionais, atraso no desenvolvimento e comprometimento grave da função pulmonar, diminuindo a ventilação, a função muscular, a tolerância aos exercícios e a resposta imunológica dos pulmões. A intervenção nutricional na fibrose cística é, portanto, muito importante para a melhora do crescimento e na estabilização da função pulmonar <sup>(3,10)</sup>.

### 3.3.3 Acometimento do sistema reprodutor

O trato genital também é afetado, sobretudo nos homens quando se observa infertilidade em mais de 95% dos casos. Isto ocorre associado a um fenótipo conhecido como ausência bilateral congênita de “vas deferens”, ou obstrução congênita dos ductos deferentes <sup>(5,7)</sup>. Nas mulheres, o muco cervical espesso e com características bioquímicas alteradas, resulta em infertilidade <sup>(7)</sup>.

Outras complicações importantes no quadro clínico desses pacientes incluem a doença óssea por deficiência de absorção de 25-hidroxi-vitamina D presente na maioria dos pacientes fibrocísticos <sup>(13)</sup>.

### 3.3.4 Aspectos celulares e moleculares dos canais CFTR e ENAc:

O ácido ribonucléico–mensageiro (RNAm) do gene FC normal vai ser traduzido nos ribossomos agregados à face rugosa do retículo endoplasmático (RE) onde vai sofrer modificações pós–traducionais. Após isso, e com sua pré-estrutura ativa (“folding”), essa proteína será carregada para o complexo de Golgi, onde será glicosilada apropriadamente e assumirá sua estrutura funcional definitiva denominada banda C. Esta será então empacotada em vesículas e poderá ser conduzida a dois destinos <sup>(30)</sup>.

1 – As vesículas poderão migrar direto para a membrana plasmática na porção apical da célula, onde se instalarão e iniciarão sua atividade;

2 – Poderão migrar para o endossomo, que funciona como um sistema de reserva e resposta rápida à necessidade de extrusão do  $\text{Cl}^-$  da célula.

Esse mesmo sistema endossomal é responsável pela reciclagem desses transportadores, assim como pela sua degradação para re-aproveitamento de componentes através de sua conexão com os lisossomos, os quais também atuam no sistema de controle da qualidade das proteínas processadas no RE, degradando as que não apresentam o seu “folding” correto <sup>(30)</sup>. Apesar disso, esse processo de maturação conformacional de CFTR é considerado pouco eficiente, pois 75% das moléculas CFTR normais são degradadas pelo aparato de controle de qualidade logo após a sua síntese <sup>(17)</sup>.

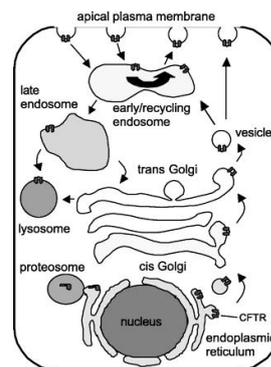


Figura 2 - Localizações intracelulares do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) durante sua maturação, inserção na membrana plasmática e degradação. Quando corretamente estruturada, o CFTR nascente deixa a face rugosa do RE e migra através do Complexo de Golgi onde sofre glicosilações até se tornar uma proteína madura (banda C). A CFTR madura deixa o Golgi em vesículas que podem migrar para a membrana apical ou para o endossomo para ser reciclada. As vesículas contendo CFTR migram constantemente do endossomo para a membrana plasmática e vice – versa, com taxas de migração e de distribuição dependentes do tipo celular, da diferenciação celular e das condições de fosforilação. Eventualmente CFTR migra do endossomo para a via de degradação pelo lisossomo. CFTR mal – estruturado ou mutado, além de uma quantidade significativa de CFTR normal nascente do RE são degradadas pelo proteossomo (BERTRAND; FRIZZELL, 2003).

CFTR na forma madura e ativa, além de sofrer um controle de sua exposição na membrana apical pelo endossomo, também é regulada internamente por fosforilação, de forma que a liberação de cloreto é controlada e previsível, visando manter a homeostase da célula.

Tendo em vista o funcionamento normal do CFTR, pode ser demonstrado claramente que qualquer evento que afete a migração do CFTR através do citoplasma para a membrana plasmática, sua reciclagem pelo endossomo ou que altere a estrutura ativa da proteína, interferindo no seu mecanismo de regulação, pode acarretar uma variação do efluxo de  $\text{Cl}^-$ , ocasionando determinadas patologias como os surtos diarreicos ocasionados pela toxina de *Vibrio cholerae*, causados pelo aumento da concentração do AMPc <sup>(18,21)</sup>.

### 3.3.5 CFTR na fibrose cística

A mutação  $\Delta\text{F508}$  interfere com o “folding” normal da proteína, com sua glicosilação e com o funcionamento do canal na membrana apical, interferindo na probabilidade de abertura do canal (Po) <sup>(31,33)</sup>.

Com relação ao primeiro caso, a alteração da estrutura afeta a interação da proteína com o sistema de controle de qualidade, além de afetar sua estabilidade estrutural na membrana e seu funcionamento como canal, o que leva a um aumento de sua internalização pelo endossomo<sup>(17)</sup>.

O sistema de controle de qualidade reconhece falhas no “folding” da proteína, bloqueando sua migração seja pela associação a chaperones moleculares ou por sinalização para degradação via ubiquitina<sup>(32,34)</sup>. Estudos de marcação em campo pulsado demonstraram que essa degradação pela via da ubiquitina-proteossomo é diretamente afetada pela mutação  $\Delta F508$ , visto que, enquanto a meia-vida citoplasmática de CFTR normal varia de 18–48 horas, dependendo do tipo de célula, CFTR -  $\Delta F508$  tem uma meia vida de ~ 4 horas, mesmo na presença de substâncias que atuam como chaperones (p.e. glicerol) ou em temperatura reduzida (que também favorece a migração de CFTR, mesmo mutado)<sup>(35,36)</sup>.

Com relação a como a mutação  $\Delta F508$  afeta o padrão de glicosilação de CFTR, isso ainda não está totalmente esclarecido. Porém, estudos demonstraram que apesar de tanto a proteína mutante quanto a selvagem sofrerem aparentemente o mesmo processo de glicosilação com a adição de polilactosamina, na proteína mutante só ocorre a alongação correta deste polissacarídeo em baixas temperaturas. Aparentemente, isto está relacionado ao fato de que a CFTR- $\Delta F508$  em baixas temperaturas (21-26°C) é retida por mais tempo no complexo de Golgi, possibilitando sua glicosilação<sup>(37)</sup>. Além disso, células FC e não-FC apresentam diferenças significativas nas concentrações de flucose e ácido siálico, o que pode confirmar que a glicosilação da proteína mutada seria afetada em condições normais<sup>(39,40)</sup>.

### 3.3.6 ENaC e fibrose cística

Os ENaC apresentam uma seletividade para  $\text{Na}^+$  bem maior do que para  $\text{K}^+$ . Este canal, cuja função é manter a homeostasia de  $\text{Na}^+$ , é regulado de forma cuidadosa, diferente dos canais de sódio dependentes de ligantes ou de voltagem, cuja abertura, fechamento e inativação devem ser rápidas<sup>(41)</sup>. São formados por três tipos de subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$

e  $\gamma$  ENaC). Cada subunidade possui 2 domínios transmembrana e seus terminais amina e carboxila se localizam no citoplasma e se organizam em heteromultímeros de quantidade variável (variando de 4 a 9 subunidades no total)<sup>(42,43)</sup>.

Qualquer alteração nos ENaC, como falhas no “folding”, na migração através do citoplasma ou mutações no terminal carboxila de algumas das subunidades, acarreta falhas na manutenção da homeostase de  $\text{Na}^+$ , podendo levar a diversos quadros patológicos como hipertensão<sup>(44)</sup>, doença de Liddle<sup>(45)</sup> e edema pulmonar<sup>(46)</sup>, além da FC, figura 2.

A ação dos ENaC é regulada hormonalmente via sistema renina-angiotensina-aldosterona, que ativa a transcrição de diversos genes, inclusive o do ENaC. O aumento da expressão do gene ENaC aumenta sua migração até o Golgi. Nesta organela, a proteína sofre clivagens nos seus domínios  $\alpha$  e  $\gamma$ , tornando-se ativa. Após esta clivagem, a Po do canal aumenta de 0,02 a 0,6<sup>(47)</sup>, aumentando o influxo do sódio<sup>(48)</sup>.

Outro sistema de regulação é via vasopressina, a qual se liga aos receptores V2 e estimula aumento de AMPc, ativando PKA. Além da PKA, outra cinase, a cinase induzida por glicocorticóides (SGK) atua no mesmo substrato da mesma maneira: bloqueando a endocitose e a degradação pelos lisossomos via fosforilação de Nedd4-2 (uma ligase de ubiquitina), que faz parte da via de degradação ubiquitina - proteossoma. Em paralelo, o AMPc estimula a exocitose de ENaC, aumentando o influxo de  $\text{Na}^+$ <sup>(41,49,45)</sup>.

Além da regulação hormonal, os ENaC também são regulados por diversos outros fatores:

1. Efeitores negativos: como ácido araquidônico, PKC e cinase ativada por AMP<sup>(50,52)</sup>.
2. Efeitores positivos: fosfatidilinositol 4,5 – bifosfato (PIP2) e I $\kappa$ B cinase –  $\beta$ <sup>(43,53)</sup>.

### 3.3.7 Diagnóstico

O diagnóstico da FC é sugerido somando-se as manifestações clínicas com a história familiar, e confirmado pela demonstração de níveis elevados de cloreto no suor, pelo método de Gibson e Cooke<sup>(1-8)</sup>. Este teste mensura a quantidade de cloreto e sódio no suor e tem sensibilidade

próxima aos 98 %. É realizado através da estimulação das glândulas sudoríparas pela aplicação de pilocarpina na pele do antebraço, com coleta do suor para iontoforese. Valores de cloreto acima de 60 mEq/l confirmam o diagnóstico; valores entre 40 e 60 mEq/l são duvidosos, e inferiores a 40, são considerados normais <sup>(1)</sup>. Apesar de este teste ser considerado “padrão ouro” no diagnóstico da FC, sabe-se, atualmente que, em 1 a 2 % dos indivíduos com a doença, as concentrações de cloreto no suor podem estar normais ou serem duvidosas <sup>(11)</sup>.

Além do teste do suor, a doença pode ser diagnosticada por exame de DNA a partir de amostras de sangue coletadas através do teste do pezinho ou não <sup>(7)</sup>.

### 3.3.8 Tratamento

#### 3.3.8.1 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA CFTR:

Como a proteína CFTR sofre a influência de diversos fatores para seu funcionamento normal que afetam a sua migração RE – Golgi – membrana plasmática – endossomo, sua expressão gênica e a sua ativação por fosforilação, existem diversos possíveis alvos moleculares para testar novas drogas no controle da ausência de efluxo de Cl<sup>-</sup> em pacientes com FC e CFTR - ΔF508 <sup>(20)</sup>. Dentre estes fatores estão: reguladores da migração citoplasmática, ativadores da expressão gênica, moduladores da fosforilação e inibidores de “stop codons”.

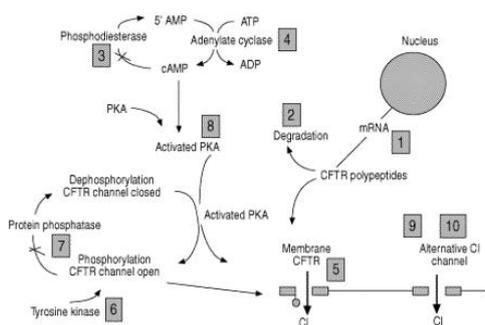


Figura 3 - Potenciais alvos moleculares para a manipulação farmacológica da ativação dos canais de cloreto. Os mecanismos são indicados pelos seguintes números: 1 – aumento da migração citoplasmática; 2 – diminuição da ubiquitinação; 3 – inibição da fosfodiesterase; 4 – ativação da ciclase de adenilil; 5 - ativação direta de CFTR; 6 – ativação da cinase de tirosina; 7 – inibição da fosfatase; 8 – regulação de CFTR por monofosfato de adenosina cíclico (AMPc); 9 – ativação de outros canais de cloreto; 10 – ativação de CFTR mediada pela cinase de cálcio – calmodulina, ATP (rifosfato de adenosina), ADP (difosfato de adenosina), PKA (proteína cinase A) e RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) (RODGERS; KNOX, 2001).

1 – Reguladores da migração citoplasmática: algumas substâncias têm demonstrado “in vitro” um potencial uso como chaperones moleculares, aumentando a disponibilidade citoplasmática de CFTR - ΔF508. Devido a isso, o total de canais CFTR na membrana apical aumenta, aumentando efluxo de Cl<sup>-</sup>. São eles os poliálcoois, como glicerol, sorbitol e mio – inositol; as aminas como betaína e N – óxido de trimetilamina (TMAO), além de solventes como dimetil sulfoxido – DMSO e D2O <sup>(6,17)</sup>. Além destas, outras drogas também aumentam a disponibilidade da CFTR - ΔF508 madura no citoplasma como a doxorubicina – Dox (um derivado antracíclico) e os derivados por substituição do benzo [c] quinolizínio (MBP) <sup>(61,63)</sup>. Outras drogas, como a “deoxyspergualin” (DSG) atuam interferindo no sistema de controle de qualidade ubiquitina – proteossomo, dificultando a degradação de CFTR - ΔF508 <sup>(64)</sup>, enquanto que a Tapsigargina (TP) pode interferir com o mesmo sistema através da inibição dos canais de Ca<sup>2+</sup> do RE. Em baixas concentrações citoplasmáticas de cálcio, os chaperones moleculares dependentes de Ca<sup>2+</sup> não ativariam o aparato do proteossoma, aumentando a disponibilidade citoplasmática e na membrana apical de CFTR - ΔF508 <sup>(65)</sup>.

2 – Ativadores da expressão gênica: substâncias que atuam causando uma “upregulation” do gene FC, aumentando os níveis de transcrição e levando a uma maior síntese da proteína CFTR - ΔF508. Essa maior quantidade levaria a um maior número de canais CFTR na membrana apical e aumentaria o efluxo de Cl<sup>-</sup>, mesmo sendo uma grande quantidade degradada pelo sistema de controle de qualidade ubiquitina – proteossomo. As substâncias mais promissoras para esse tipo de ação na FC são os derivados do ácido butírico, principalmente o Sódio 4 - fenilbutirato (4 – PBA). Além do aumento da expressão do gene FC, 4 - PBA também diminuiu a expressão do gene da Hsc-70, que faz parte do sistema de controle de qualidade ubiquitina – proteossomo, favorecendo ainda mais essa ação <sup>(66, 67)</sup>.

3 – Moduladores da fosforilação: essas substâncias podem atuar internamente em diversos pontos para afetar a fosforilação e a ativação do CFTR <sup>(21)</sup>.

#### 3.1- Inibidores de fosfodiesterases (PDE):

Substâncias que inibem essa enzima favorecem a fosforilação de CFTR - ΔF508, pois bloqueiam a degradação

de AMPc, o qual ativa a PKA que fosforila essa proteína<sup>(21)</sup>. Diversas drogas são conhecidas por atuar sobre PDE como “1 – methyl – 3 – isobutyl – xanthine” (IBMX) e “1 – cyclopentil – 1,3 – dipropylxanthine (CPX) são mais efetivas quando associadas à foscolina, um ativador de AC. Ambos são inibidores não seletivos de PDE, talvez por isso seus resultados “in vitro” possam ser contraditórios, dependendo da linhagem celular utilizada<sup>(61,68)</sup>. Mais promissores têm sido os inibidores de PDE seletivos para AMPc, como a milrinona e a amrinona, pois foi demonstrado experimentalmente “in vitro” que podem aumentar o efluxo de Cl<sup>-</sup> de forma independente da foscolina, aumentando os níveis de AMPc<sup>(68,69)</sup>.

### 3.2 - Inibidores de fosfatase:

Uma das mais estudadas quanto a sua possível utilização no tratamento da FC é a isoflavona genisteína, um inibidor de tirosina cinase que é capaz de aumentar o efluxo de Cl<sup>-</sup> via CFTR em combinação com a foscolina. Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, mas pode ser devido à inibição da fosfatase, o que mantém o canal CFTR ativo constitutivamente. Essa isoflavona tem sido testada quanto ao seu uso por via oral durante a alimentação para minorar os sintomas da FC e aumentar o efluxo de Cl<sup>-</sup> com resultados promissores<sup>(70)</sup>.

### 3.3 - Ativadores de ciclases de guanilil (GC):

O mecanismo exato de ação ainda não foi descrito, mas foi observado experimentalmente que drogas que ativam as GC (p.e. peptídeo natriurético tipo C – CNP, um ligante para a GC tipo C) quando combinadas com isoprenalina aumentam o efluxo de Cl<sup>-</sup> via PKA. Dois mecanismos são propostos para isso: fosforilação direta via proteína cinase dependente de GMPc ou competição com AMPc em nível de PDE. Isso acarretaria um aumento da concentração de AMPc no citoplasma, ativando PKA que fosforilaria CFTR<sup>(68,71)</sup>.

4 - Nucleotídeos trifosfatados como ativadores de outros canais de cloreto:

Uma estratégia para aumentar o efluxo de cloreto seria estimular a abertura de outros canais de Cl<sup>-</sup>. Um canal que aparentemente responderia bem a essa técnica é o canal de retificação por saída de cloreto (ORCC). Este canal é ativado via CFTR de forma indireta, pois durante a

fosforilação de CFTR pela PKA, ocorre um fluxo de ATP através da membrana plasmática. Este ATP se liga aos receptores P2, que ativam ORCC. Esse fluxo de ATP ainda não é totalmente conhecido, mas o fato é que o defeito da mutação CFTR - ΔF508 poderia ser compensado pela utilização local de ATP ou UTP. Além disso, estudos estão sendo realizados para a descoberta de agonistas do receptor P2Y2 que poderiam ativar ORCC<sup>(72,73)</sup>.

### 5 - Aumento de cálcio intracelular:

O aumento de concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular pode aumentar o efluxo de Cl<sup>-</sup> através da via de sinalização de cloreto regulada por cálcio. Inibidores do seqüestro de Ca<sup>2+</sup> pelos estoques intracelulares como taspigargina, ácido ciclopiazônico e 2,5 – di – (tert – butil)-1,4 – hidroquinona (DBHQ) também afetam a migração de CFTR pelo citoplasma devido a inibição das proteínas dependentes de Ca<sup>2+</sup> como a calnexina e glicoproteína glicosil transferase, ambas associadas ao maquinário de controle de qualidade do “folding” no RE<sup>(74,75)</sup>.

### 6 – Inibidores de “stop codons”:

O surgimento de um códon de parada acarreta a formação de uma proteína truncada, a qual não apresenta sua atividade normal. O uso de aminoglicosídeos tem demonstrado resultados interessantes no sentido de encobrir estes códon da leitura pelo ribossomo, evitando o truncamento da proteína, a qual mesmo geneticamente anormal poderia migrar pelo citoplasma e chegar à membrana plasmática, como no caso de CFTR. Esse tipo de efeito já foi verificado experimentalmente, mas aparentemente existe um fator etnogenético associado, visto que resultados positivos só foram obtidos em comunidades de judeus Ashkenazi e em poucos tipos de células “in vitro”, sendo necessários mais estudos<sup>(76,77)</sup>.

## 3.3.8.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO PARA ENAC

Um tratamento complementar para a FC é evitar a absorção de Na<sup>+</sup> através dos ENaC e da Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - ATPase, que são ativados por CFTR - ΔF508<sup>(20,78)</sup>. Uma das tentativas de evitar a absorção de sódio através da membrana apical das células epiteliais consiste em inativar os ENaC. Uma das drogas com potencial para isso é a

amilorida, um inibidor do transporte de  $\text{Na}^+$  tanto “in vivo” quanto “in vitro” que pode ser administrado por via inalatória, indicado na prevenção do declínio da função pulmonar <sup>(7)</sup>. Porém, estudos demonstraram que sua eficiência “in vivo” é de curta duração (~30 minutos) e transitória (novas doses não repetem o mesmo efeito) <sup>(78)</sup>. Um análogo da amilorida, o benzamil, apresentou um efeito mais duradouro e resultados mais efetivos <sup>(79,80)</sup>. Entretanto, o desenho racional de novas drogas a partir destes precursores pode representar uma excelente alternativa terapêutica no futuro.

A inibição do influxo de  $\text{Na}^+$  pode ser conseguida também com a inibição da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase por glicosídeos cardiotoxícos, como a ouabaína e a digoxina, ou a inibição do fluxo total de  $\text{Na}^+$  pelo agonista de receptores opióides, loperamida. A ouabaína apresentou bons resultados “in vitro”, enquanto que a digoxina demonstrou uma excelente ação “in vivo”, demonstrando a sua possível utilização terapêutica na FC em doses não tóxicas <sup>(81,82)</sup>. Quanto à loperamida, apesar de resultados “in vivo” demonstrarem sua ação na redução do influxo de  $\text{Na}^+$  na membrana de células epiteliais, seu efeito é ainda menos potente do que o da amilorida supracitada <sup>(83)</sup>.

Outra possibilidade terapêutica para FC é o tratamento associado de ativadores de canais de  $\text{Cl}^-$  como ORCC e inibidores de canais de  $\text{Na}^+$  (p.e. uridina trifosfato - UTP + amilorida), mas muitos testes ainda têm de ser realizados antes desta possível utilização <sup>(83,84)</sup>.

### 3.3.8.3 TERAPÊUTICA INALATÓRIA POR BRONCODILATADORES

Broncodilatadores  $\beta_2$  – adrenérgicos (salbutamol, terbutalina, fenoterol) promovem broncodilatação, melhoram o transporte ciliar do muco e o batimento ciliar. A desvantagem é predispor ao colapso das vias aéreas <sup>(7,29)</sup>.

### 3.3.8.4 TRATAMENTO NÃO FARMACOLÓGICO PARA FC

O primeiro passo no tratamento não farmacológico consiste no esclarecimento dos pais sobre a doença, suas manifestações e a sua responsabilidade pela eficácia do tratamento, que deve ser precoce e contínuo por

toda a vida. Além disso, é necessária uma estimulação constante para os pais devido aos cuidados especiais que devem ser despendidos ao afetado e ao alto custo terapêutico, explicitando que, se possível, o paciente deve ser encaminhado a um serviço especializado <sup>(29)</sup>.

Para a insuficiência digestiva, além da conduta médica, o acompanhamento nutricional deve ser enfatizado com uma dieta hipercalórica, hiperprotéica e rica em gorduras devido às necessidades energéticas do paciente <sup>(3,6)</sup>. Além disso, a dieta deve ser acompanhada de suplementos dietéticos, salinos, vitamínicos e enzimas pancreáticas, além da administração endovenosa de gorduras e de nutrição parenteral em casos de desnutrição grave <sup>(7,29)</sup>.

Com relação à doença pulmonar é recomendada a inalação de substâncias salinas hipertônicas (embora o efeito seja de curta duração), lavagem nasal, exercícios aeróbicos, fisioterapia respiratória especializada, controle das infecções pulmonares e tratamento cirúrgico em último caso <sup>(1,7,14,15,29)</sup>.

### 3.3.9 Prognóstico e aconselhamento genético

Sem o tratamento adequado, o mais comum é o óbito do lactente por desnutrição. Com o tratamento adequado, a perspectiva é de uma sobrevida de 20 anos com possível óbito por doença pulmonar e/ou cirrose <sup>(29)</sup>.

Os pais devem ser informados que, por ser uma doença autossômica recessiva, existe um alto risco de recorrência em novos nascimentos. O risco de um irmão do afetado (no caso, um novo filho do casal) ser homozigoto recessivo é de 25%, e de ser portador assintomático é de 50% <sup>(29)</sup>.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como demonstrado anteriormente, diversos são os alvos moleculares da FC que podem ser atacados por diferentes drogas objetivando o aumento do efluxo epitelial de  $\text{Cl}^-$  e a diminuição do influxo de  $\text{Na}^+$ . Seja através da ação direta sobre os canais CFTR e ENaC ou sobre canais alternativos. Seja através de ativadores da fosforilação ou do aumento da migração citoplasmática, da glicosilação ou da redução da degradação de CFTR -  $\Delta\text{F508}$ , é potencialmente importante que esse conjunto de drogas seja avaliado em testes clínicos para avaliar seu potencial sinérgico, pois

como demonstrado anteriormente, todas as drogas citadas têm seu efeito alterado dependendo do tipo de célula, do tipo de experimento (se “in vitro” ou “in vivo”), de fatores étnicos e do tipo de modelo utilizado no estudo<sup>(17,20)</sup>.

Além disso, a FC apresenta-se com uma fisiopatologia ideal para estudos de farmacogenômica e de terapia gênica<sup>(85, 86)</sup>, estando algumas técnicas terapêuticas em estudos clínicos de fase I<sup>(87)</sup>. Essas técnicas só foram possíveis após a clonagem do gene CFTR e o desenvolvimento de modelos experimentais de FC em animais, o que permitiu a elaboração de técnicas de DNA recombinante e antiproteases, além da terapia gênica propriamente dita<sup>(1)</sup>.

Em paralelo com as novas perspectivas de tratamento, novas metodologias para a detecção precoce da FC (como as técnicas de genotipagem para identificar as mutações) podem melhorar a perspectiva para o tratamento, melhorando a qualidade de vida dos afetados<sup>(13)</sup>.

## REFERÊNCIAS

- Balbani APS, Sanchez TG, Marone SAM, Butugan O. Fibrose cística, imunodeficiências e discinesia ciliar primária: causas de infecções de repetição das vias aéreas superiores. Disponível em: <http://www.hcnet.usp.br/otorrino/arq5/causas.htm>. Acesso em: 25 de novembro de 2006.
- Andrade EF, Fonseca, DLD, Abreu E Silva, FA; Menna – Barreto, SS. Avaliação evolutiva da espirometria na fibrose cística. **J Pneumol**. 27: 130-136. 2001.
- Reis FJC, Oliveira MCL, Penna FJ, Oliveira MGR, Monteiro APAF. Quadro clínico e nutricional de pacientes com fibrose cística: 20 anos de seguimento no HC – UFMG. **Rev Assoc Med Bras**. 46: 325-330. 2000.
- Pereira L, Raskin S, Freund AA, Ribas PD, Castro RMV, Pignatti PF, Culpi L. Cystic fibrosis mutations R1162X and 2183AA G in two southern brazilian states. **Genet Mol Biol**. 22: 291-294. 1999.
- Nussbaum RL, Mcinnes RR, Willard HF. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan; 2002.
- Alvarez AE, Ribeiro AF, Hessel G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **J Pediatr**. 80: 371-379. 2004.
- Arato HD: Fibrose Cística. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/DHG/DHG017.htm>. Acesso em: 01 de dezembro de 2006.
- Lemos ACM, Matos E, Franco R, Santana P, Santana MA. Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. **J Bras Pneum**. 30: 9-13. 2004.
- Raskin S, Phillips JA 3<sup>rd</sup>, Krishnamani MR, VNencak-Jones C, Parker RA, Rozov T. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. **Am J Med Genetics**. 46: 665-669. 1993.
- Fiates GMR, Barbosa E, Auler F, Feiten SF, Miranda F. Nutrição de pessoas com fibrose cística. **Rev Nutr**. 14: 95-101. 2001.
- Silva Filho LVF, Bussamra MHCF, Nakaie CMA, Adde FV, Rodrigues JC, Raskin S. Cystic fibrosis with normal sweat chloride concentration – case report. **Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo**. 58: 260-262. 2003.
- Okay TS, Oliveira WP, Raiz – Júnior R, Rodrigues JC, Del Negro GMB. Frequency of the  $\Delta F508$  mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported brazilian data. **Clinics**. 60:131-134. 2005.
- Accurso FJ. Update in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**. 173: 944-947. 2006.
- Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CCJ, Plum F. **Cecil essential of medicine**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998: 131.

15. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. **Eur Respir J.** 23: 146-158. 2004.
16. Vera AL, Henríquez-Roldán CF, González FJR, Molina GF. Búsqueda de la mutación delta F508 y análisis de dos polimorfismos de nucleótido único en el gen CFTR, en una muestra de población general de Valparaíso, Chile. **Rev Med Chile.** 133: 767-775. 2005.
17. Gelman MS, Kopito RR. Rescuing protein conformation. prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis. **J Clin Invest.** 110: 1591-1597. 2002.
18. Jentsch TJ, Maritzen T, Zdebik AA. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. **J Clin Invest.** 115: 2039-2046. 2005.
19. Ostedgaard LS, Baldursson O, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by its R domain. **J Biol Chem.** 276: 7689-7692. 2001.
20. Rodgers HC, Knox AJ. Pharmacological treatment of the biochemical defect in cystic fibrosis airways. **Eur Respir J.** 17: 1314-1321. 2001.
21. Noone PG, Knowles MR. "CFTR –opathies": disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. **Respir Res.** 2: 328-332. 2001.
22. Cohn JA, Bornstein JD, Jowell PS. Cystic fibrosis mutations and genetic predisposition to idiopathic chronic pancreatitis. **Med Clin North Am.** 84: 621-631. 2000.
23. Ockenga J, Stuhmann M, Ballmann M, Teich N, Keim V, Dork T, Manns MP. Mutations of the cystic fibrosis gene, but not cationic trypsinogen gene, are associated with recurrent or chronic idiopathic pancreatitis. **Am J Gastroenterol.** 95: 2061-2067. 2000.
24. Wang X, Moylan B, Leopold DA, Kim J, Rubenstein RC, Togias A. Mutation in the gene responsible for cystic fibrosis and predisposition to chronic rhinosinusitis in the general population. **JAMA.** 284: 1814-1819. 2000.
25. Cui L, Aleksandrov L, Hou YX, Gentsch M, Chen JH, Riordan JR, Aleksandrov AA. The role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator phenylalanine 508 side chain in ion channel gating. **J Physiol.** 572: 347-358. 2006.
26. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. **Farmacologia.** 5ª ed. São Paulo: Elsevier; 2003. p. 76-73.
27. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. **Eur Respir J.** 23: 146-158. 2004.
28. Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. **J Clin Invest.** 103: 309-312. 1999.
29. Murahovschi J: **Pediatría – Diagnóstico + tratamiento.** 5ª ed. São Paulo – SP: Sarvier; 1998. p. 299-302.
30. Bertrand CA, Frizzell RA. The role of regulated CFTR trafficking in the epithelial secretion. **Am J Physiol Cell Physiol.** 285: 1-18. 2003.
31. Haws CM, Winegar BD, Lansman, JB. Block of single L-type Ca<sup>2+</sup> channels in skeletal muscle fibres by aminoglycoside antibiotics. **J Gen Physiol.** 107: 421-432. 1996.
32. Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. Setting the standards quality control in the secretory pathway. **Science.** 286: 1882-1888. 1999.
33. Scanlin TF, Glick MC. Glycosylation and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Respir Res.** 2: 276-279. 2001.
34. Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. **Physiol Rev.** 79: 167-173. 1999.
35. Sharma M, Benharouga M, Hu W, Lukacs GL. Conformation and temperature – sensitive stability defects of delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance

- regulator in post – endoplasmic reticulum compartments. **J Biol Chem.** 276: 8942-8950. 2001.
36. Heda GD, Tanwani M Marino CR. The delta F508 mutations shortens the biochemical half – life of plasma membrane CFTR in polarized epithelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** 280: 166-174. 2004.
37. O’Riordan CR, Lachapelle AL, Marshall J, Higgins EA, Cheng AH. Characterization of the oligosaccharide structures associated with the cystic fibrosis Transmembrane conductance regulator. **Glycobiology.** 10: 1225-1233. 2000.
38. Bannykh SI, Bannykh GI, Fish KN, Moyer BD, Riordan JR, Balch WE. Traffic pattern of cystic fibrosis transmembrane regulator through the early exocytic pathway. **Traffic.** 1: 852-870. 2000,
39. Glick MC, Kothari VA, Liu A, Stoykova LI, Scanlin TF. Activity of fucosyltransferases and altered glycosylation in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Biochimie.** 83: 743-747. 2001.
40. Stoykova LI, Liu A, Scanlin TF, Glick MC. Alpha1,3 fucosyltransferases in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Biochimie.** 85: 363-367. 2003.
41. Snyder PM. Regulation of epithelial Na<sup>+</sup> channel trafficking. **Endocrinology.** 146: 5079-5085. 2005.
42. Staruschenko A, Adams E, Booth RE, Stockand JD. Epithelial Na<sup>+</sup> channel subunit stoichiometry. **Biophys J.** 279: 27729-27734. 2005.
43. Staruschenko A, Medina JL, Patel p, Shapiro MS, Booth RE, Stockand JD. Fluorescence resonance energy transfer analysis of subunit stoichiometry of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. **J Biol Chem.** 278: 27729-27734. 2004.
44. Lifton J, Seetharam D, Broxton M, Paradiso, J. A. **Pushpin computing system overview: A platform for distributed, embedded, ubiquitous sensor networks.** In Pervasive ’02: Proceedings of the First International Conference on Pervasive Computing; 2002. 139–151.
45. Flores SY, Debonneville C, Staub O. The role of Nedd4/Nedd4-like dependant ubiquitylation in epithelial transport processes. **Pflugers Arch.** 446: 334-338. 2003.
46. Mall M, Grubb BR, Harkema JR, O’Neal WK, Boucher RC. Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis – like lung disease in mice. **Nat Med.** 10: 4887-4893. 2004.
47. Caldwell RA, Boucher RC, Stutts MJ. Serine protease activation of near – silent epithelial Na<sup>+</sup> channels. **Am J Physiol Cell Physiol.** 286: 190-194. 2004.
48. Stockand JD. New ideas about aldosterone signaling in epithelia. **Am J Physiol Renal Physiol.** 282: 559-576. 2002.
49. Schafer JA. Abnormal regulation of ENaC syndromes of salt retention and salt wasting by the collecting duct. **Am J Physiol Renal Physiol.** 283: 221-235. 2002.
50. Carattino MD, Edinger RS, Grieser HJ, Wise R, Neumann D, Schlattner U, Johnson JP, Kleyman TR, Hallows KR. Epithelial sodium channel inhibition by AMP – activated protein kinase on oocytes and polarized renal epithelial cells. **J Biol Chem.** 280: 1760-1761. 2005.
51. Carattino MD, Hill WG, Kleyman TR. Arachidonic acid regulates surface expression of epithelial sodium channels. **J Biol Chem.** 278: 36202-36213. 2003.
52. Booth RE, Stockand JD. Targeted degradation of ENaC in response to PKC activation of the ERK1/2 cascade. **Am J Physiol Renal Physiol.** 280: 1031-1037. 2001.
53. Lebowitz J, Edinger RS, An B, Perry CJ, Onate S, Kleyman TR, Johnson JP. I $\kappa$ B kinase –  $\alpha$  (i $\kappa$ B $\alpha$ ) modulation of epithelial sodium channel activity. **J Biol Chem.** 279: 41985-41990. 2004.
60. Zhang XM, Wang XT, Yue H, Leung SW, Thibodeau PH, Thomas PJ. Organic solutes rescue the functional defect

- in delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **J Biol Chem.** 278: 51232-51242. 2003.
61. McPherson MA, Pereira MM, Russell D, McNeilly CM, Morris RM, Stratford FL, Dormer RL. The CFTR-mediated protein secretion defect: pharmacological correction. **Pflugers Arch.** 443: 121-126. 2001.
62. Dormer RL, Derand R, McNeilly CM, Mettey Y, Bulteau-Pignoux L, Metaye T. Correction of DeltaF508 – CFTR activity with benzo (c) quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. **J Cell Sci.** 114: 4073-4081. 2001.
63. Maitra R, Shaw CM, Stanton BA, Hamilton JW. Increased functional cell surface expression of CFTR and DeltaF508 – CFTR by the anthracycline doxorubicin. **Am J Physiol Cell Physiol.** 280: 1031-1037. 2001.
64. Jiang C, Fang SL, Xiao YF, O'Connor SP, Nadler SG, Lee DW. Partial restoration of cAMP – stimulated CFTR chloride channel activity in DeltaF508 cells by deoxyspergualin. **Am J Physiol.** 275: 171-178. 1998.
65. Egan ME, Glockner-Pagel J, Ambrose C, Cahill PA, Pappoe L, Balamuth N, Cho E, Canny S, Wagner CA, Geibel J, Caplan MJ. Calcium – pump inhibitors induce functional surface expression of DeltaF508 – CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. **Nat Med.** 8: 485-492. 2002.
66. Rubenstein RC, Zeitlin PL. Sodium 4 – phenylbutyrate down regulates Hsc 70: implications for intracellular trafficking of  $\Delta$ F508 – CFTR. **Am J Physiol.** 278: 259-267. 2000.
67. Lim M, McKenzie K, Floyd AD, Kwon E, Zeitlin PL. Modulation of deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and function with 4-phenylbutyrate and flavonoids. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 31: 351-357. 2004.
68. Kelley TJ, Al – Nakkash L, Drumm ML. C – type natriuretic peptide increases chloride permeability in normal and cystic fibrosis airway cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 16: 464-470. 1997.
69. Tanwiphongtrakun T, Inoue S, Furuya H. Proper use of phosphodiesterase inhibitors according to the situations. **Acta Anaesthesiol Taiwan.** 44: 183-185. 2006.
70. Al-Nakkash L, Clarke LL, Rottinghaus GE, Chen YJ, Cooper K, Rubin LJ. Dietary genistein stimulates anion secretion across female murine intestine. **J Nutr.** 136: 2785-2790. 2006.
71. D'Angelis CA, Nickerson PA, Ryan RM, Swartz DD, Holm BA. C-type natriuretic peptide and its receptor are downregulated in pulmonary epithelium following birth. **Histochem Cell Biol.** 126: 317-324. 2006.
72. Noone PG, Hamblett N, Accurso F, Aitken ML, Boyle M, Dovey M. Safety of aerosolized INS 365 in patients with mild to moderate cystic fibrosis: results of a phase I multicenter study. **Pediatr Pulmonol.** 32: 122-128. 1999.
73. Ma HP, Zhou ZH, Liang YY, Saxena S, Warnock DG. Acidic ATP activates lymphocyte outwardly rectifying chloride channels via a novel pathway. **Pflugers Arch.** 449: 105-196. 2004.
74. Egan ME, Cahill PA, Ambrose CA, Pappoe L, Geibel JP, Caplan M. Small molecules approach to increasing  $\Delta$ F508 – CFTR surface expression in CF epithelial cells. **Pediatr Pulmonol.** 19: 242. 2000.
75. Norez C, Antigny F, Becq F, Vandebrouck C. Maintaining low Ca<sup>2+</sup> level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. **Traffic.** 7: 562-573. 2006.
76. Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. **Am J Respir Crit Care Med.** 161: 860-865. 2000.

77. Kerem E. Pharmacologic therapy for stop mutations: how much CFTR activity is enough? **Curr Opin Pulm Med.** 10: 547-552. 2004.
78. Su X, Li Q, Shrestha K, Cormet-Boyaka E, Chen L, Smith PR. Interregulation of Proton-gated Na<sup>+</sup> Channel 3 and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. **J Biol Chem.** 281: 36960-36968. 2006.
79. Rodgers HC, Knox AJ. The effect of topical benzamil and amiloride on nasal potential difference in cystic fibrosis. **Eur Respir J.** 14: 693-696. 1999.
80. Hirsh AJ, Sabater JR, Zamurs A, Smith RT, Paradiso AM, Hopkins S. Evaluation of second generation amiloride analogs as therapy for cystic fibrosis lung disease. **J Pharmacol Exp Ther.** 11: 929-938. 2004.
81. Peckham P, V. **Oxford textbook of oncology.** Oxford: oxford university press. 1995; 2: 20-28.
82. Baudouin-Legros M, Brouillard F, Tondelier D, Hinzpeter A, Edelman A. Effect of ouabain on CFTR gene expression in human Calu-3 cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** 284: 620-626. 2003.
83. Ghosal S, Taylor CJ, Colledge WH, Ratcliff R, Evans MJ. Sodium channel blockers and uridine triphosphate: effects on nasal potential difference in cystic fibrosis mice. **Eur Respir J.** 15: 146-150. 2000.
84. Bennett C L, Banday A J, Górski KM, Hinshaw G, Jackson P, Keegstra P. Cosmic temperature fluctuations from two years of COBE differential microwave radiometers observations. **Astrophysical J.** 464: L1. 1996.
85. Pollard HB, Eidelman, O, Jacobson KA, Srivastava M. Pharmacogenomics of cystic fibrosis. **Mol Interv.** 1: 54-63. 2001.
86. Flotte TR. Adeno – associated virus - based gene therapy for inherited disorders. **Pediatr Res.** 58: 1143-1147. 2005.
87. Rosenecker J, Huth S, Rudolph C. Gene therapy for cystic fibrosis lung disease: current status and future perspectives. **Curr Opin Mol Ther.** 8: 439-445. 2006.