



TRABAJO FIN DE GRADO

# **BASES MOLECULARES DE LA FIBROSIS QUÍSTICA**

Julián Martín Rivas

FACULTAD DE BIOLOGÍA

GRADO EN BIOQUÍMICA

Tutor: Sergio López Martín

Departamento: Biología Celular

# ÍNDICE

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	1
2.1 Definición .....	1
2.2 Antecedentes .....	2
2.3 Epidemiología de la enfermedad .....	2
2.4 Objetivo .....	3
<b>3. Implicación funcional del CFTR</b> .....	3
3.1 Gen CFTR: estructura y regulación transcripcional .....	3
3.2 Estructura del canal y proceso de biosíntesis.....	3
3.3 Activación y apertura del canal.....	6
3.4 Localización del CFTR y funciones principales.....	7
3.4.1 Función del CFTR en las vías respiratorias .....	8
3.4.2 Función del CFTR en las glándulas sudoríparas.....	9
3.4.3 Función del CFTR en el páncreas .....	11
3.4.4 Otros órganos donde se expresa el CFTR .....	13
3.5 Funciones del CFTR más allá del transporte de iones.....	13
<b>4. Fisiopatología</b> .....	14
4.1 Mutaciones causantes de la enfermedad.....	14
4.1.1 Características del Phe508del.....	16
4.2 Manifestaciones clínicas y órganos afectados .....	17
4.2.1 Afectación en la fisiología del tracto respiratorio .....	18
4.2.2 Afectación en la fisiología del páncreas.....	20
4.2.3 Afectación en la fisiología de la glándula sudorípara .....	21
4.2.4 Afectación en otros órganos y tejidos .....	21
4.3 Genes que modifican el fenotipo .....	22
<b>5. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad</b> .....	23
5.1 Cribado neonatal y diagnóstico de la enfermedad .....	23
5.2 Seguimiento de la enfermedad.....	24
<b>6. Tratamiento</b> .....	25
6.1 Antibióticos y principales medicamentos recetados .....	25
6.2 Terapia génica .....	25
6.3 Moduladores del CFTR .....	26
6.4. Trasplante de pulmón.....	26
<b>7. Conclusiones y perspectivas futuras</b> .....	27
<b>8. Bibliografía</b> .....	28

## **1. RESUMEN**

La fibrosis quística (FQ) se trata de una enfermedad causada por mutaciones en el gen que codifica para el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que afecta a 1/4500 nacidos. Estas mutaciones provocan una alteración en el transporte de iones  $\text{Cl}^-$  y bicarbonato desde la membrana apical hacia la luz de las vías respiratorias, glándulas sudoríparas, aparato digestivo y conductos del aparato reproductor entre otros. La afectación en el aparato respiratorio es causante de la mayoría de las muertes por FQ, debido a que no se lleva a cabo correctamente la expulsión del moco, lo que provoca infecciones reincidentes y una consecuente inflamación que acaba comprometiendo la función pulmonar. En este trabajo se examinan las alteraciones moleculares debido a las mutaciones y como el conocimiento de estas ha posibilitado el desarrollo de técnicas de diagnóstico y tratamientos cada vez más efectivos que han provocado que la esperanza de vida haya aumentado considerablemente en las últimas décadas.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 Definición**

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad monogénica autosómica que presenta un patrón de herencia recesivo y que afecta especialmente al tejido pulmonar, aunque también se encuentran afectados otros órganos como el páncreas, el aparato digestivo o el hígado. Está causada por mutaciones en el gen que codifica para una proteína conocida como regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y se caracteriza por ser degenerativa y de carácter crónico <sup>1</sup>. El CFTR se sitúa en la membrana apical del tejido epitelial de distintos órganos ejerciendo un papel fundamental en la homeostasis de las sales y los fluidos corporales. En concreto, se encarga del transporte de aniones cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) y en menor medida de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) hacia la luz del epitelio además de repercutir en la reabsorción de sodio. Los niveles de éstos tendrán como finalidad mantener la hidratación de la superficie epitelial lo cual es imprescindible para el correcto funcionamiento del epitelio y evitar infecciones de las vías respiratorias. Ésto último es la complicación más relevante a la que se enfrentan las personas que padecen FQ <sup>2</sup>.

## **2.2 Antecedentes**

Existe un consenso generalizado acerca de que la mutación más común desencadenante de la FQ (Phe508del) surgió en el noroeste de Europa y se fue propagando hacia el sureste en distintas migraciones <sup>3</sup>. Sin embargo, aún no se ha logrado determinar con exactitud el momento preciso en que dicha mutación se originó. Si bien tradicionalmente se había afirmado que esta mutación se originó hace 52.000 años en base a un estudio realizado en el año 1994 en el que se realiza un análisis de haplotipo de 3 microsatélites <sup>4</sup>; estudios posteriores en los que se realiza un análisis genético y estadístico de familias con la mutación sugieren que la mutación apareció hace unos 3.000 años <sup>3</sup>.

Una de las primeras referencias a la FQ en la historia recae en un dicho irlandés del siglo XV que dice: “Ay de aquel niño que al ser besado en la frente sabe salado. Él está embrujado y pronto morirá” <sup>5</sup>. Este dicho pone de manifiesto la realidad de que, durante muchos años, la causa de la enfermedad se atribuía al supuesto “mal de ojo”. Fue necesario que pasaran unos 500 años hasta que se relacionaron estos síntomas con una enfermedad que se describió como “fibrosis quística del páncreas”. Dorothy Andersen fue la autora de esta definición describiendo por primera vez la afección como una entidad clínica separada observando que los pacientes que la padecían también presentaban problemas respiratorios <sup>6</sup>. En 1989 se identificó y clonó en gen responsable de la FQ siendo un evento clave, ya que permitió un mayor conocimiento sobre la enfermedad que repercutió en el desarrollo de terapias y técnicas de diagnóstico <sup>7</sup>.

## **2.3 Epidemiología de la enfermedad**

La incidencia de la FQ, a nivel mundial, varía entono a 1/3000 y 1/6000 nacimientos. Con estos datos puede ser considerada como enfermedad rara, aunque no presenta una incidencia homogénea, ya que es predominante en poblaciones europeas <sup>8</sup>. Una de las hipótesis para explicar la elevada incidencia en esta población hace referencia al hecho de que ser heterocigotos supone una ventaja hacia ciertas enfermedades epidémicas como el cólera, la tuberculosis o la peste. Esto explicaría por qué la frecuencia de portadores se eleva hasta valores de 1/25 en Europa <sup>9</sup>.

Los avances médicos y en el conocimiento de la patología han modificado el paradigma que consideraba la FQ como una enfermedad predominante en niños habiendo, actualmente, un mayor número de adultos con la enfermedad debido a que antes los niños

fallecían y no llegaban a la etapa adulta. Por lo tanto, el objetivo actual se centra en el cuidado y mejora de la calidad de vida de estos adultos. Gracias a mejoras en el diagnóstico precoz, tratamientos más efectivos y una investigación continua, la esperanza de vida ha aumentado llegando a establecerse en torno a los 40 años a nivel mundial <sup>1</sup>. La prevalencia en España se sitúa en 1 por cada 5000 nacidos y se ha observado que la media de la edad a la que fallecen los pacientes ha aumentado, significativamente, en las últimas décadas correspondiendo a 41 años. De hecho, según el informe de 2019 del Registro Español de Fibrosis Quística, elaborado por la Sociedad Española de Fibrosis Quística, el número total de pacientes en España es de 2460 de los cuales un 54% son adultos <sup>10</sup>. Además, existen diferencias dentro del territorio nacional, ya que hay ciertas localidades como Cádiz, Sevilla, Málaga o Santa Cruz de Tenerife en las que el riesgo de muerte aumenta, aunque no ha llegado a establecerse una causa concreta de este hecho <sup>11</sup>.

## **2.4 Objetivo**

Conocer las bases moleculares y la causa subyacente de la FQ es crucial para el desarrollo de tratamientos más efectivos que puedan abordar directamente la causa de la enfermedad, la prevención y el asesoramiento genético. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo reside en realizar una revisión sobre el conocimiento actual del funcionamiento fisiológico y patológico del CFTR e inspeccionar los avances que se han conseguido en relación con su diagnóstico y tratamiento.

## **3. IMPLICACIÓN FUNCIONAL DEL CFTR**

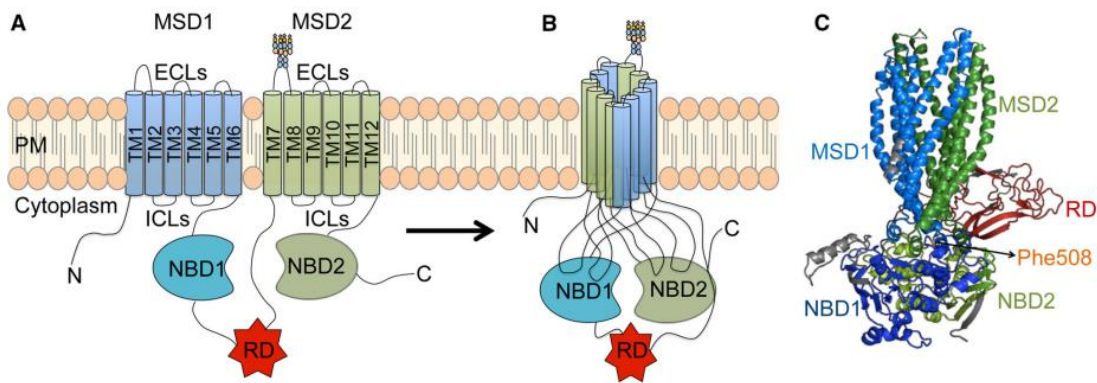
### **3.1 Gen CFTR: estructura y regulación transcripcional**

El gen CFTR se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 y se compone de 27 exones. El promotor presenta un elemento de respuesta a AMPc (CRE) que hace que aumente la expresión del gen en respuestas a incrementos en la concentración de AMPc. La expresión es específica de ciertos tejidos encontrándose, sobre todo, en pulmón, páncreas, glándulas sudoríparas, intestino, hígado, mucosa nasal, glándulas salivales, tracto respiratorio y reproductor <sup>12</sup>.

### **3.2 Estructura del canal y proceso de biosíntesis**

El CFTR es una glicoproteína multidominio perteneciente a la superfamilia de proteínas transportadores dependientes de ATP (ABC) formada por 1480 aminoácidos y un peso

molecular de aproximadamente 170 kDa. Presenta la estructura típica de las proteínas ABC: dos dominios transmembrana (MSD1 y MSD2) cada uno a su vez formado por 6 alfa hélices, dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) citoplasmáticos que se encuentran unidos cada uno a un dominio transmembrana. Además, posee una región intrínsecamente desordenada, el dominio regulador (RD), localizado entre el NBD1 y el MSD2 que lo diferencia del resto de proteínas ABC y que debe ser fosforilado para permitir la apertura del canal (**Figura 1**). El canal se encuentra anclado a la membrana citoplasmática por los dos dominios MSD que la atraviesan y junto con 4 loops (2 por cada MSD) citoplasmáticos (ICL) delimitan el poro del canal y confiriéndole la especificidad iónica <sup>12,13</sup>.



**Figura 1. Representación esquemática de la estructura del canal.** Se reflejan 5 dominios de los que está formado el CFTR quedando señaladas las glucosilaciones que presentan en los bucles extracelulares (ECL) (A), la organización estructural de los mismos en la membrana plasmática (B) y la estructura de dichos dominios destacando la posición concreta del NBD1 donde tiene lugar la mutación más común (Phe508) (C). Fuente: Tomado del trabajo de Farinha y Canato <sup>14</sup>.

El proceso de síntesis comienza con la traslocación del polipéptido en formación hacia el retículo endoplasmático (ER) y va plegándose dominio a dominio. Los primeros en sintetizarse y plegarse son los dominios MSD1 y NBD1 que interaccionan con distintas chaperonas que los estabilizan mientras se va formando el dominio regulador formando parte estos tres de la porción N-terminal del canal. Los dominios individuales del CFTR son capaces de adoptar una estructura muy similar a la que presenta la proteína final de manera independiente. Conforme se van sintetizando se insertan en la membrana del ER produciéndose el plegamiento correcto. Sin embargo, requieren de un mecanismo post-traducciona en el que se producen interacciones entre los distintos dominios, siendo este proceso también mediado por chaperonas, consiguiendo así la estructura funcional definitiva <sup>12,14</sup>.

La maquinaria de control de calidad del ER se asegura de que se produzca un correcto plegamiento de la proteína y que aquellas que no lo consiguen sean degradadas por la vía

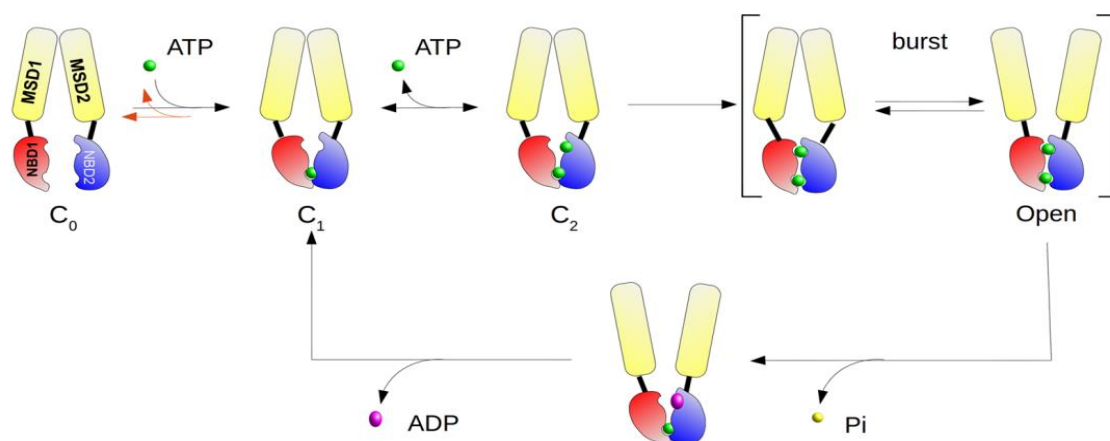
del proteosoma. Dentro de los distintos puntos de control se pueden destacar las chaperonas y co-chaperonas citosólicas como Hsp70 y 90 que se encargan de estabilizar proteínas con un plegamiento parcial y la calnexina, una chaperona tipo lectina, que participa en el correcto plegamiento de las proteínas dentro del ER, requiriendo de glicosilaciones concretas para su funcionamiento. Las que adquieren una conformación inadecuada son sometidas a un proceso de degradación mediado por el proteosoma <sup>14</sup>.

El CFTR funcional, habiendo pasado por todos los puntos de control de calidad, es introducido en la vía secretora de proteínas de membrana. En el NBD1 reside la señal de exportación hacia el complejo de Golgi que consta de dos residuos aminoacídicos de carácter ácido que interaccionan con el complejo proteico COPII para facilitar el transporte vesicular anterógrado desde el ER hacia el Golgi. En este van ocurriendo las distintas modificaciones, como la glicosilación, a través de los compartimentos cis, medio y trans. Por último, para llegar a la membrana plasmática el péptido DTRL del extremo C-terminal interacciona con dominios PDZ de diferentes proteínas que ayudan a que se transporte el canal exclusivamente en la cara apical de la célula epitelial <sup>12</sup>.

Una vez en la membrana plasmática, los niveles de CFTR dependerán del equilibrio que se dé entre el flujo vesicular del transporte anterógrado, y el proceso de reciclaje <sup>15</sup>. En cuanto al proceso de reciclado, primero se debe dar una endocitosis mediada por clatrina gracias a la interacción de dominios de la cola C-terminal del canal con el complejo adaptador AP2. Las proteínas NHERF (intercambiador iónico Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>) y CAL (ligando asociado del CFTR) compiten por la unión al CFTR presentando funciones opuestas: la primera favorece la vuelta a la membrana plasmática del CFTR mientras que la segunda promueve la degradación lisosomal del mismo. Sin embargo, la afinidad de la unión de NHERF es mucho mayor lo cual explicaría la eficacia del proceso de reciclaje <sup>12</sup>.

### 3.3 Activación y apertura del canal

Para que se active el CFTR se deben fosforilar ciertos residuos del dominio RD que están ampliamente conservados en mamíferos gracias a la actividad de la proteína kinasa A (PKA) dependiente de AMPc. El aumento de AMPc es producido por la activación de la adenilato ciclasa por diferentes estímulos como el glucagón, la epinefrina o diferentes agonistas beta-adrenérgicos como la acetilcolina o la adenosina. Una vez fosforilado, la apertura del canal está promovida por la unión del ATP a los dominios NBD <sup>13</sup>. En un estado inactivo, el RD no se encuentra fosforilado y tiene un papel inhibitorio al evitar la dimerización de los dominios NBD1 y NBD2 y por tanto la apertura del canal <sup>16</sup>. Una vez se fosforila el RD se permite la unión de ATP a los dos dominios NBD1 y NBD2 provocando que estos formen un dímero y que generen un cambio conformacional que se transmite hacia los dominios MSD1 y MSD2, abriéndose el canal. El ATP que se une al dominio NBD1 permanece unido durante varios ciclos de apertura y cierre siendo el ATP del NBD2 el que se hidroliza debido a la actividad enzimática del mismo. Una vez hidrolizado, la salida del fósforo inorgánico provoca el cierre del canal con la sucesiva liberación del ADP quedando listo para la unión de un nuevo ATP y comienzo del siguiente ciclo de apertura (**Figura 2**) <sup>13</sup>. Estudios recientes sugieren que la dimerización de los dominios NBD1 y NBD2 y la permeabilidad iónica no se encuentran del todo acoplados, si no que éstos están relacionados a través de mecanismos alostéricos, aunque aún se desconoce el mecanismo concreto <sup>17</sup>.



**Figura 2.** Representación del ciclo de apertura y cierre del canal CFTR. El ciclo de apertura conlleva la unión de ATP a los dominios NBD1 y NBD2 provocando su dimerización que provoca un cambio conformacional en los dominios MSD1 y MSD2 haciendo que se abra el canal. Fuente: Tomado del trabajo de Moran <sup>13</sup>.



### 3.4 Localización del CFTR y funciones principales

Para comprender el funcionamiento del canal en el transporte de iones, es fundamental tener en cuenta su ubicación en la célula epitelial: la membrana apical. La polaridad es una característica esencial del tejido epitelial, que se manifiesta en la clara distinción entre dos regiones, la membrana apical que está en contacto con el medio externo y la membrana basolateral que da hacia el intersticio celular <sup>18</sup>.

Esta polaridad se ve mantenida por los complejos de unión (ocluyentes y adherentes) que se dan entre las células epiteliales adyacentes y que permiten que haya una distribución no homogénea de las proteínas de membrana <sup>2</sup>. El concepto de complejo de unión hace referencia a la aparición de distintos tipos de uniones a lo largo del epitelio en un orden sistemático. En la parte más cercana al lado apical aparecen las uniones estrechas u ocluyentes que rodean todo el perímetro celular. Por debajo de las uniones ocluyentes se localizan las uniones adherentes de cadherinas que dan una unión firme que rodea toda la célula y, por último, más cercano al lado basolateral, se encuentran los desmosomas que ofrecen una unión firme y puntual <sup>2,19</sup>. Además, los complejos de unión permiten el movimiento direccional de iones y fluidos debido a los procesos de absorción y secreción regidos por la localización diferencial de distintas proteínas de canal <sup>18</sup>.

En la membrana basolateral se encuentra la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  que transporta activamente  $\text{Na}^+$  fuera de la célula provocando un gradiente electroquímico que permite el cotransporte de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través del transportador NKCC1 también presente en la membrana basolateral. Las concentraciones de  $\text{Cl}^-$  intracelular aumentan y éste es secretado a través del CFTR mediante transporte activo primario y otros canales específicos según el tejido. En la membrana apical también se encuentra el canal de sodio epitelial (ENaC) que se encarga de la absorción de Na mediante difusión facilitada. Éste genera, junto con el transporte de la ATPasa, una fuerza electroquímica que impulsa el transporte pasivo de  $\text{Cl}^-$  a través de la vía paracelular. En cuando al movimiento del agua, está gobernado por la fuerza osmótica que se genera al acumularse los distintos iones y puede darse tanto por la vía transcelular como a través de acuaporinas. Es importante resaltar que el CFTR ejerce una regulación a la baja en la actividad del ENaC limitando su función reabsorbiendo  $\text{Na}^+$  <sup>2</sup>. También se ha observado que influye sobre otros canales como el intercambiador  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  (que pertenece a la familia de transportadores de solutos o SLC) o los canales de cloruro activados por calcio (CaCC) <sup>20</sup>.

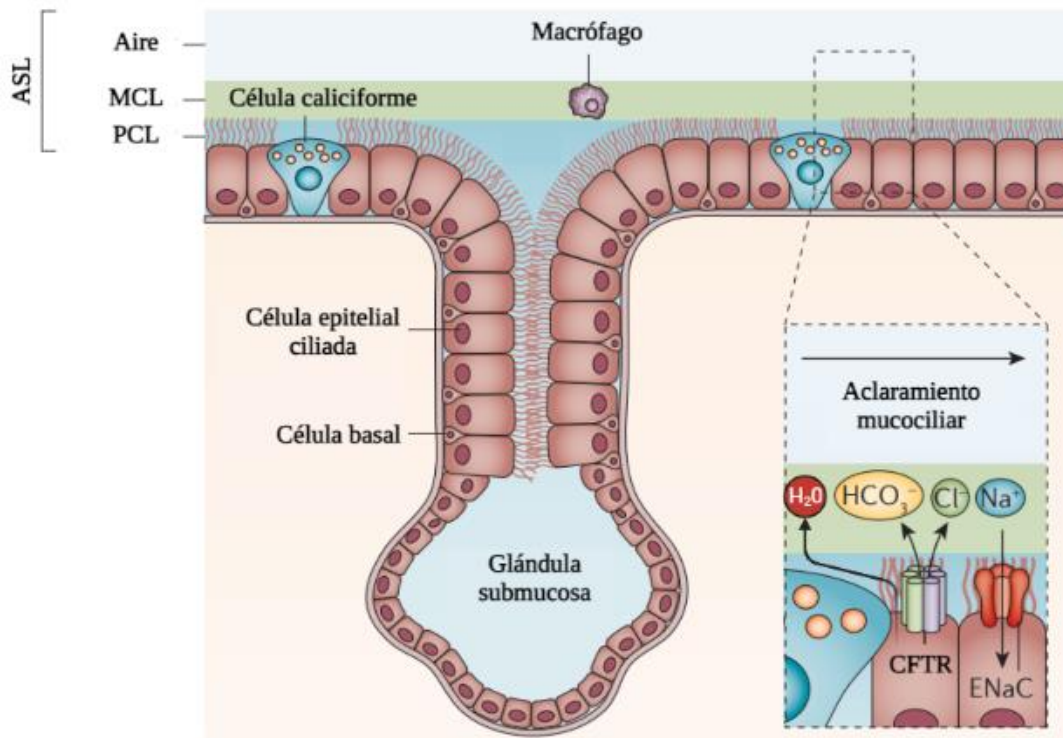
El poro del CFTR presenta una alta selectividad hacia el transporte de aniones habiéndose optimizado evolutivamente para tener una máxima conductancia hacia el anión más relevante desde el punto de vista fisiológico: el  $\text{Cl}^-$  <sup>21</sup>. La secreción de  $\text{Cl}^-$  ocurre en dos pasos: acumulación activa de  $\text{Cl}^-$  en el interior celular por los transportadores ya comentados y el transporte propiamente dicho a través del CFTR. La conductancia total hacia el  $\text{Cl}^-$  dependerá de la probabilidad de apertura que a su vez depende del estado de fosforilación, la densidad de canales en la membrana apical y la conductancia individual de cada canal en función al gradiente electroquímico <sup>2</sup>. Sin embargo, como se comentará más adelante, este canal también lleva a cabo el transporte de otras moléculas como el bicarbonato o glutatión, aunque con una permeabilidad 5 veces menor comparada con la del  $\text{Cl}^-$  <sup>22</sup>.

### **3.4.1 Función del CFTR en las vías respiratorias**

El aparato respiratorio está formado por las vías de conducción donde se lleva a cabo el filtrado, calentamiento y conducción del aire hacia las vías respiratorias en las que ocurre el intercambio gaseoso. Estas vías están revestidas principalmente por un epitelio pseudoestratificado formado en su mayoría por células ciliadas (expresando alrededor de 300 cilios por célula), células caliciformes secretoras de mucina y células basales que son las que se irán diferenciando a células secretoras y ciliadas <sup>2,23</sup>. Las mucinas que forman el moco, donde también se pueden encontrar proteínas antimicrobianas, agua y electrolitos, son secretadas tanto por las glándulas submucosas (sobre todo la mucina MUC5B) y por las células caliciformes (sobre todo la mucina MUC5AC) presentes en el epitelio de la mucosa <sup>24</sup>.

Un elemento imprescindible para que se lleve a cabo la limpieza del aire y eliminación de patógenos es la capa de líquido superficial de las vías respiratorias (ASL) que recubre a las células epiteliales. Se trata de una capa de unos 10  $\mu\text{m}$  que está formada a su vez por dos capas: una capa de líquido periciliar (PCL) más interna que está en contacto directo con las células epiteliales y que baña los cilios y una capa de moco (MCL) sobre los cilios. El PCL está compuesto fundamentalmente de agua mientras que la MCL por una mezcla de polipéptidos y restos celulares que se encuentran unido a la superficie del PCL por los complejos de las mucinas MUC5AC y MUC5B <sup>23</sup>. Aunque en las vías respiratorias altas la mayoría del ASL se forma gracias a la secreción de las glándulas submucosas, el epitelio lleva a cabo un papel fundamental en la regulación de su volumen y composición.

Esto lo hace a través del control en el flujo de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  mediante el CFTR y el ENaC respectivamente, ya que determinarán el movimiento de agua por ósmosis y por tanto la composición del ASL <sup>2</sup> (**Figura 3**). El término "aclaramiento mucociliar" hace referencia al proceso de transporte unidireccional y coordinado de la capa de moco a lo largo de las vías respiratorias mediante el batido sincrónico de los cilios. Este mecanismo impulsa la cubierta mucosa desde las regiones inferiores hacia las superiores de las vías respiratorias, facilitando así su eliminación <sup>24</sup>.



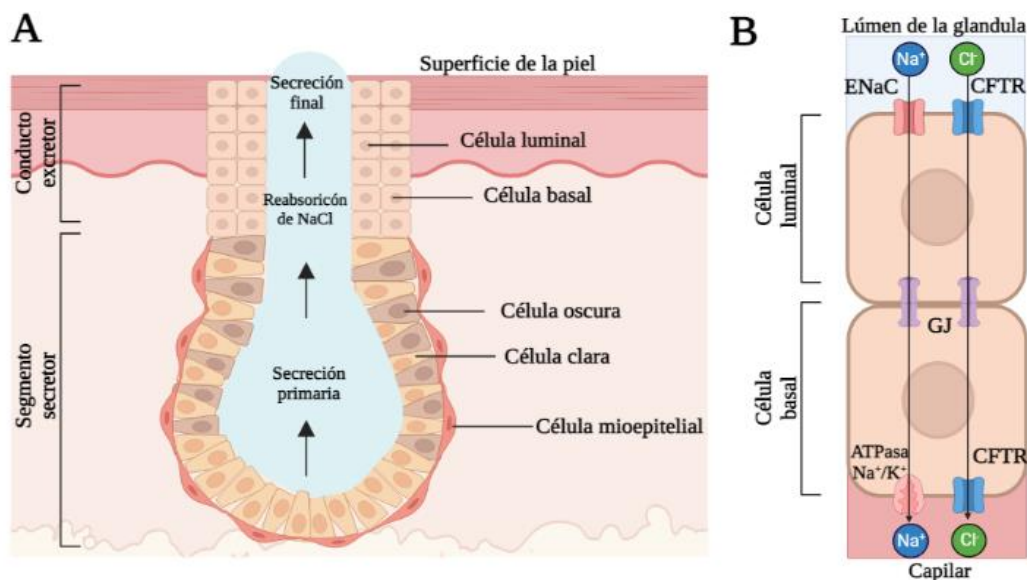
**Figura 3. Elementos involucrados en el correcto aclaramiento mucociliar.** La capa de líquido superficial de las vías respiratorias (ASL) está formada a su vez por dos capas: la capa de líquido periciliar (PCL) y la capa de moco (MCL). Para que se lleva a cabo un correcto aclaramiento mucociliar la ASL debe estar correctamente hidratada. El transporte de iones a través del CFTR y el transportador de sodio epitelial (ENaC) presentes en la membrana apical de células epiteliales ciliadas, determinará el flujo de agua por ósmosis y por tanto el nivel de hidratación de la ASL. Fuente: Adaptado del trabajo de Ratjen y Bell <sup>38</sup>.

### 3.4.2 Función del CFTR en las glándulas sudoríparas

Las glándulas sudoríparas ecrinas son un tipo de glándula tubular simple enrollada y es la que se encuentra en mayor cantidad en el organismo siendo responsable de la mayor parte del volumen de excreción de sudor. Se encuentran sobre todo en la frente, en la palma de las manos y en la planta de los pies habiendo un total de 2-4 millones de glándulas en todo el cuerpo <sup>25</sup>. Se encargan de mantener la temperatura corporal mediante la producción de sudor en respuesta un aumento en la temperatura del ambiente, situaciones emocionales o por el ejercicio. Este sudor se secreta a la superficie de la piel

donde se evaporará debido a la absorción de calor del cuerpo disipando por tanto el exceso de calor que se había producido en el organismo reduciendo así la temperatura. El sudor se compone básicamente de agua, electrolitos ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  fundamentalmente) y ciertos péptidos antimicrobianos como la lactoferrina o la dermicidina, siendo esta última específica de la piel, que colaboran en la función de la piel como barrera frente a los patógenos <sup>2</sup>.

La glándula se diferencia histológica y funcionalmente en dos partes: el segmento secretor y el conducto excretor. El primero se trata de una estructura tubular enrollada ubicada en la parte profunda de la dermis y es donde se produce la secreción primaria isotónica. Se pueden encontrar tres tipos celulares distintos: las células claras que son las que producen la secreción primaria como tal, las células oscuras con una función poco conocida, aunque podrían estar relacionada con la regulación de las anteriores, y células mioepiteliales que se encargan de dar soporte estructural y contraerse para que se dé la secreción del sudor. En cuanto al conducto excretor, se encarga de reabsorber  $\text{NaCl}$  produciendo la secreción final con carácter hipotónico y de conducirla hacia la superficie de la piel. Histológicamente se trata de un epitelio estratificado cúbico formado por una capa celular basal y una luminal que se encuentran conectadas mediante uniones tipo gap formando un sincitio funcional <sup>2,25</sup>(Figura 4A).



**Figura 4. Formación del sudor en la glándula sudorípara.** A) La glándula sudorípara se diferencia en dos partes: el segmento secretor donde las células claras forman la secreción primaria principalmente, y el conducto excretor formado por dos capas de células donde se reabsorbe  $\text{NaCl}$  para formar la secreción final. B) En la membrana apical de las células luminales del conducto excretor, el CFTR y el transportador de sodio epitelial (ENaC) se encargan de la reabsorción de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  que pasan a las células basales mediante las uniones tipo Gap (GJ). En las células basales, gracias al CFTR y la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  presentes en la membrana basal, los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  pasan al torrente sanguíneo. Fuente: Adaptado del trabajo de Baker, Saint-Criq y Gray <sup>2,25</sup>.

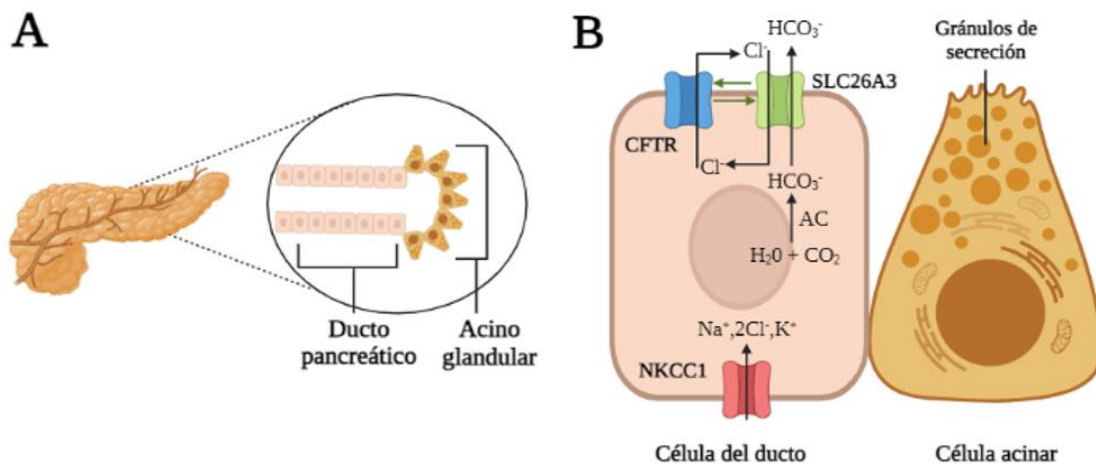
La secreción del sudor se ve favorecida fundamentalmente por regulación colinérgica (por unión de acetilcolina a los receptores muscarínicos) y en menor medida por regulación  $\beta$ -adrenérgica. La mayor parte de la secreción de NaCl ocurre por una vía independiente de CFTR en la que está involucrado el transportador NKCC1 que eleva las concentraciones iónicas citoplasmáticas. El  $\text{Cl}^-$  se transportará al lumen a través de canales de  $\text{Cl}^-$  que crea el gradiente electroquímico para el movimiento de  $\text{Na}^+$  paracelular. Este movimiento de iones crea un gradiente osmótico para el movimiento de agua hacia el lumen a través de acuaporinas. Para comprender cómo se da la reabsorción de sales en el conducto excretor para formar la secreción hipotónica hay que tener en cuenta que ocurren varias excepciones en cuanto a la localización y funcionamiento del CFTR. El canal se encuentra presente tanto en la membrana apical como en la membrana basal de las células que forman el conducto excretor y se encuentra constitutivamente activo por la vía PKA. En la membrana apical también está presente el ENaC pero en este caso el CFTR no lleva a cabo una regulación negativa sobre el mismo, sino que lo estimula para que se dé la reabsorción pasiva conjunta de NaCl a través de ambos canales. Los iones una vez reabsorbidos pasan de la capa celular basal a la luminal (presentan uniones GAP y se comportan como un sincitio) y de esta al torrente sanguíneo por un transporte activo por la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , en el caso del  $\text{Na}^+$ , y por transporte pasivo a través del CFTR para el  $\text{Cl}^-$  <sup>26</sup> (**Figura 4B**). El porqué de esta diferencia en la localización y funcionamiento del CFTR no está claro, aunque probablemente se deba a interacciones específicas de tejido.

### 3.4.3 Función del CFTR en el páncreas

El páncreas es una glándula mixta que presenta una porción endocrina constituida por los islotes de Langerhans productores de hormonas y una porción exocrina que será en la que nos centraremos. Está formado por las células acinares que son las encargadas de verter la secreción de enzimas digestivas a los ductos pancreáticos (**Figura 5A**). Estos irán formando conductos de mayor calibre hasta llegar al conducto pancreático común que desemboca la secreción enzimática en el duodeno (primera porción del intestino delgado) para llevar a cabo su función digestiva <sup>2</sup>.

La coletistoquinina es una hormona producida por las células intestinales y que regula a las células acinares del páncreas. Provoca un aumento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que desencadenará la síntesis y liberación de las enzimas digestivas entre las que encontramos nucleasas, lipasas, amilasas y proteasas. Por otro lado, la secretina

estimula a los ductos pancreáticos mediante una cascada de señalización que implica aumentos en las concentraciones de AMPc para que secreten bicarbonato <sup>27</sup>. El bicarbonato es secretado por un transportador del tipo SLC (SLC26A6 mayoritariamente) que transporta 2 moléculas de bicarbonato fuera de la célula por cada Cl<sup>-</sup> hacia el interior celular. En este caso, el CFTR permite que el transportador SLC transporte los iones, ya que se encarga de transportar hacia el lumen el Cl<sup>-</sup> acumulado gracias al transporte por el NKCC1 de la membrana basolateral. Además, se ha observado que el dominio RD fosforilado del canal ejerce una regulación positiva hacia el SLC26A por interacción física. Se trata de una activación bidireccional, ya que además de regular el CFTR al SLC26A la regulación también ocurre en sentido contrario provocando un aumento en la probabilidad de apertura del CFTR (**Figura 5B**). En las porciones distales del conducto pancreático donde las concentraciones de Cl<sup>-</sup> decaen, la permeabilidad del CFTR cambia a favor del bicarbonato por un mecanismo en el que se cree que está involucrada una proteína quinasa deficiente en lisina (WNK) llegando así a alcanzar concentraciones de 140 mM de bicarbonato <sup>28,29</sup>.



**Figura 5. Función exocrina del páncreas.** A) El páncreas, como glándula exocrina, está formado por los acinos glandulares donde se produce la secreción que se vierte al ducto pancreático. B) En la parte apical de la célula acinar se acumulan los gránulos de secreción hasta que bajo regulación hormonal se secretan. En la célula del ducto, el transportador SLC26A3 de la membrana apical se encarga de transportar bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) hacia el lumen y Cl<sup>-</sup> al interior celular. El CFTR mantiene las concentraciones de Cl<sup>-</sup> extracelulares mediante el transporte de este. El Cl<sup>-</sup> intracelular se ve mantenido por el transportador NKCC1 de la membrana basolateral que realiza un simporte de Na<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> y K<sup>+</sup>. Con las flechas verdes se representa la regulación positiva que ejerce el CFTR sobre el SLC26A3 y viceversa Fuente Adaptado del trabajo de Saint-Criq y Gray <sup>2</sup>.

Es fundamental alcanzar estas concentraciones de bicarbonato para lograr una secreción final de carácter básico. Esto es necesario por dos razones. En primer lugar, se requiere neutralizar los protones secretados por los acinos pancreáticos, ya que cuando las vesículas con las enzimas pancreáticas son liberadas, también se secretan protones. En segundo lugar, el contenido que llega al duodeno proviene del estómago, el cual es ácido, y las enzimas pancreáticas requieren un pH neutro para activarse <sup>30</sup>.

#### **3.4.4 Otros órganos donde se expresa el CFTR**

El CFTR también se expresará en las células epiteliales de otros tejidos como en el intestino delgado y grueso, la vesícula biliar, los conductos biliares y el epitelio que reviste los conductos del aparato reproductor masculino y femenino. Su función en estos tejidos es mantener una correcta hidratación que permita el funcionamiento fisiológico de los mismos, ya que la alteración del canal provocará cambios que se comentarán más adelante <sup>1</sup>.

#### **3.5 Funciones del CFTR más allá del transporte de iones**

Además del transporte de Cl<sup>-</sup> y bicarbonato, hay indicios de que el CFTR también realiza el transporte de glutatión, un antioxidante que es capaz de reducir el peróxido de hidrógeno, así como de tiocianato, que también posee propiedades antioxidantes frente al peróxido de hidrógeno y el hipoclorito. Unos niveles adecuados de ambas moléculas en el ASL permiten evitar el daño por una elevada producción de especies oxidativas que se forman como respuesta a la infección o daño del epitelio <sup>22</sup>.

Hay evidencia suficiente de que el CFTR no se expresa solamente en las células epiteliales, sino que también se encuentra presente en células del sistema inmune como los neutrófilos y los macrófagos. Su función es regular los receptores involucrados en el reconocimiento de estímulos microbianos y contribuir a la acidificación de los fagolisosomas permitiendo así que se dé una respuesta inmune eficaz <sup>22,31</sup>.

Se ha demostrado que el CFTR desde su posición en la membrana apical interacciona con el citoesqueleto de actina a través de proteínas adaptadoras como NHERF1, con proteínas que forman los desmosomas y con componentes de la matriz extracelular. Este papel es esencial para el establecimiento de la polaridad apical-basolateral y que por tanto pueda llevar a cabo su función como barrera epitelial. En la FQ se observa una desorganización del citoesqueleto de actina además de un aumento en la permeabilidad

celular por alteración de las uniones estrechas. Sin embargo, no está claro si el CFTR modula la organización del citoesqueleto y las uniones o si son estos los encargados de regular el CFTR. Probablemente se trate de una interacción entre ambos procesos <sup>32</sup>.

## 4. FISIOPATOLOGÍA

### 4.1 Mutaciones causantes de la enfermedad

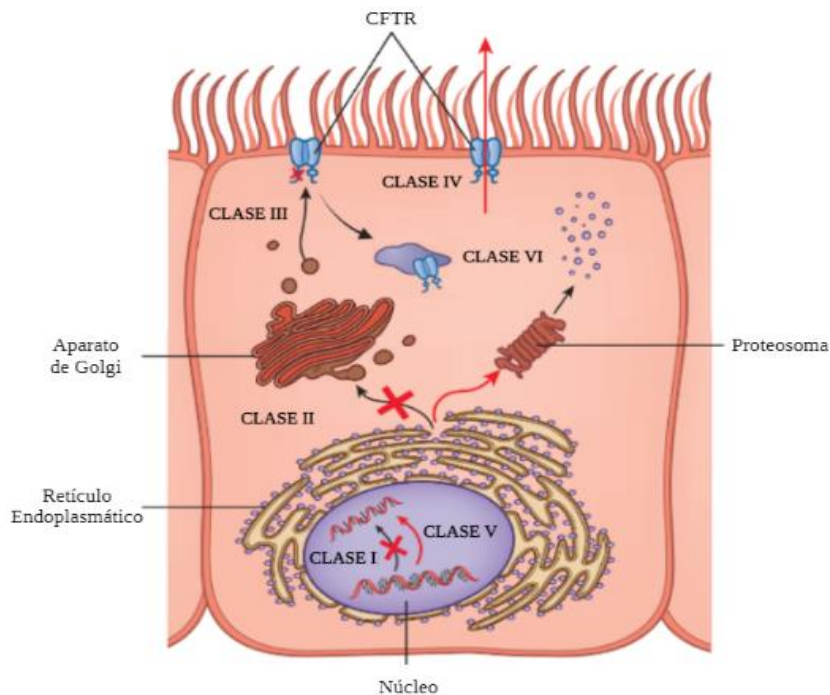
Las mutaciones en el CFTR pueden ocurrir tanto en las regiones codificantes, en los intrones o en el promotor. Actualmente el número de alteraciones en la secuencia genética que hay determinadas asciende hasta 2074 aunque no todas se relacionan con el desarrollo de FQ <sup>33</sup>. La clasificación clásica de las distintas mutaciones que generan FQ las categoriza en seis grupos en función del defecto que provoquen en el funcionamiento del canal. Se pueden diferenciar las siguientes clases de mutaciones <sup>34</sup> (**Figura 6**):

- Mutaciones de clase I: Afectan a la síntesis de la proteína. Se incluyen mutaciones sin sentido que generan un codón de parada prematuro produciendo un mRNA de un tamaño menor. También se puede deber a mutaciones que afectan a la zona de empalme de exones provocando un splicing defectuoso. Esto provoca una disminución acentuada o directamente una ausencia completa de CFTR en la membrana plasmática.
- Mutaciones de clase II: Causan defectos en el plegamiento de la proteína. La proteína queda retenida en el ER produciéndose una degradación prematura sin llegar a darse el tráfico celular hacia la membrana. Dentro de esta clase encontramos la mutación predominante a nivel global (Phe508del) y que está presente en el 85% de las personas con FQ.
- Mutaciones de clase III: Se producen defectos en la regulación de la apertura del canal observándose una disminución en la probabilidad de apertura. En este caso, sí que se producen proteínas que maduran completamente y que llegan a la membrana, pero con un funcionamiento alterado.
- Mutaciones de clase IV: Se caracterizan por una disminución en la conductancia. El flujo de Cl<sup>-</sup> y bicarbonato se encuentra significativamente reducido. Se debe a mutaciones que afectan al poro del canal concretamente.



- Mutaciones de clase V: En este caso la proteína presenta características normales pero la cantidad que hay es mucho menor. Se engloban en esta clase algunas mutaciones que afectan al promotor o que generan un splicing anormal.

-Mutaciones de clase VI: Se genera una inestabilidad en la proteína debido a una reducción en el tiempo que dura en la membrana, ya que se ve potenciado el proceso de endocitosis y no se lleva a cabo un correcto reciclaje.



**Figura 6. Mutaciones del CFTR y su consecuencia molecular.** Las diferentes mutaciones que pueden afectar al CFTR se pueden agrupar en diferentes clases según la repercusión funcional: no se da síntesis de proteína (clase I); hay defectos en el plegamiento y se da una degradación prematura (clase II); no se da una correcta regulación de la apertura del canal (clase III); la conductancia del canal se ve alterada (clase IV); se reduce la cantidad de CFTR (clase V); se obtiene una proteína inestable que sufre una mayor endocitosis (clase VI). Fuente: Adaptado del trabajo de Rowe y Hoover <sup>9</sup>.

Las mutaciones de clase I-III se han relacionado con una mayor severidad de la enfermedad mientras que la IV-VI con una más leve. La gravedad con la que se manifiesta la enfermedad vendrá determinada tanto por el tipo de mutación que se presente, por la presencia de otros genes alterados, y por el ambiente y estatus socioeconómico. Habría que destacar que esta clasificación restrictiva en la que una mutación debe ser incluida en una clase presenta ciertas limitaciones. Algunas mutaciones no encajan del todo en una clase, ya que presentan varias alteraciones por lo que hay una clasificación alternativa en la que existen 31 clases de mutaciones formadas por las VI clásicas y por 26 que son combinaciones de estas <sup>35</sup>

#### 4.1.1 Características del Phe508del

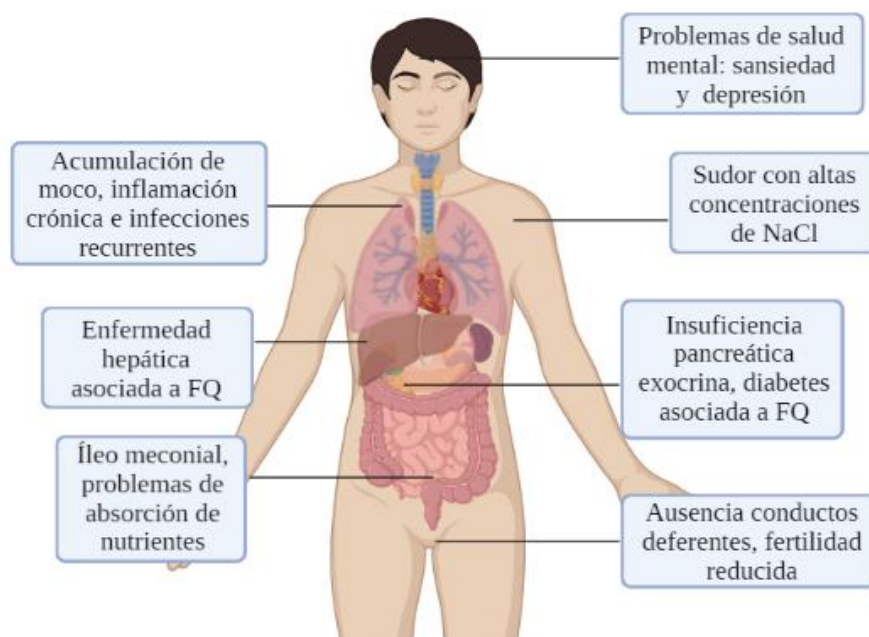
Como ya se ha comentado, la mutación más abundante es la conocida como Phe508del. Esta mutación implica la delección de tres bases en el gen CFTR, lo que resulta en la ausencia de una fenilalanina en la posición 508 de la proteína. Esta fenilalanina forma parte del dominio NBD1, y su ausencia provoca alteraciones en las interacciones de este con otros dominios de la proteína. En concreto, en el canal normal, el NBD1 interacciona con el bucle intracelular ICL4 (ubicado en el dominio MSD2), lo que permite que se llegue a la proteína funcional. Sin embargo, debido a esta desestabilización en el NBD1, el plegamiento del CFTR se ve afectado, lo que resulta en la retención en el ER y afecta al tráfico celular (ER-Golgi-Membrana plasmática apical) normal <sup>12,14</sup>.

Al comparar la estructura del CFTR mutante con el normal mediante estudios de cristalografía y dinámica molecular, se ha observado que solo hay diferencias estructurales mínimas, pero son las regiones móviles como en NBD1 con la fenilalanina afectada las que se ven comprometidas. La eficiencia en el plegamiento se reduce drásticamente en el mutante, llegando a valores de solo el 0,4%, lo que es reconocido por la maquinaria de control de calidad del ER. El polipéptido puede ser marcado por ubiquitinación para su posterior degradación co-traduccionalmente por las chaperonas Hsp70 (forman el primer punto de control del ER) o una vez ya sintetizado por completo. La calnexina también puede detectar alteraciones en el plegamiento a través de glicosilaciones características, lo que lleva a la introducción de estas proteínas en la vía del proteasoma. Otro fallo que se encuentra en este mutante está relacionado con la señal de exportación presente en el NBD1 que como ya se comentó, está formada por dos aminoácidos ácidos que facilitan el transporte hacia Golgi por interacción con COPII. Sin embargo, debido a la mutación, esta señal de exportación puede estar enmascarada, lo que podría explicar la retención del CFTR en el ER <sup>12,14</sup>. Debido a estos fallos se produce una acumulación de la proteína en el ER y una saturación del proteasoma, lo que desencadena un proceso conocido como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Como respuesta a este estrés, se produce un aumento en la transcripción de chaperonas y proteínas antioxidantes, y se inhibe la transcripción de genes que codifican proteínas que se traslocan al ER. La inflamación, que es típica en personas con FQ y que se discutirá más adelante, también participa en el desencadenamiento de esta respuesta por lo que se ve aún más potenciada <sup>36</sup>

Por lo tanto, considerando que en este mutante se da una ausencia de CFTR funcional en le membrana debido a fallos en el plegamiento, se podría incluir dentro de las mutaciones de clase II. Sin embargo, también se observa un defecto en la apertura y cierre del canal que consigue llegar a la membrana (característica de la clase III), además de presentar una estabilidad reducida por la glicosilación alterada, lo que provoca un aumento en la endocitosis del canal (característico de la clase VI). Este caso ejemplifica claramente que una clasificación restrictiva no se adapta completamente a todas las mutaciones <sup>37</sup>.

#### 4.2 Manifestaciones clínicas y órganos afectados

El fenotipo de la FQ se caracteriza por la pérdida progresiva de la función pulmonar, lo cual es la principal causa de muerte, junto con otras complicaciones como la insuficiencia pancreática, malabsorción intestinal, sudor excesivamente salado, entre otras (**Figura 7**). Debido a la amplia variedad de mutaciones que pueden ocurrir, existe una gran diversidad de síntomas, lo que determina la gravedad de la enfermedad. Además, puede haber enfermos que sean heterocigotos, es decir, que presenten dos alelos defectuosos pero cada uno con una mutación distinta que junto con la influencia de otros genes y del ambiente amplía aún más la diversidad sintomatológica <sup>1</sup>. A continuación, se describen los principales desórdenes que presentan las personas con FQ lo que no quiere decir que todos los pacientes experimenten todos los trastornos que se mencionarán.



**Figura 7. Principales manifestaciones clínicas que presentes en las personas con fibrosis quística.** La afectación pulmonar es la principal causa de muerte entre los pacientes, pero también se ven afectados otros órganos. Fuente: Elaboración propia

#### 4.2.1 Afectación en la fisiología del tracto respiratorio

Los pacientes con FQ presentarán concentraciones intracelulares elevadas de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$ , lo que provoca una absorción pasiva de agua tanto por vía paracelular como mediante las acuaporinas. Este movimiento de agua conlleva una deshidratación del ASL haciendo que el moco sea más espeso y se vea comprometido el movimiento ciliar. Como resultado, la eliminación inadecuada de los microorganismos, debido a este moco anómalo, conduce a infecciones respiratorias recurrentes y a una tos crónica <sup>22</sup>. Se estima que un 33% de los niños en edad preescolar padecen bronquiectasia, una dilatación permanente de las vías respiratorias causada por los ciclos de infección e inflamación que deterioran el tejido epitelial haciendo que las paredes se distiendan con facilidad <sup>1</sup>. Las infecciones más comunes en las vías respiratorias son causadas por bacterias de las especies *P.aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y hongos del género *Aspergillus*. La infección por *P.aeruginosa* se relaciona con un aumento en la mortalidad y un rápido deterioro de la función pulmonar. Para evitar la infección cruzada entre personas con FQ se suele recomendar evitar el contacto entre enfermos. Sin embargo, estas bacterias suelen ser inofensivas para las personas sanas, por lo que en principio no se correría este riesgo de infección. Además, debido a que la secreción de bicarbonato también se ve disminuida provocando un ambiente más ácido, el sistema inmune se ve comprometido llevando a cabo una defensa frente a las bacterias menos efectiva <sup>38</sup>.

El bicarbonato presente en la superficie epitelial desempeña un papel crucial a la hora de quelar los iones calcio que rodean los agregados masivos de mucina secretados, permitiendo así la expansión de las mucinas que les confiere un estado viscoelástico compatible con un aclaramiento mucociliar fisiológico. Por lo tanto, como en la FQ hay una disminución en las concentraciones de bicarbonato, este proceso se ve alterado, dando lugar a una secreción demasiado viscosa que se adhiere en exceso al tracto respiratorio, dificultando la movilización del moco <sup>39</sup>.

Otro proceso en el que el bicarbonato está implicado es la estimulación de la adenilato ciclasa soluble. Esta enzima cataliza la conversión de ATP a AMPc, el cual actúa como segundo mensajero en una infinidad de procesos, incluyendo la estimulación de la expresión del CFTR, como se mencionó en el apartado de biosíntesis, y en el movimiento ciliar. Por lo tanto, en la CF, se produce una desregulación en el sistema de control de la

expresión del CFTR y no habrá un movimiento ciliar correcto debido a la disminución en niveles de AMPc causada por falta de estimulación del bicarbonato <sup>23</sup>.

La disminución del pH en el ASL también tiene un impacto en el ENaC. Este fenómeno se atribuye a la interacción de una proteína denominada SPLUNC1 con el canal, lo que conduce a su internalización y, por lo tanto, a una reducción de su función. En un entorno ácido, esta proteína no puede desempeñar adecuadamente su función, lo que resulta en que esta regulación negativa no se lleva a cabo y hay un aumento en la reabsorción de sodio y, como consecuencia, en la retención de agua, lo que provoca una deshidratación de la ASL <sup>2,23</sup>.

Durante mucho tiempo ha sido objeto de debate si la infección es previa a la inflamación del tracto respiratorio, una característica distintiva en la CF, o si esta inflamación se debe a un defecto intrínseco del CFTR. La susceptibilidad a la infección se limita únicamente a las vías respiratorias y no en todo el organismo, lo que sugiere que no hay un defecto genérico en el sistema inmunológico, sino que está localizado en el aparato respiratorio. Se ha llegado a la conclusión de que el fenómeno inicial radica en el defecto en el aclaramiento mucociliar de las vías, lo que finalmente conduce a la inflamación y daños en estas estructuras, debido a una eliminación defectuosa de los patógenos <sup>20</sup>. A continuación, se mencionan las diferentes causas asociadas al desarrollo de una inflamación descontrolada:

- El reclutamiento continuo y la migración de neutrófilos hacia las vías respiratorias con el fin de combatir las infecciones resulta en un claro aumento de los niveles de elastasa leucocitaria humana (HLE). Su función es remodelar los tejidos y atacar a los patógenos, estando regulada de manera natural por inhibidores como la  $\alpha$ -1 antitripsina para controlar su actividad. En la FQ estos inhibidores no se producen en la cantidad adecuada para contrarrestar el efecto de los altos niveles de HLE provocando daños en el tejido. Además, la HLE impide que ocurra una respuesta inmunológica adecuada, ya que se une a inmunoglobulinas y proteínas del complemento dificultando la opsonización y a receptores de macrófagos, comprometiendo así la fagocitosis <sup>40</sup>.

- Existe un aumento en la generación de especie reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los neutrófilos y una disminución en antioxidantes, como el glutatión o el tiocianato, que, como ya se comentó, son transportados al lumen de las vías respiratorias por el CFTR. Además, también se ha observado una disfunción en las mitocondrias de las células

epiteliales en esta localización, lo que resulta en una menor producción de energía y un aumento en la generación de ROS <sup>30</sup>.

- El perfil lipídico se ve claramente alterado en la FQ ya que, como se explicará en los siguientes apartados, no se produce una correcta absorción de las grasas en el intestino delgado debido a una disminución en la secreción de enzimas pancreáticas. Esto resulta en niveles desequilibrados de ácidos grasos esenciales de la serie omega-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA) o el ácido eicosapentaenoico (EPA), en favor de ácidos grasos de la serie omega-6, como el ácido araquidónico (AA). Los primeros son precursores de prostaglandinas antiinflamatorias mientras que el AA lo es de prostaglandinas pro-inflamatorias <sup>20</sup>.

#### **4.2.2 Afectación en la fisiología del páncreas**

Aproximadamente el 85% de los bebés que nacen con FQ presentan insuficiencia pancreática (IP), lo que implica una reducción en la función del páncreas de aproximadamente el 80-90%. Sin embargo, el porcentaje de adultos que presentan IP es mucho menor debido a la implementación de las medidas adecuadas, que se detallarán en el apartado de tratamiento <sup>9</sup>. La prevalencia de IP está influenciada por el tipo de mutación presente, ya que las personas con mutaciones de clase I-III y VI presentarán una IP grave en comparación con aquellas con mutaciones de clase IV y V, que pueden tener una IP leve o no presentarla en absoluto <sup>1</sup>.

La secreción de bicarbonato se ve disminuida debido a la afectación del CFTR, ya que no se produce la regulación positiva hacia el transportador SLC26A ni la secreción de bicarbonato a través del propio CFTR, tal como se explicó anteriormente. Además, se produce una mayor acumulación de moco con unas mucinas más compactas, similar a lo que ocurre en las vías respiratorias, lo que promueve la obstrucción de los conductos pancreáticos. Como resultado, se dificulta la neutralización del ácido gástrico, además de darse una activación prematura de las enzimas pancreáticas, lo que conduce a la destrucción del tejido pancreático. Esto dificulta la digestión de grasas y proteínas, sobre todo, y dificulta su absorción, lo que lleva a un crecimiento alterado y unas necesidades energéticas superiores para compensar la falta de absorción de nutrientes. Además, la falta de grasas afecta la absorción de vitaminas liposolubles, lo que es característico en las personas con CF, quienes presentan deficiencias de estas vitaminas <sup>2,30</sup>.

Además de las complicaciones en el páncreas exocrino, la función endocrina también se ve afectada. Se observa que hay una disminución en el número de células productoras de insulina, probablemente debido al aumento en la viscosidad de las secreciones exocrinas, que no solo afecta a los ductos donde se transporta, sino que la activación prematura de estas enzimas también puede afectar a estas células adyacentes provocando su destrucción y sustitución por quistes de tejido conjuntivo <sup>41</sup>. Como resultado, los individuos con FQ presentarán desórdenes en el metabolismo de la glucosa pudiendo llegar a desarrollar diabetes asociada a la FQ, aproximadamente en un 35% de los adultos <sup>1</sup>.

#### **4.2.3 Afectación en la fisiología de la glándula sudorípara**

Aunque la secreción mediada por la vía colinérgica (a través del transportador NKCC1) es prácticamente igual en personas sanas que en aquellas con CF, se evidencia una clara disminución de la secreción regulada por la vía adrenérgica, la cual está mediada por el CFTR. Además, no se lleva a cabo correctamente la reabsorción de NaCl en el conducto excretor. Como consecuencia, se produce una pérdida excesiva de sales en el sudor, siendo una manifestación clínica que se puede cuantificar fácilmente como se explicará más adelante en el diagnóstico de la enfermedad <sup>26</sup>. Bajo condiciones normales, no representa un gran problema, aunque en ambientes excesivamente calurosos o húmedos se produzca una pérdida excesiva de sales y agua, lo que puede llevar a la deshidratación <sup>2</sup>. Los niños son especialmente susceptibles a la deshidratación, sobre todo cuando también presentan vómitos o diarrea por otras causas, lo que puede resultar en una situación de alcalosis hipoclorémica o hiponatremia, es decir, baja concentración de cloro y sodio respectivamente en el plasma sanguíneo <sup>9</sup>. Además, puede haber una disminución en las moléculas con función antimicrobiana en el sudor, lo que puede provocar infecciones en la piel y dermatitis atópica <sup>2</sup>.

#### **4.2.4 Afectación en otros órganos y tejidos**

El íleo meconial en los bebés recién nacidos es un signo que sugiere un rápido diagnóstico de FQ. El término “meconio” se refiere a la primera evacuación del bebé. Cuando se produce una obstrucción en el intestino delgado debido a un contenido excesivamente espeso que impide una expulsión adecuada, se diagnostica el íleo meconial, el cual puede afectar hasta al 10% de los recién nacidos. Por otro lado, el síndrome de obstrucción distal del intestino delgado es el equivalente al íleo de meconio en adultos (afecta al 15-20% de los pacientes), y se caracteriza por estreñimiento y dolor abdominal <sup>42</sup>. También se ha

observado que en la FQ se da una disbiosis, es decir, una alteración en la microbiota intestinal debido a alteraciones en el CFTR, junto con el efecto del uso recurrente de antibióticos para tratar las infecciones pulmonares. Esto resulta en un crecimiento excesivo de ciertas poblaciones bacterianas del intestino y una disminución en la cantidad de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que poseen propiedades inmunomoduladoras. Además, esta disbiosis altera la permeabilidad intestinal y afecta a la absorción de nutrientes <sup>43</sup>.

En el hígado, los conductos que transportan la bilis experimentan un deterioro y obstrucción, lo cual se agrava con el tiempo siendo una complicación clínicamente relevante y que llega a afectar a un 5-10% del total de enfermos. Esta sintomatología se desarrolla debido a un aumento en la viscosidad y disminución del flujo biliar que provocará en última instancia la cirrosis del hígado. Esto, junto con la disminución en la secreción de enzimas pancreáticas, dificultará la absorción de grasas. <sup>44</sup>.

El aparato reproductor masculino se ve gravemente afectado en la FQ. Se estima que aproximadamente el 95-98% de los hombres nace sin conductos deferentes, los cuales son los conductos encargados de conectar el epidídimo con la uretra para el transporte del espermatozoides, siendo esto la principal causa de la infertilidad en estos casos <sup>45</sup>. Por otro lado, en las mujeres se estima que la infertilidad afecta al 20% debido a la presencia de un moco cervical demasiado espeso y pegajoso que dificulta el correcto desplazamiento de los espermatozoides <sup>9</sup>.

Por último, pero no por ello menos importante, es evidente que la salud mental se ve significativamente afectada en las personas con FQ. Esta enfermedad crónica, caracterizada por una esperanza de vida limitada, requiere de una gran inversión de tiempo para realizar todos los tratamientos necesarios. Como resultado de esta realidad, la ansiedad y la depresión afecta entorno al 25-30% de esta población. Es importante destacar que un estado mental negativo puede tener consecuencias graves en la progresión de la enfermedad, por lo que el apoyo psicológico resulta de vital importancia <sup>46</sup>.

### **4.3 Genes que modifican el fenotipo**

Es importante reconocer que la gravedad de la enfermedad no se ve determinada exclusivamente por el CFTR, sino que están involucrados otros genes que influyen en el desarrollo y progresión de la enfermedad. Entre estos genes, podemos destacar otras proteínas transmembrana cercanas al CFTR que se han visto relacionadas con el



desarrollo del íleo meconial como el SLC6A14 que codifica para un transportador de aminoácidos neutros y catiónicos dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Éste también se ha relacionado con la propensión a desarrollar infección por *Pseudomonas aeruginosa* y, por tanto, provocar la afectación de la función pulmonar. En estudios con gemelos se ha llegado a la conclusión de que la heredabilidad del daño pulmonar es del 50% no siendo el CFTR el principal causante, sino que se ha relacionado con otros genes como la glutatión-S-transferasa, la lectina de unión a manosa, la óxido nítrico sintasa y el antígeno leucocitario humano de clase II. Por lo tanto, para tener una visión global de la FQ no sólo hay que centrarse en el CFTR, sino que se deben tener en cuenta todos los posibles genes modificadores y el efecto del ambiente como puede ser la exposición a toxinas o variaciones en los tratamientos <sup>20</sup>.

## **5. Diagnóstico y seguimiento de la enfermedad**

### **5.1 Cribado neonatal y diagnóstico de la enfermedad**

El cribado neonatal es un programa de detección temprana de enfermedades en recién nacidos que está implementado en numerosos países, incluido España. Este programa, comúnmente conocido como “prueba del talón”, consiste en la obtención de una muestra de sangre del recién nacido en las primeras 48-72 horas después del nacimiento, con el propósito de identificar diversas enfermedades tales como la fenilcetonuria, el hipotiroidismo congénito o la FQ. En el contexto específico de la FQ, se lleva a cabo una detección mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) del tripsinógeno inmunorreactivo (IRT) presente en la muestra. El tripsinógeno, una enzima sintetizada por el páncreas, es un marcador de la función pancreática, ya que su elevación en el plasma sanguíneo puede ser causa de una obstrucción de los ductos pancreáticos tal y como ya hemos comentado sugiriendo el diagnóstico de FQ. Una concentración elevada de IRT no es específico de FQ, ya que hay otras patologías como la pancreatitis aguda o la obstrucción de los ductos por otras causas. Por lo tanto, serán necesarias otras pruebas para el diagnóstico definitivo <sup>38</sup>.

El incremento de la concentración de sales en el sudor ha sido relacionado con la FQ desde la antigüedad, a pesar de que la causa subyacente de este fenómeno no se conocía. En 1959, se desarrolló la prueba de sudor por iontoforesis de policarpina, la cual continúa siendo el método de referencia para el diagnóstico de FQ <sup>22</sup>. Esta prueba, que se realiza tanto en pacientes con un cribado neonatal positivo como en los casos en los que hay

sospecha clínica o una historia familiar de FQ, consiste en la medida del  $\text{Cl}^-$  del sudor mediante una valoración química tras inducción por policarpina. La policarpina es un agonista de los receptores de acetilcolina que se introduce en el cuerpo favorecida por corrientes eléctricas débiles (iontoforesis), con el fin de estimular la producción de sudor. Para considerar que los niveles de  $\text{Cl}^-$  se encuentren dentro de los rangos normales y descartar la presencia de FQ, se deben obtener valores inferiores a 30 mM. Si, por lo contrario, se alcanzan valores mayores a 60 mM, sugiere un diagnóstico de FQ y se requiere realizar un estudio genético para determinar el tipo de mutación presente. En el caso de obtener valores intermedios, también se procede al estudio genético para descartar o confirmar la presencia de FQ <sup>47</sup>.

Para el análisis genético, el primer enfoque habitual consiste en utilizar kits comerciales que permiten detectar las mutaciones más frecuentes mediante la amplificación por PCR del gen del CFTR, seguido del análisis mediante distintas técnicas. Sin embargo, cuando se trata de mutaciones menos comunes lo óptimo es llevar a cabo la secuenciación del gen para ver específicamente que mutaciones presenta. Esto será crucial, ya que la forma de abordar el tratamiento varía según la alteración específica que presente el gen CFTR. También es posible detectar la presencia de FQ mediante diagnóstico preimplantacional en parejas que presentan un riesgo de transmitir alelos con mutaciones y mediante diagnóstico prenatal no invasivo gracias al ADN circulante fetal presente en la sangre materna <sup>48</sup>.

## **5.2 Seguimiento de la enfermedad**

Una vez que se ha realizado el diagnóstico de FQ, resulta fundamental llevar a cabo un seguimiento de las diferentes funciones que se ven afectadas, con el fin de evaluar la progresión de la enfermedad o la eficacia de un tratamiento. Para determinar la función pulmonar se realiza una espirometría en la que se suele determinar el volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEF1) después de una inhalación máxima. Los valores de normalidad se toman cuando el VEF1 es mayor o igual al 80% de la capacidad vital forzada (cantidad máxima de aire exhalado). El valor el VEF1 va disminuyendo gradualmente con el transcurso de la enfermedad hasta el punto de necesitar un trasplante de pulmón. Con respecto a la función pancreática, se suele medir la cantidad de elastasa-1 fecal, ya que se ve disminuida debido a la insuficiencia pancreática. La prueba del sudor, además de usarse para el diagnóstico de la FQ, es muy útil para evaluar la efectividad de

un tratamiento concreto, puesto que una disminución en la concentración de  $\text{Cl}^-$  es un fiel reflejo de una mejora en el funcionamiento del CFTR <sup>1,38</sup>.

## **6. TRATAMIENTO**

### **6.1 Antibióticos y principales medicamentos recetados**

Las infecciones respiratorias recurrentes en pacientes con FQ, a menudo causadas por *P. aeruginosa*, requieren el uso periódico de antibióticos inhalados y sistémicos. La bacteria tiene la capacidad de formar biopelículas en el ambiente de la FQ además de poder desarrollar resistencia a los antibióticos, lo que complica el tratamiento y requiere de enfoques alternativos<sup>49</sup>. Para tratar los problemas respiratorios, se recetan mucolíticos y lavados nasales con suero salino hipertónico para reducir la viscosidad del moco, y antiinflamatorios como los corticoesteroides. <sup>38</sup>. La fisioterapia respiratoria desempeña un papel esencial en la facilitación de la expulsión del moco y la reeducación de los pacientes para aprender técnicas de tos controlada y dirigida. Además, se recomienda la práctica de ejercicio aeróbico por sus beneficios en cuanto a la mejora de capacidad pulmonar y expulsión de moco<sup>50</sup>.

Por otro lado, debido a la disminución en la secreción de enzimas pancreáticas y su repercusión en la absorción de nutrientes, los pacientes con FQ deben tomar suplementos de enzimas pancreáticas y de vitaminas liposolubles (A, D, E y K). Además, la ingesta diaria calórica debe aumentar entorno al 20-50% en comparación con los requisitos energéticos de una población sana de edad, sexo y tamaño parecido <sup>51</sup>.

### **6.2 Terapia génica**

La terapia génica somática consiste en añadir una copia del gen CFTR que permita expresar el canal funcional y por tanto restaurar las complicaciones asociadas a su disfunción. La estrategia común se basa en introducir una copia de ADN complementario, es decir, ADN que se produce a partir del ARN mensajero por la transcriptasa inversa, en diferentes tipos de vectores. Se ha intentado realizar la terapia con vectores víricos como los adenovirus, adenoasociados y retrovirus, aunque no se han obtenido resultados lo suficientemente prometedores como para que se apruebe una terapia concreta. Esto se debe a fallos en la integración o a una respuesta inmune hacia estos vectores que dificulta la expresión del CFTR <sup>52</sup>.

### **6.3 Moduladores del CFTR**

Los moduladores, a diferencia de la mayoría de los tratamientos disponibles para la FQ que tratan los síntomas asociados a las distintas disfunciones, se dirigen a la causa del problema: el CFTR disfuncional. Se trata de pequeñas moléculas que como su nombre indica, modulan la actividad del CFTR, consiguiendo que lleve a cabo un transporte efectivo de Cl<sup>-</sup> y bicarbonato. El Ivacaftor fue el primer modulador aprobado en el 2012 y forma parte del grupo de los potenciadores, es decir, compuestos que restauran o incluso mejoran la probabilidad de apertura del canal. Está enfocado para aquellas mutaciones que provocan una alteración de la activación o conductancia del canal (clases III y IV) las cuales tan solo representan el 5% de las mutaciones. No se conoce el mecanismo de acción concreto ni el sitio del CFTR al que se une, pero se cree que potencia el canal de manera dependiente de la fosforilación e independiente de ATP <sup>53</sup>.

El desarrollo de moduladores que se centren en la mutación más común del CFTR (Phe508del) llevó al desarrollo de los correctores; un grupo de moduladores que modulan el plegamiento del CFTR facilitando el tráfico hacia la membrana plasmática. Se han desarrollado distintos tipos de correctores con diferentes mecanismos de acción, pero se ha llegado a la conclusión de que se obtiene una mejoría más notable cuando se combina con un potenciador, es decir, primero se permite que el CFTR que estaba retenido en el ER llegue a la membrana plasmática y luego una vez aquí se potencia su funcionamiento <sup>53</sup>. La combinación triple de dos correctores junto con un potenciador bajo el nombre de Kaftrio, que se incluyó en la financiación pública en España en diciembre de 2021, puede considerarse como tratamiento más efectivo en cuanto a calidad de vida, mejora de la función pulmonar y reducción del Cl<sup>-</sup> en sudor <sup>54</sup>.

Además de los potenciadores y los correctores, existen otro tipo de moduladores como los estabilizadores frente a las mutaciones que generan una inestabilidad del CFTR (mutaciones de clase VI), los amplificadores que aumentan la síntesis de CFTR (mutaciones de clase V) y los agentes de supresión de codones de terminación que evitan la terminación prematura de la traducción (mutaciones de clase I) <sup>53</sup>.

### **6.4. Trasplante de pulmón**

En etapas tardías de la enfermedad la función pulmonar se encuentra tan disminuida (FEV1 por debajo del 30-35%) que la única solución factible es llevar a cabo un trasplante

pulmonar. La media de supervivencia tras el trasplante es de 10 años, ya que aún presenta riesgo de rechazo pulmonar y el tratamiento con inmunodepresores puede potenciar la aparición de infecciones. También se ha observado que tras el trasplante aumenta la probabilidad de padecer diabetes, osteoporosis e insuficiencia adrenal por lo que la opción del trasplante debe ser tomada teniendo en cuenta todas estas posibles complicaciones <sup>55</sup>.

## **7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

La FQ es un claro ejemplo de la importancia que tiene conocer las bases moleculares de una enfermedad para poder abordarla desde distintos puntos de vista. Conforme han ido aumentando los conocimientos de la afección, ha ocurrido un desarrollo paralelo tanto de técnicas de diagnóstico como de nuevos tratamientos. Los moduladores del CFTR han supuesto un cambio radical en la manera de abordar la enfermedad, aunque aún quedan muchas incógnitas por conocer y hacer frente.

El CFTR interactúa con tal cantidad de moléculas que sería conveniente conocer su interactoma, es decir, tener claro todas las interacciones que tiene el canal. Esto ayudaría a entender ciertos pasos del proceso de biosíntesis del CFTR funcional que permitirían el desarrollo de nuevas terapias <sup>56</sup>. Como ya se ha explicado, el uso recurrente de antibióticos puede llevar a la aparición de resistencia por parte de las bacterias resultando en un grave problema. Una alternativa a los antibióticos que está siendo estudiada son los bacteriófagos, es decir, usar virus que infectan bacterias para que se encarguen de eliminarlas <sup>57</sup>. Retomando los moduladores, debe destacarse que en la mayoría de ellos no se conoce del todo el mecanismo de acción de éstos ni los residuos concretos con los que interaccionan del CFTR, por lo que es uno de los desafíos futuros, junto con la evaluación de los efectos secundarios, que podría tener su uso. Además, entorno al 10-18% de pacientes no pueden beneficiarse del uso de los moduladores debido a que son portadores de mutaciones raras que no tienen aún un fármaco útil. Para solucionar esto es necesario el desarrollo de terapias alternativas. Dentro de las distintas terapias que están en investigación podemos destacar el intento de disminuir la inflamación mediante el bloqueo del reclutamiento de neutrófilos y el uso de sustancias que inactiven el canal de sodio ENaC para rehidratar la ASL <sup>58</sup>.

Todos los tratamientos comentados hasta ahora, incluidos los moduladores, no son una cura de la FQ, sino que ayudan a controlar los síntomas, prevenir o reducir complicaciones y hacer que, en general, sea más fácil vivir con la afección. Sin embargo,

esto podría cambiar si se desarrollase una terapia génica lo suficientemente efectiva que pudiera ser útil para cualquier mutación del CFTR. Las investigaciones se centran en el uso de liposomas y nanopartículas lipídicas, ya que los conocimientos sobre éstos han aumentado exponencialmente con el desarrollo de la vacuna para el COVID-19. El principal inconveniente que se debe solucionar es la baja eficiencia que presentan estas partículas para llevar a cabo la transfección <sup>52,58</sup>.

Para concluir, es evidente que los avances significativos en la FQ han transformado el panorama de esta enfermedad devastadora. El diagnóstico precoz a través del cribado neonatal, el enfoque multidisciplinar en el abordaje de la enfermedad, las mejoras en el tratamiento de la afectación pulmonar y el establecimiento de instituciones que aúnan medios para la investigación, han desempeñado un papel crucial en el aumento notable de la esperanza de vida en la última década. Estos logros han brindado a un mayor número de niños la oportunidad de alcanzar la etapa adulta con una mejor calidad de vida y una perspectiva de futuro mucho más esperanzadora.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Shteinberg, M., Haq, I. J., Polineni, D. & Davies, J. C. Cystic fibrosis. *Lancet* **397**, 2195–2211 (2021).
2. Saint-Criq, V. & Gray, M. A. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell Mol Life Sci* **74**, 93–115 (2017).
3. Farrell, P. *et al.* Estimating the age of p.(Phe508del) with family studies of geographically distinct European populations and the early spread of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* **26**, 1832–1839 (2018).
4. Morral, N. *et al.* The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* **7**, 169–175 (1994).
5. Navarro, S. Recopilación histórica de la fibrosis quística. *Gastroenterol Hepatol* **39**, 36–42 (2016).
6. Andersen, D. H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *American Journal of Diseases of Children* **56**, 344 (1938).
7. Kerem, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080 (1989).
8. Scotet, V., L’Hostis, C. & Férec, C. The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the CFTR Gene Discovery. *Genes (Basel)* **11**, (2020).
9. Rowe, S. M., Hoover, W., Solomon, G. M. & Sorscher, E. J. Cystic Fibrosis. *Murray and Nadel’s Textbook of Respiratory Medicine* 822-852.e17 Preprint at <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3383-5.00047-6> (2016).
10. Registro de pacientes. Preprint at <https://fibrosisquistica.org/registro-de-pacientes/>.
11. Villaverde-Hueso, A. *et al.* Mortality Due to Cystic Fibrosis over a 36-Year Period in Spain: Time Trends and Geographic Variations. *Int J Environ Res Public Health* **16**, (2019).
12. Pranke, I. M. & Sermet-Gaudelus, I. Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int J Biochem Cell Biol* **52**, 26–38 (2014).
13. Moran, O. The gating of the CFTR channel. *Cell Mol Life Sci* **74**, 85–92 (2017).

14. Farinha, C. M. & Canato, S. From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cell Mol Life Sci* **74**, 39–55 (2017).
15. Farinha, C. M., Matos, P. & Amaral, M. D. Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *FEBS J* **280**, 4396–4406 (2013).
16. Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D. C. & Chen, J. Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel. *Cell* **169**, 85–95.e8 (2017).
17. Levring, J. *et al.* CFTR function, pathology and pharmacology at single-molecule resolution. *Nature* **616**, 606–614 (2023).
18. Buckley, C. E. & St Johnston, D. Apical–basal polarity and the control of epithelial form and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2022* **23**:8 **23**, 559–577 (2022).
19. Wang, Q. & Margolis, B. Apical junctional complexes and cell polarity. *Kidney Int* **72**, 1448–1458 (2007).
20. Bergeron, C. & Cantin, A. M. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Semin Respir Crit Care Med* **40**, 715–726 (2019).
21. Csanády, L., Vergani, P. & Gadsby, D. C. STRUCTURE, GATING, AND REGULATION OF THE CFTR ANION CHANNEL. *Physiol Rev* **99**, 707–738 (2019).
22. Hanssens, L. S., Duchateau, J. & Casimir, G. J. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells* **10**, (2021).
23. Zajac, M., Dreano, E., Edwards, A., Planelles, G. & Sermet-gaudelus, I. Airway Surface Liquid pH Regulation in Airway Epithelium Current Understandings and Gaps in Knowledge. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
24. Whitsett, J. A. Airway epithelial differentiation and mucociliary clearance. *Ann Am Thorac Soc* **15**, S143–S148 (2018).
25. Baker, L. B. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin)* **6**, 211–259 (2019).
26. Wine, J. J. How the sweat gland reveals levels of CFTR activity. *J Cyst Fibros* **21**, 396–406 (2022).
27. Petersen, O. H., Gerasimenko, J. V., Gerasimenko, O. V., Gryshchenko, O. & Peng, S. The roles of calcium and ATP in the physiology and pathology of the exocrine pancreas. *Physiol Rev* **101**, 1691–1744 (2021).
28. Seidler, U. & Nikolovska, K. Slc26 Family of Anion Transporters in the Gastrointestinal Tract: Expression, Function, Regulation, and Role in Disease. *Compr Physiol* **9**, 839–872 (2019).
29. Angyal, D., Bijvelds, M. J. C., Bruno, M. J., Peppelenbosch, M. P. & de Jonge, H. R. Bicarbonate Transport in Cystic Fibrosis and Pancreatitis. *Cells* **11**, (2021).
30. Madácsy, T., Pallagi, P. & Maleth, J. Cystic Fibrosis of the Pancreas: The Role of CFTR Channel in the Regulation of Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling and Mitochondrial Function in the Exocrine Pancreas. *Front Physiol* **9**, 1585 (2018).
31. Averna, M., Melotti, P. & Sorio, C. Revisiting the Role of Leukocytes in Cystic Fibrosis. *Cells* **10**, (2021).
32. Pankonien, I., Quaresma, M. C., Rodrigues, C. S. & Amaral, M. D. CFTR, Cell Junctions and the Cytoskeleton. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
33. Cystic Fibrosis Mutation Database. <http://www.genet.sickkids.on.ca/>.
34. Veit, G. *et al.* From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* **27**, 424–433 (2016).
35. Bareil, C. & Bergougnoux, A. CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology. *Arch Pediatr* **27 Suppl 1**, eS8–eS12 (2020).
36. Trouvé, P., Férec, C. & Génin, E. The Interplay between the Unfolded Protein Response, Inflammation and Infection in Cystic Fibrosis. *Cells* **10**, (2021).

37. Bareil, C. & Bergougnoux, A. CFTR gene variants, epidemiology and molecular pathology. *Arch Pediatr* **27 Suppl 1**, eS8–eS12 (2020).
38. Ratjen, F. *et al.* Cystic fibrosis. *Nat Rev Dis Primers* **1**, 15010 (2015).
39. Morrison, C. B., Markovetz, M. R. & Ehre, C. Mucus, Mucins and Cystic Fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **54**, S84 (2019).
40. Voynow, J. A. & Shinbashi, M. Neutrophil Elastase and Chronic Lung Disease. *Biomolecules* **11**, (2021).
41. Prentice, B. J. *et al.* Cystic fibrosis-related diabetes and lung disease: an update. *Eur Respir Rev* **30**, (2021).
42. Ley, D. & Turck, D. Digestive outcomes in Cystic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **56–57**, (2022).
43. Françoise, A. & Héry-Arnaud, G. The Microbiome in Cystic Fibrosis Pulmonary Disease. *Genes (Basel)* **11**, (2020).
44. Kamal, N., Surana, P. & Koh, C. Liver disease in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* **34**, 146–151 (2018).
45. Bieniek, J. M., Lapin, C. D. & Jarvi, K. A. Genetics of CFTR and male infertility. *Transl Androl Urol* **10**, 1391–1400 (2021).
46. Bathgate, C. J., Hjelm, M., Filigno, S. S., Smith, B. A. & Georgiopoulos, A. M. Management of Mental Health in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med* **43**, 791–810 (2022).
47. Simmonds, N. J. Is it cystic fibrosis? The challenges of diagnosing cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **31**, 6–8 (2019).
48. Bienvenu, T., Lopez, M. & Girodon, E. Molecular Diagnosis and Genetic Counseling of Cystic Fibrosis and Related Disorders: New Challenges. *Genes (Basel)* **11**, 1–16 (2020).
49. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. & Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* **37**, 177–192 (2019).
50. Ding, S. & Zhong, C. Exercise and Cystic Fibrosis. *Adv Exp Med Biol* **1228**, 381–391 (2020).
51. Mariotti Zani, E. *et al.* Nutritional Care in Children with Cystic Fibrosis. *Nutrients* **15**, (2023).
52. Maule, G., Arosio, D. & Cereseto, A. Gene Therapy for Cystic Fibrosis: Progress and Challenges of Genome Editing. *Int J Mol Sci* **21**, 1–13 (2020).
53. Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol* **10**, (2020).
54. Zaher, A., ElSaygh, J., ElSori, D., ElSaygh, H. & Sanni, A. A Review of Trikafta: Triple Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Modulator Therapy. *Cureus* **13**, (2021).
55. Sidhaye, A., Goldswieg, B., Kaminski, B., Blackman, S. M. & Kelly, A. Endocrine complications after solid-organ transplant in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **18 Suppl 2**, S111–S119 (2019).
56. Amaral, M. D., Hutt, D. M., Tomati, V., Botelho, H. M. & Pedemonte, N. CFTR processing, trafficking and interactions. *J Cyst Fibros* **19 Suppl 1**, S33–S36 (2020).
57. Ling, K.-M., Stick, S. M. & Kicic, A. Pulmonary bacteriophage and cystic fibrosis airway mucus: friends or foes? *Front Med (Lausanne)* **10**, (2023).
58. Allen, L. *et al.* Future therapies for cystic fibrosis. *Nat Commun* **14**, (2023).