

1. INTRODUCCIÓ

Breu història

La fibrosi quística (FQ) és una malaltia greu que afecta diferents òrgans. Els estudis dels darrers anys han demostrat que la seva existència es remunta als inicis de la història de l'home, encara que les primeres apreciacions clíniques no es van produir fins el segle XV fent referència als nens amb gust salat com infants encantats que morien prematurament. Les descripcions clíniques continuaren entre els segles XVI i XIX, amb troballes histopatològiques al pàncrees que, mica en mica, desplaçaren les supersticions. No és fins el segle XX quan es defineix el terme “fibrosi quística de pàncrees” (Anderson et al. 1938) i es descriu el patró d'herència autosòmic recessiu (Anderson et al. 1946). La posterior constatació d'un excés de sal a la suor dels afectats (di Sant'Agnesse et al. 1953) va ser fonamental pel desenvolupament del test de la suor com a prova diagnòstica (Gibson et al. 1959).

En la seva descripció actual, la FQ es considera una malaltia genètica greu que es caracteritza per l'augment de la concentració d'electròlits a la suor, infeccions respiratòries recurrents, insuficiència pancreàtica i infertilitat en l'home (Welsh et al. 2001). El gen responsable de la FQ es va localitzar al cromosoma 7 el 1985 i es va aïllar a la regió 7q31.2 el 1989 (Kerem et al. 1989). El gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) abraça una regió genòmica de 230 kb, està organitzat en 27 exons i transcriu un RNA missatger de 6,1 kb. La proteïna codificada té un pes molecular de 170 kDa i una estructura primària formada per 1.480 aminoàcids. La proteïna CFTR és un canal de clorur regulat per AMPc (Riordan et al. 1989) i localitzat a les glàndules exocrines, específicament a la membrana apical de les cèl·lules epitelials, on controla el transport iònic. L'absència total o parcial de proteïna produeix un desequilibri electrofisiològic, el qual condueix a secrecions deshidratades produint l'obstrucció i atròfia del teixit.

La principal mutació responsable de la FQ és una deleció de 3pb, determinant la pèrdua de l'aminoàcid fenilalanina al codó 508 (F508del) (Kerem et al. 1989). La

mutació F508del representa el 68% dels gens afectats (CFGAC, 1990). Posteriorment, s'han descrit més de 1.000 mutacions *CFTR*, sent la majoria mutacions puntuals trobades a poblacions específiques (CFMDB). La caracterització mutacional permet abordar el diagnòstic molecular amb la màxima fiabilitat.

L'elevada heterogeneïtat molecular del gen *CFTR* es reflecteix en l'ampli espectre fenotípic de la malaltia. La disfunció de la proteïna, el seu nivell d'expressió en cada teixit, factors ambientals i gens modificadors contribueixen a la variabilitat clínica que s'observa en els pacients. Els criteris diagnòstics de FQ es van consensuar el 1998 (Rosenstein et al. 1998), no obstant, la identificació de mutacions *CFTR* en formes clíniques monosistèmiques ha produït un gran desconcert. S'han proposat denominacions com "relacionats amb FQ" per aquests fenotips (Dequeker et al. 2000), a la espera d'una major comprensió i consens.

La idea de que un diagnòstic i tractament primerencs milloren l'evolució clínica del pacient FQ ha afavorit la implantació de programes de detecció precoç. Els nous tractaments reflecteixen una millor qualitat i esperança de vida, la qual s'estima en 40 anys pels nascuts a la dècada dels 90 (Elborn et al. 1991). Els principals factors que han contribuït a la supervivència en els darrers anys són: El tractament antibiòtic, la fisioteràpia respiratòria, el trasplantament pulmonar i l'organització de l'assistència en centres especialitzats. No obstant, continua pendent un tractament definitiu capaç d'aturar el desenvolupament de la malaltia.

Prevalença de la fibrosi quística i avantatge selectiu

La FQ (MIM#219700) és la malaltia genètica recessiva greu més freqüent a la població d'origen caucasoid, amb una prevalença de 1 afectat per 2.000-4.000 naixements, depenent de la regió i/o ètnia d'origen (Welsh et al. 2001). Les dades actuals provenen d'estudis epidemiològics i de programes de detecció precoç, tot i que en algunes regions els moviments demogràfics dels darrers anys dificulten una estimació real. Els índex més alts es troben a: Irlanda, 1/1.460 (Cashman et al. 1995); Anglaterra, 1/2.500 (Schwarz et al. 1995); Suïssa, 1/2.000 (Hergersberg et al. 1997) i República Txeca, 1/2.800 (Macek et al. 2001). Al Sud d'Europa la prevalença és menor, de l'ordre d'1 per 4.000-5.000, com a Itàlia 1/4.700 (Bossi et al. 1999) i França 1/4.000 (Claustres et al. 2000). Al nostre país, les dades més acurades provenen del Programa de Detecció Precoç a Catalunya que es va iniciar al setembre de 1999, les dades recollides de 3,5 anys donen una estimació inicial d'1/5.532 (Gartner et al. 2003). Tanmateix, s'han descrit excepcions en algunes poblacions específiques, com és el cas de la població d'origen celta a la Bretanya Francesa, amb una prevalença d'1 per 1.200-1.600 (De Braekeleer et al. 1996).

Aquesta variabilitat respon, d'una banda, a la influència de les diferents migracions que han succeït a Europa i de l'altra, a raons geogràfiques i/o socio-culturals que han afavorit l'aïllament de determinades poblacions. Així, la menor prevalença s'ha descrit a Finlàndia amb 1/25.000 (Kere et al. 1994) i la més alta correspon a Albània amb 1/450 (Festini et al. 2003). Els estudis a la població Jueva mostren un ampli ventall, des de 1/2.400 a Grècia i Bulgària, fins prevalences de 1/3.300 als Jueus Ashkenazi i 1/39.000 als d'Iran (Kerem et al. 1995).

La prevalença en altres continents, Àfrica, Amèrica i Àsia, està encara poc documentada. L'estimació es fa difícil degut a l'alta mortalitat, es creu que podria ser de l'ordre d'1 per 10.000-17.000 (Devoto et al. 1991). La identificació de la mutació 3120+1G>A en individus d'origen afro-americà (Macek et al. 1997) s'ha utilitzat per l'estudi a la població negra de Sud-Àfrica, la prevalença estimada oscil·la d'1/784 a 1/13.924, confirmant la sospita de que molts casos no són diagnosticats (Padoa et al. 1999).

Per explicar l'elevada prevalença de FQ s'ha postulat com a mecanisme més probable la combinació d'un efecte fundador i un avantatge selectiu (Meindl et al. 1987). Aquest avantatge selectiu s'atribueix als individus heterocigots i podria resultar d'una major fertilitat o bé d'una protecció d'aquests davant una altra malaltia. Sense una evidència clara d'un increment en la fertilitat (Jorde et al. 1988), la segona possibilitat ha estat la més suggerent, atès que la selecció natural afavoreix els individus amb resistència a patògens i pot conduir a un augment de la freqüència de determinats al·lels deleteris. Davant d'una epidèmia, els individus portadors tenen una major supervivència i si l'epidèmia dura prou temps, l'al·lel deleteri s'acumula a la població. Les diferències geogràfiques i poblacionals trobades a la FQ i l'alta freqüència de diferents al·lels en poblacions aïllades suggereixen aquest avantatge selectiu dels heterocigots. La hipòtesi ha estat recolzada per diversos treballs. Un model de ratolí *Cftr*^{+/-} evidencia que la pèrdua del canal CFTR li dona una major resistència a la infecció per *Vibrio cholerae* (Gabriel et al. 1994). Un mecanisme similar s'ha demostrat per la proteïna STa, una enterotoxina termoestable de *Escherichia coli* que indueix la secreció de clorur a les cèl·lules que tenen proteïna CFTR normal, però no a les cèl·lules amb proteïna anòmala, prevenint la deshidratació per diarrea (Chao et al. 1994). L'estudi en línies cel·lulars demostra que CFTR a l'intestí actua com a receptor de la *Salmonella enterica Typhi* i que la capacitat del bacteri per entrar a les cèl·lules epitelials intestinals és considerablement limitada en absència del canal CFTR (Pier et al. 1998). En conjunt, aquests treballs encaixen amb la hipòtesi d'un avantatge de l'heterocigot davant diferents formes de diarrea que han estat la causa d'una gran mortalitat. Malgrat aquests resultats prometedors, un recent estudi qüestiona la seva validesa al observar un nivell similar de secreció de clorur tant en condicions bassals com sota l'estímul de prostaglandina en individus sans i portadors FQ (Högenauer et al. 2000).

Altres hipòtesis com la deriva genètica, augment de la fertilitat als portadors o un alt índex de mutació del gen *CFTR* (Romeo et al. 1989) no han estat demostrades. Per tant, no s'ha pogut determinar, de forma inequívoca, l'origen de l'alta prevalença.

Taula 1. Prevalença de la fibrosi quística a diferents poblacions

País	Prevalença	Referència
Albània	1/450	Festini et al. 2003
Irlanda	1/1.461	Cashman et al. 1995
Suïssa	1/2.000	Hergersberg et al. 1997
Anglaterra	1/2.500	Schwarz et al. 1995
República Txeca	1/2.800	Macek et al. 2001
Bretanya (França)	1/2.913 *	Scotet et al. 2000
Holanda	1/3.600	Ten Kate et al. 1977
França	1/4.000	Claustres et al. 2000
Suècia	1/4.000	Kollberg et al. 1982
Estònia	1/4.500	Klaassen et al. 1998
Dinamarca	1/4.700	Nielsen et al. 1988
Itàlia	1/4.700	Bossi et al. 1999
Catalunya (Espanya)	1/5.532*	Gartner et al. 2003
Noruega	1/6.500	Eiklid et al. 1993
Finlàndia	1/25.000	Kere et al. 1994
EUA	1/1.900 - 3.700	Welsh et al. 2001
Austràlia	1/3.060 *	Wilcken et al. 1995
Sud-Àfrica	1/784 - 13.924	Padoa et al. 1999

*, dades obtingudes del criatge neonatal

Mecanismes patològics de la fibrosi quística

La disfunció de la proteïna CFTR es manifesta de forma diversa en cadascun dels òrgans on s'expressa. Aquesta resposta variable és causada, d'una banda per la funció pròpia de cada òrgan (glàndules sudorípares, pulmó, pàncrees, sistema gastrointestinal i tracte genital) i de l'altra, a les diferents activitats de la pròpia CFTR com a canal de Cl^- , regulador d'altres canals iònics (Na^+ , HCO_3^- , Cl^- , etc.) i en la resposta immune.

Malaltia pulmonar

Alteracions patològiques

Les alteracions en la expressió i funció de CFTR a l'epiteli pulmonar FQ s'associen a hipersecreció de mucositat, inflamació i infecció, processos que s'inicien molt aviat i determinen un cercle viciós amb greu obstrucció de les vies aèries que acaba produint una fallida respiratòria. El deteriorament pulmonar és el que determina la gravetat i evolució de la malaltia causant el major índex de mortalitat i morbiditat entre els afectats. La malaltia pulmonar és la que presenta major variabilitat clínica, inclús en pacients amb el mateix genotip. La interacció de factors ambientals i genètics és la causa de la difícil predicció del fenotip pulmonar (Accurso FJ. 1997).

La colonització de les vies aèries és produïda per diferents microorganismes, principalment *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* i *Burkholderia cepacia*. Probablement, un descens en la capacitat de resposta del sistema immune contribueix a la colonització bacteriana, però no explica suficientment la predominant adaptació de *P. aeruginosa*, present en més del 80% dels pacients i responsable de la pèrdua progressiva de la funció pulmonar amb greus conseqüències no equiparables a la de cap altre germen (Bauernfeind et al. 1987).

L'obstrucció de les vies aèries condueix a una hiperinsuflació pulmonar que va en augment a causa de les exacerbacions respiratòries recurrents. La constatació radiològica de bronquiectàsies (dilatacions bronquials localitzades i irreversibles) és observable en poc temps. A la FQ són, generalment, cilíndriques i amb una distribució disseminada (Cole et al. 1993).

La infecció bacteriana origina una resposta inflamatòria marcada per

l'augment de la concentració d'interleuquina-8, elastasa i neutròfils. No obstant, a la FQ s'ha observat que aquesta resposta es produeix de forma exagerada, independentment del grau d'infecció, i que es manté inclús després d'haver superat aquesta (Muhlebach et al. 2002). L'increment en la resposta inflamatòria podria ser causat per la baixa concentració de glutatió a l'epiteli pulmonar FQ. El glutatió és un important component antioxidant que protegeix l'epiteli dels radicals oxidatius. El desequilibri oxidants/antioxidants observat a la FQ podria induir l'excessiva resposta inflamatòria (Gao et al. 1999). Es discuteix quina és la seqüència del procés infecció/inflamació atès que la resposta inflamatòria apareix molt aviat en els nens afectats, suggerint que hi ha una desregulació de la inflamació (Berger et al. 2002). Els estudis de la resposta inflamatòria en ratolins *Cftr*^{-/-} infectats amb *P. aeruginosa* mostren, efectivament, que aquesta es produeix per sobre del nivell normal suggerint la intervenció de CFTR en la seva regulació (Thomas et al. 2000).

Acompanyant el procés crònic pulmonar és freqüent l'aparició de complicacions que poden agreujar l'evolució clínica com ara, sinusitis, poliposi nasal, atelectàsies, neumotòrax, hemoptisi i aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica.

Etiopatogènia

L'expressió de CFTR al pulmó no és ubíqua. Els estudis de Engelhardt i col·l. (1992, 1994) indiquen que hi ha diferents nivells d'expressió i que aquesta està molt regulada. Les cèl·lules seroses localitzades a la glàndula submucosa són les que presenten un nivell més alt de CFTR seguit, a la superfície de l'epiteli, de les cèl·lules no ciliades que envolten el conducte glandular i en menor quantitat de les cèl·lules ciliades. Per últim, s'especula si les cèl·lules caliciformes poden tenir un nivell molt baix de CFTR, no detectable però suficient per regular la secreció de mucines d'aquestes cèl·lules. Tampoc s'ha detectat expressió de CFTR a les cèl·lules sense contacte directe amb la superfície epitelial (bassals i intermitges).

L'epiteli pulmonar està cobert per una capa de moc amb dues fases ben diferenciades depenent de la seva viscositat. Una basal o periciliar on el moviment dels cilis afavoreix el transport de les secrecions i partícules adherides cap a les vies altes per a la seva eliminació (aclariment muco-ciliar) i l'altre més superficial, rica en

proteases, oxidants, mucines, anticossos i antibiòtics, que la fan més gelatinosa. Aquests components constitueixen una eficient barrera contra els patògens. Així doncs, la capa mucosa disposa de dos mecanismes innats de defensa i la seva estabilitat és indispensable per mantenir-los (Wine JJ. 1999).

A l'epiteli FQ s'ha observat un increment de fosfolípids cap a un perfil poc lubricant, així com un augment en l'expressió i secreció de mucines i DNA procedent de bacteris i cèl·lules nucleades. Tots aquests elements modifiquen la viscositat de la capa mucosa i contribueixen a la seva susceptibilitat davant les infeccions (Puchelle et al. 2002). En condicions bassals, l'epiteli pulmonar absorbeix Na^+ activament, produint l'entrada de Cl^- i H_2O . Diferents hipòtesis han intentat vincular la disfunció de CFTR amb l'inici de la infecció crònica bacteriana. El grup de M. Welsh ha observat el comportament pre i post infecció en cultius cel·lulars epitelials normals i FQ. Els treballs postulen que, en condicions normals, hi ha una absorció de sals en excés que permet mantenir la baixa concentració salina (<50 mM ClNa) de la capa mucosa, indispensable per la innata actuació de les proteïnes antimicrobianes (lisozima, lactoferrina, beta-defensines). L'absència total o parcial de CFTR inactiva l'absorció de sals i H_2O i condueix a un augment de la concentració salina, duplicant la normal i inactivant el sistema immune cel·lular (Smith et al. 1996; Zabner et al. 1998). D'altra banda, Matsui i col·l. (1998) posen l'èmfasi en l'activitat reguladora de CFTR sobre el canal de Na^+ ENaC, normalment inhibit per CFTR, i la necessitat de mantenir el volum de la capa mucosa. Aquest últim, requereix una concentració salina isotònica (± 150 mM ClNa) per portar a terme l'aclariment mucociliar. El treball en cultius cel·lulars conclou que sense l'activitat de CFTR, el transport net resultant és un augment de l'absorció de Na^+ , arrossegant el Cl^- i l' H_2O i produint la deshidratació de la capa mucosa que facilitaria la infecció. Ballard i col·l. (1999) també insisteixen en la funció reguladora d'altres canals per CFTR i demostren un descens en la secreció de HCO_3^- induïda per la inactivació de CFTR en pulmó porcí. En baixar la secreció de HCO_3^- s'origina un descens del pH de la capa mucosa, inhibint els seus mecanismes de defensa. Jayaraman i col·l. (2001) han avaluat la composició de les secrecions de les glàndules submucoses en teixit pulmonar normal i FQ procedents de trasplantaments. En contrast amb les observacions de Ballard i col·l. (1999), les seves

mesures de pH no difereixen en les secrecions normals i FQ. Així mateix, no van trobar diferències en la concentració de Na^+ . En canvi, les mesures de viscositat evidenciaren l'augment d'aquesta en el teixit FQ vers del normal, produïda per un baix contingut d' H_2O . Aquest desequilibri en la composició de les secrecions (reducció de volum amb major concentració de proteïnes) compromet el sistema innat de defensa que només pot actuar eficaçment en un medi suficientment fluid. Finalment, Worlitzsch i col·l. (2002) estudien la infecció per *P. aeruginosa* en teixit pulmonar d'afectats i donants i observen que a la FQ el bacteri creix en el compartiment intraluminal amb un entorn d'hipòxia important. La hiperactivitat del canal ENaC requereix una aportació addicional d'energia, incrementant el consum d' O_2 . El progressiu descens d' O_2 a la capa mucosa propiciaria l'inici de la colonització per *P. aeruginosa*. Aquestes hipòtesis no són excloents i demostren la complexitat dels mecanismes que motiven la malaltia pulmonar.

Insuficiència pancreàtica i afectació gastrointestinal

Alteracions patològiques

El pàncrees és una glàndula de secreció serosa localitzada al retroperitoneu. La seva funció secretora, exocrina i endocrina, està regulada per un complex sistema limfàtic i nerviós. La porció exocrina està organitzada en lòbuls formats per l'agrupació de cèl·lules acinars, acini, dels quals surt el sistema ductal o porció excretora. Les cèl·lules acinars són les responsables de la secreció enzimàtica rica en amilasa, tripsina, antitripsina, quimo i antiquimotripsina. El sistema ductal pancreàtic està format pels conductes principals, Wirsung i Santorini, interlobulars i intralobulars i consta d'una sola capa de cèl·lules epitelials amb mucosecreció apical. La producció de moc facilita el transport de la secreció i protegeix les cèl·lules dels enzims (Owen et al. 2001). El suc pancreàtic és una solució aquosa amb una àmplia dotació enzimàtica que requereix un pH alcalí, el qual s'aconsegueix amb una alta concentració de HCO_3^- secretat contra gradient i per tant, amb un important consum energètic. Intervenien, a més, altres components iònics com Na^+ , K^- i Cl^- (Marino et al. 1991). La composició del suc pancreàtic és fonamental per la digestió dels aliments, ja que d'ella depèn la hidròlisi dels nutrients.

En el pàncrees FQ s'observa un descens del volum de les secrecions acompanyat d'una baixa concentració d'enzims digestius i HCO_3^- . En aquestes condicions, els proenzims digestius són retinguts en els conductes pancreàtics on s'activen prematurament i condueixen a la destrucció i fibrosi del teixit. Els pacients presenten maldigestió de proteïnes i greixos que es manifesta per esteatorrea, pèrdua ponderal i finalment un quadre crònic de malabsorció per la insuficiència pancreàtica exocrina (IP). A la FQ el 85% dels pacients presenten IP, l'altre 15% conserva una funció residual de CFTR i presenten suficiència pancreàtica (SP) (Kopelman et al. 1985). La SP es correlaciona amb una simptomatologia menys severa i en general els pacients presenten millor funció pulmonar, diagnòstic a edat més avançada i concentració d'electròlits a la suor en un rang intermig. Entre les complicacions del grup FQ-SP s'ha descrit la pancreatitis aguda recurrent en un 2% dels pacients (Durno et al. 2002).

La presència d'ili meconial s'ha descrit en un 15% dels nounats afectats i pot ser un indicador de FQ. Recolzat per altres paràmetres clínics i/o genètics condueix a un diagnòstic precoç de la malaltia. La cronicitat de la malaltia és determinant en la aparició d'altres complicacions del sistema gastrointestinal amb una freqüència que augmenta amb l'edat del pacient i que pot oscil·lar entre el 10% i el 70%. Cal assenyalar entre d'altres: Reflux gastroesofàgic, obstrucció intestinal distal, prolapse rectal, diabetis, colelitiasi, cirrosi biliar i osteoporosi (Welsh et al. 2001).

Etiopatogènia

Estudis d'immunocitoquímica han evidenciat l'expressió de CFTR a la membrana apical de les cèl·lules del conducte pancreàtic, aportant el Cl^- necessari per activar el bescanvi $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Per tant, el CFTR té un paper clau en el transport iònic i H_2O al conducte pancreàtic, mantenint el pH alcalí essencial pel funcionament del pàncrees (Novak et al. 1988). A la FQ, la pèrdua de CFTR redueix la secreció de Cl^- i HCO_3^- ductal, resultant un suc pancreàtic menys alcalí i poc hidratat. En conseqüència, les secrecions acinars, riques en proteïnes, es fan denses, afavorint la precipitació de les proteïnes i l'obstrucció dels conductes proximals (Gray et al. 1990).

L'estudi de proteïnes mutants en cultius cel·lulars demostra que la funció reguladora de CFTR sobre el canal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ és tan important com el propi transport de Cl^- per CFTR. Mutacions associades a IP (I148T, G551D) mostren transport de Cl^- normal o reduït amb inhibició total del transport de HCO_3^- . En canvi, mutacions associades a SP (R117H, G551S) tenen un flux residual de Cl^- i conserven parcialment el transport de HCO_3^- (Choi et al. 2001). Aquests resultats recolzen que el HCO_3^- és essencial i la seva manca suficient per alterar la funció pancreàtica, independentment de la presència de CFTR total o parcialment actiu.

Infertilitat masculina i fibrosi quística

El pas a l'adolescència es dona amb cert retard entre els afectats, sent la infertilitat una característica diferencial entre els sexes. Les dones FQ tenen el sistema reproductor desenvolupat, tot i que la deshidratació del moc vaginal podria ser la causa d'una menor fertilitat (Stead et al. 1987). Molt al contrari, la infertilitat és palesa als homes, ja que el 98% presenten azoospermia obstructiva causada per agenèsia bilateral de conductes deferents (ABCD) (Denning et al. 1968).

Els estudis histològics han evidenciat alteracions anatòmiques als conductes deferents, vesícules seminals i epidídim, sense afectació de l'estructura testicular, on únicament s'observa un descens de l'espermatogènesi. L'anàlisi seminal indica azoospermia, volum reduït (< 1 ml) i descens de pH (< 7) produït per la baixa concentració de fructosa aportada per les vesícules seminals. La secreció de les vesícules seminals contribueix en un 70% al volum i alcalinitat de l'ejaculat. Als pacients FQ, l'aportació prové exclusivament de la pròstata i els seus components (citrat i fosfatasa) es troben en major concentració per la reducció del volum espermàtic (Kaplan et al. 1968).

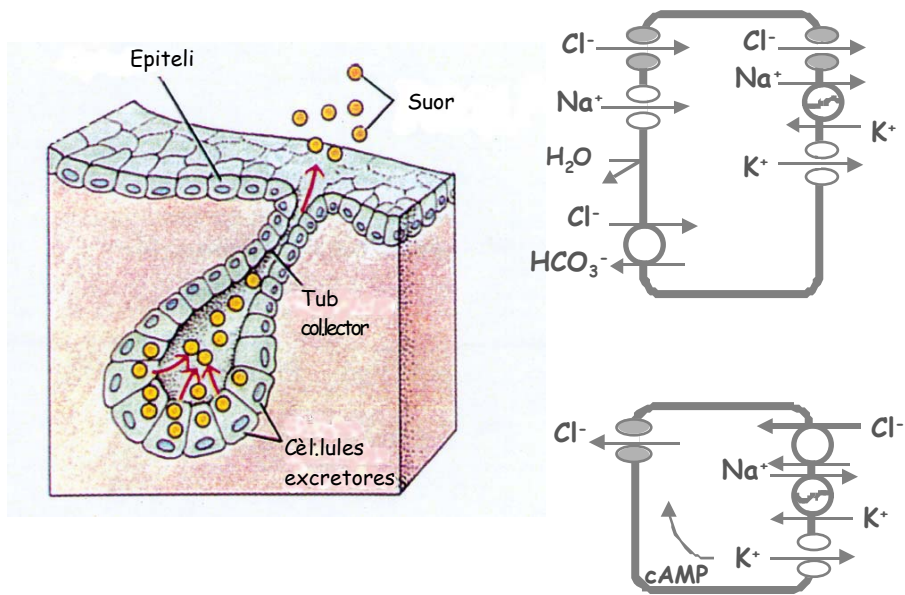
Una hipòtesi per explicar la aplàsia/hipoplàsia dels teixits és el seu origen anatòmic comú. El desenvolupament dels conductes de Wolff es produeix en les primeres setmanes de l'embrió, donant pas a dues branques, la uretral que creix cap el ronyó i la reproductora a partir de la qual es formen conducte deferent, vesícula seminal, conducte ejaculador i la regió distal de l'epidídim (Spalteholz 1969). CFTR intervé en la canalització inicial i consolidació de les estructures dels conductes de Wolff. La manca del transport iònic regulat per CFTR, conduiria a l'atròfia dels diferents teixits. Carlin i col·l. (2002) van demostrar en cèl·lules epitelials de conducte deferent porcí la secreció d'anions, Cl^- i HCO_3^- , en resposta a l'estimulació per AMPc, sent aquest transport Na^+ dependent. La recerca va permetre identificar un canal de bescanvi $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC1) a la membrana basolateral suggerint que a la llum del conducte, la regulació de HCO_3^- i el pH depenen indirectament de CFTR.

Afectació de glàndules sudorípares

Les glàndules sudorípares són les encarregades de mantenir la temperatura corporal, alliberant una solució salina, la suor, que permet baixar la temperatura. En un context clínic suggestiu de FQ, la prova de la suor és un paràmetre essencial del diagnòstic, caracteritzat per un augment de la concentració salina. Determinacions superiors a 60 mmol/L orienten vers el diagnòstic de FQ (Gibson et al. 1959).

La glàndula sudorípara està formada per un tub col·lector que finalitza a la superfície de la pell i una regió proximal excretora que llibera una solució isotònica composta, fonamentalment, per Cl^- , Na^+ i H_2O . Quan la solució arriba al tub col·lector es produeix l'absorció de Na^+ que arrossega el Cl^- sense entrada d' H_2O . El tub col·lector és impermeable a l' H_2O i aquesta surt a l'exterior produint la refrigeració del cos (Figura 1). En el pacient FQ, les cèl·lules del tub col·lector no disposen del canal CFTR per absorbir el Cl^- , aturant-se l'absorció de Na^+ i resultant una solució de concentració salina alta. Tot i tenir un elevat contingut de sal, el nivell a la suor es manté més baix de l'esperat gràcies a una segona via de reabsorció de Cl^- que fa el bescanvi $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. El HCO_3^- reacciona amb l' H^+ i forma CO_2 i H_2O . En conseqüència, la seva concentració a la suor es manté baixa, permetent que aquest mecanisme de bescanvi continuï funcionant independentment del canal CFTR (Quinton PM. 1986).

Figura 1. Glàndula sudorípara. Esquema amb el transport iònic a les cèl·lules excretores (sota) i tub col·lector (dalt).



Identificació i estructura del gen *CFTR*

Entre el gens responsables de malalties hereditàries el gen de la FQ va ser un dels primers en ser identificats. L'estratègia utilitzada és ja artesanal, atesa la recent seqüenciació del genoma. Dos factors van ser determinants en la identificació del gen *CFTR*: L'alta prevalença de la malaltia que va facilitar els estudis de lligament, i el desenvolupament de les tècniques de clonatge posicional. Els estudis de lligament genètic permeten estimar la distància entre dos *loci* i vers el *locus* de la malaltia i el gen responsable. L'anàlisi de marcadors polimòrfics del genoma va conduir a la localització d'una regió candidata al braç llarg del cromosoma 7, definint els marcadors propers al *locus* FQ (Tsui et al. 1985; Wainwright et al. 1986) i propiciant els primers diagnòstics moleculars de FQ (Beaudet et al. 1986). La informació obtinguda de famílies recombinants va delimitar la regió del *locus* FQ entre el proto-oncogen *MET* i la sonda anònima *D7S8*, establint la posició dels *loci* i una distància genètica inferior a 1 cM entre el *locus* FQ i els dos marcadors flanquejants (Law et al. 1987), *cen—COL1A2—D7S15—PON—D7S16—MET—FQ—D7S8—TCRB—tel.*

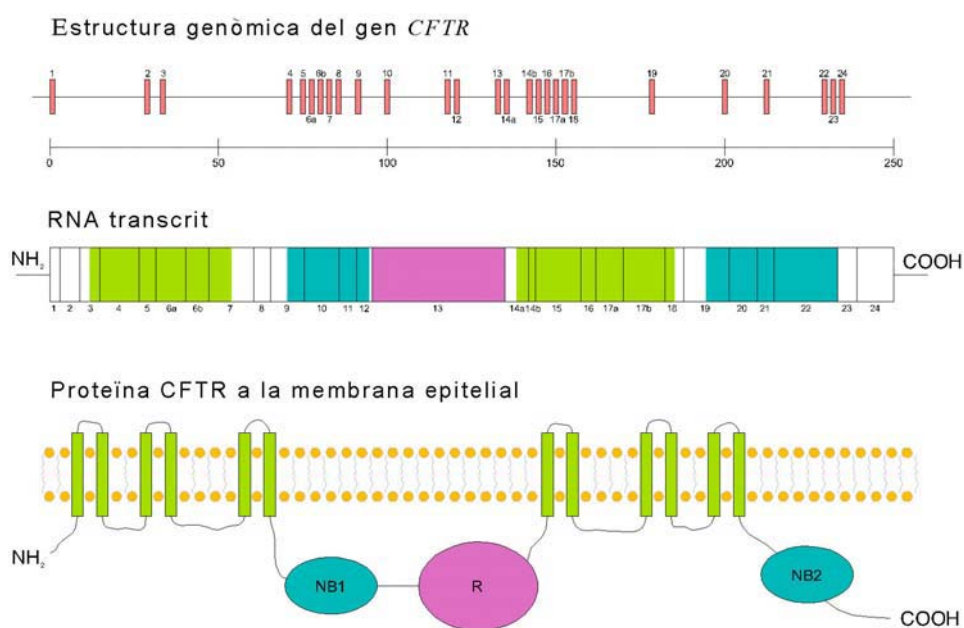
Mitjançant les tècniques de clonatge i amb la localització d'illes HTF, que habitualment es troben en la posició 5' dels gens, es van aïllar marcadors més propers: pXV-2c, pCS.7, pKM.19 i pMP6-d9. Els estudis de segregació mostraren una distribució al·lèlica no a l'atzar indicant desequilibri de lligament i la proximitat del gen (Estivill et al. 1987a, 1988, 1989). La incorporació d'aquests marcadors va millorar notablement la fiabilitat del diagnòstic molecular. Basant-se en la freqüència dels haplotips es va predir un nombre reduït de mutacions a les poblacions del Nord d'Europa, mentre que a les poblacions mediterrànies es preveia una gran heterogeneïtat (Estivill et al. 1987b, 1988).

L'anàlisi acurat de seqüències en la regió va conduir a la caracterització del gen *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (MIM#602421) i de la mutació majoritària, F508del (Rommens et al. 1989; Kerem et al. 1989). El gen *CFTR* està localitzat a la regió 7q31.2 i comprèn una seqüència genòmica de 230 kb organitzada en 27 exons (Zielenski et al. 1991a). El cDNA identifica un transcrit de 6,1 kb i 4.440 nucleòtids codificants que es tradueixen en una proteïna de 1.480

aminoàcids i pes molecular de 170 kDa (Riordan et al. 1989).

La regió promotora de *CFTR* presenta característiques estructurals similars als gens *housekeeping* (absència de motius TATA o CCAAT, alt contingut de seqüències CpG hipometilades i diferents punts d'inici de la transcripció) contràriament, la seva expressió és teixit dependent, indicant que sota l'estricta control cel·lular hi ha un complex mecanisme de regulació (Chou et al. 1991). Estudis *in vivo* de teixits humans i rosegadors demostren que *CFTR* té diferents punts específics d'inici de la transcripció. Les diferències trobades en pulmó fetal i adult humà indiquen especificitat al llarg del desenvolupament i suggereixen la seva implicació en la regulació del promotor (White et al. 1998).

Figura 2. Estructura genòmica de *CFTR*, transcrit i proteïna.



Mutacions al gen *CFTR*

La primera mutació caracteritzada va ser la deleció de l'aminoàcid fenilalanina al codó 508, F508del. La mutació es produeix per la pèrdua del triplet CTT a l'exó 10 (Kerem et al. 1989). La proteïna sintetitzada presenta una conformació anòmala, motiu pel qual és retinguda al reticle endoplasmàtic, impedit el trasllat al Complex de Golgi i a la membrana cel·lular (Cheng et al. 1990). La mutació F508del és la que presenta una major prevalença arreu del món (CFGAC, 1990). A Europa la seva freqüència al·lèlica varia entre el 21% i el 87%. Aquesta variació presenta un gradient Nord – Sud, trobant-se les freqüències més altes al Nord d'Europa amb una freqüència mitjana del 72%, sent màxima a Dinamarca (87%) i les més baixes a la conca mediterrània, on la mitjana és del 56% i la menor freqüència descrita correspon a Turquia (21%) (Estivill et al. 1997). Aquestes dades de la mutació F508del indiquen una gran heterogeneïtat molecular, principalment al Sud d'Europa. Efectivament, a finals dels anys 90 ja s'havien descrit 200 mutacions a la regió mediterrània (Estivill et al. 1997). Actualment la base de dades mundial recull més de 1000 mutacions (CFMDB). A més, l'espectre mutacional confirma l'estimació feta a partir dels haplotips definits pels marcadors amb desequilibri de lligament. Haplotips que suggerien que la malaltia era deguda principalment a una mutació, havent moltes altres menys rellevants, algunes inclús específiques d'una població.

L'anàlisi de prop de 44.000 gens evidencià que, a banda de la mutació F508del, només quatre mutacions, G542X, G551D, N1303K i W1282X, es troben representades a totes les poblacions amb freqüències superiors a l'1% (CFGAC, 1994). Altres 17 mutacions tenen freqüències entre el 0,1% i 0,9% i al menys 250 mutacions estan per sota del 0,1% a les poblacions europees (Estivill et al. 1997).

El grau d'heterogeneïtat molecular al gen *CFTR* varia en funció de la regió geogràfica i/o del grup ètnic d'origen. A la població Hutterita les mutacions F508del i M1101K representen el 100% dels gens FQ (Zielenski et al. 1993). A la població Jueva Ashkenazi, 5 mutacions identifiquen el 97% dels gens (Abeliovich et al. 1992). Altres poblacions presenten una heterogeneïtat important, com la població francesa, on s'han descrit més de 300 mutacions (Claustres et al. 2000).

Les mutacions *CFTR* són majoritàriament canvis puntuals que afecten un o pocs nucleòtids, encara que també s'han identificat grans delecions. Atès el tipus d'alteració, les mutacions es classifiquen en: Mutacions amb “error de sentit” en les quals el canvi d'un nucleòtid determina la substitució d'un aminoàcid, són les més predominants (42%). Les mutacions de “canvi de pauta” produïda per la inserció/deleció d'un o pocs nucleòtids (23%). Les mutacions d’“*splice*” que afecten la correcta eliminació dels introns (16%) i les mutacions “sense sentit” que originen un codó de terminació prematur (15%). El 4% restant són delecions o insercions de diferent tamany, que poden afectar un nombre important de nucleòtids o inclús, bona part del gen (CFMDB). La nomenclatura s'ha anat adequant al tipus de mutacions caracteritzades i es recomana el seguiment del darrer consens per la seva denominació (den Dunnen et al. 2001).

L'haplotip obtingut amb l'anàlisi de tres microsatèl·lits, IVS8CA, IVS17bTA i IVS17bCA, va permetre definir la seva distribució en gens normals i FQ. Les mutacions F508del, G542X i N1303K presentaven variacions d'un haplotip majoritari 23-31-13 (els números corresponen a les repeticions de cada *locus*) indicant un origen comú. La relació de cada mutació amb els diferents haplotips associats va donar una estimació de 50.000 anys per la mutació F508del i 34.000 anys per G542X i N1303K, assenyalant que aquestes foren les primeres mutacions en originar-se i expandir-se. (Morral et al. 1993). Per a la mutació F508del s'han trobat dos grups geogràfics genèticament distants, un comprèn la regió mediterrània (Bulgària, Albània, Itàlia, França, Espanya) i les Illes Gran Bretanya i Irlanda, on l'haplotip més comú és 23-31-13, i l'altre abraça el Centre i Nord d'Europa (Hongria, República Txeca, Eslovàquia, Alemanya, Dinamarca, Suècia i Finlàndia), on l'haplotip 17-31-13 és més freqüent. Aquesta separació suggereix que la mutació F508del es va originar en una població ancestral, anterior a la població europea actual. Posteriorment, les successives expansions haurien determinat la distribució actual (Morral et al. 1994a).

Algunes mutacions s'han identificat en regions geogràfiques definides, indicant un origen comú. La mutació *CFTR*dele2,3 (21kb), causa la deleció dels exons 2 i 3 i determina l'absència de proteïna. La deleció és freqüent a l'Europa de l'Est i Central (República Txeca, 6,4%; Rússia, 5%; Àustria, 2,6%). Tots els gens amb la deleció

presenten un mateix haplotip, indicant el seu origen únic (Dörk et al. 2000). La determinació de l'haplotip és, en aquestes situacions, una eina útil que permet seleccionar la mutació candidata i analitzar-la directament.

Es dona també la situació inversa, una mutació associada a diferents haplotips degut bé a un fenomen de mutació puntual recurrent, o bé a una recombinació gènica a la regió d'un o més marcadors. La recurrència sembla la hipòtesi més probable per les mutacions, R334W, R347P, R1162X i 3849+10kbC>T. Les quatre mutacions s'han produït en un dinucleòtid CpG, i tres d'elles en la seqüència codificant on s'han descrit altres mutacions afectant al mateix codó. Són mutacions amb poca significació a la població mundial (0,1%-0,3%) però conèixer l'associació haplotip-mutació és interessant en poblacions específiques on representen un percentatge de gens superior a l'1%: Espanya (1,1% R334W), Alemanya (1,3% R347P), Itàlia (18% R1162X) i a la població Ashkenazi (6,3% 3849+10kbC>T) (Morral et al. 1994b).

La proteïna CFTR

Per la seva estructura, la proteïna CFTR pertany a la família de transportadors ATP-Binding Cassette (transportadors ABC) (Hyde et al. 1990). Les proteïnes de transport tenen dos motius, cadascun amb un domini transmembrana (MS1 i MS2) i un domini d'unió a l'ATP (NB1 i NB2) situat al citosol. A diferència d'altres proteïnes ABC, els dos motius de la proteïna CFTR es troben units per un domini específic regulador (R) hidròfil. Així mateix, els extrems NH₂- i COOH- terminal són intracel·lulars (Riordan et al. 1989).

CFTR és un canal de Cl⁻ caracteritzat per una baixa conductància (7-10 pS) i una permeabilitat selectiva als anions seguint l'ordre Br⁻ > Cl⁻ > I⁻ > F⁻ (Anderson et al. 1991). La regulació del canal és complexa i s'inicia amb la fosforilació de serines al domini R activada per la proteïna quinasa A (PKA) dependent de AMPc. El segon pas és la unió d'ATP al domini NB1, on s'hidrolitza produint l'energia necessària per l'obertura del canal. Si el domini R està totalment fosforilat, segueix la unió ATP-NB2 que estabilitza el canal obert. La hidròlisi d'ATP al NB2 fa que novament el canal es tanqui. Mentre el domini R segueix fosforilat poden continuar els cicles d'unió i hidròlisi de l'ATP als dominis NBs i el canal s'obre i tanca regularment (Cheng et al. 1991).

S'han postulat successives hipòtesis per tal d'explicar l'engranatge necessari per a l'activació del canal. El domini R està codificat per l'exó 13 i comprèn els aminoàcids entre les posicions 509 i 830. La comparació de dominis R de diferents espècies indica que l'extrem NH₂- terminal fins el residu 650 està molt conservat i que les mutacions en aquesta regió determinen alteracions en la maduració de la proteïna, arribant a postular la seva pertinença al domini NB1 més afí a aquestes característiques (Annereau et al. 1997). L'extrem COOH- terminal del domini R, entre els residus 780 i 830, està menys conservat i conté la majoria de llocs per a la fosforilació amb PKA i PKC. Un dels primers experiments de mutagènesi alterant els punts de fosforilació entre els aminoàcids 760 i 830, indicava una contribució específica de cadascun d'ells, activant o inhibint la funció del canal (Cheng et al. 1991). Contràriament, s'ha observat que la fosforilació d'un pèptid que conté els

residus 708-831 no canvia la conformació, suggerint que aquest procés del domini R no comporta grans canvis estructurals, afectant més aviat les interaccions amb els dominis NBs, probablement augmentant l'afinitat ATP-NB (Ostedgaard et al. 2000). Posteriorment, el mateix grup va proposar que la modificació o deleció dels punts de fosforilació resultava en una obertura permanent del canal, tot i que aquesta no seria equiparable a la produïda per la proteïna salvatge. L'experiment demostra que les càrregues negatives introduïdes per la fosforilació són necessàries pel desbloqueig i activació del canal, si bé es desconeix el mecanisme exacte (Ostedgaard et al. 2001).

Els dominis NB presenten un 29% d'homologia i contenen els motius Walker A i B, a més d'una regió d'enllaç (LSGGQ), tots tres necessaris per la unió i hidròlisi de l'ATP una vegada el canal ha estat activat per la PKA. Pròpiament, l'activitat del canal s'inicia amb la unió i hidròlisi de l'ATP al NB1, mentre que la posterior unió ATP-NB2 perllonga l'estat d'activació i la hidròlisi el finalitza. Aquesta acurada regulació sembla indicar que hi ha una interacció entre ambdós NBs i que aquests controlen el consum energètic de la cèl·lula (Baukowitz et al. 1994). Ikuma i col·l. (2000) van investigar la regulació del canal CFTR per l'ATP i postulen que la unió d'ATP amb qualsevol del dominis NB és suficient per produir un canvi conformacional que obriria el canal.

Els dominis MS formen el porus del canal mitjançant dotze segments helicoidals. Estudis *in vitro* han demostrat que un pèptid amb la seqüència del domini MS1 és capaç de transportar Cl⁻ independentment de l'AMPC i l'ATP (Schwiebert et al. 1998). No obstant, a la proteïna salvatge el porus només es pot obrir després de la fosforilació del domini R i la unió i hidròlisi de l'ATP, indicant la interacció entre els dominis MS i els dominis al citosol. Quins són els punts d'interacció i com es produeix aquesta és encara un tema de debat. Un estudi previ havia suggerit que els bucles d'unio entre els segments transmembrana situats al citosol podrien contenir els punts claus d'interacció amb els dominis NBs (Seibert et al. 1996).

La producció de proteïna pot també ser regulada mitjançant *splicing* alternatiu, determinant la pèrdua o inserció d'una regió codificant. Utilitzant la transcripció inversa (RT-PCR) s'ha detectat la pèrdua de diferents exons. El transcrit alternatiu de més impacte produeix la deleció de l'exó 9, resultant una proteïna no funcional.

L'eficiència de l'*splicing* depèn del tamany d'una seqüència de timidines (5T, 7T o 9T) a l'acceptor d'*splicing* de l'intró 8. L'al·lel 5T determina el percentatge més alt de transcrits sense l'exó 9 (~90%) (Chu et al. 1993). A més, s'ha observat que aquest percentatge és variable en cada teixit (Mak et al. 1997).

La interacció de CFTR amb altres proteïnes del citosol es proposa com un altre mecanisme de regulació del canal. Proteïnes com NHE-RF (factor de regulació de bescanvi Na^+/H^+) i CAP70 (CFTR associada a la Proteïna-70) contenen dominis PDZ que s'uneixen a CFTR. La unió de dos dominis PDZ amb l'extrem COOH-terminal de CFTR s'ha postulat com la unitat necessària per activar i produir el canvi conformacional que obre CFTR. Una regulació que seria bifàsica, activant-se a baixa concentració i inhibint-se a concentració alta (Raghuram et al. 2001). Un altre grup de proteïnes vinculades a la regulació de CFTR són les syntaxines, concretament s'ha demostrat l'expressió de la syntaxina 1A als teixits epitelials i la seva unió amb l'extrem NH_2 - terminal, inhibint l'activitat de CFTR (Naren et al. 2000). Tot i no conèixer en detall la rellevància funcional, sembla que ambdós extrems de CFTR contenen senyals per a la regulació del transport mitjançant la interacció amb proteïnes del citosol.

Classes de mutacions al gen *CFTR*

Davant la complexa regulació de la proteïna CFTR, és previsible que diferents tipus d'alteracions en la seqüència nucleotídica del gen modifiquin la síntesi i/o funció de la proteïna per diferents mecanismes, depenent del tipus de canvi i del domini en el qual es produeix. Amb el suport dels estudis desenvolupats per localitzar i mesurar l'activitat d'algunes proteïnes, s'han definit sis classes de mutacions (Welsh et al. 1993; Haardt et al. 1999). La classe I inclou mutacions “sense sentit”, “canvi de pauta” o “*splicing*” (G542X, 3905insT, 621+1G>T) que donen un senyal prematur de terminació en la síntesi proteica. En conseqüència es formen transcrits inestables i/o proteïnes truncades que són degradades. Les mutacions de classe II s'associen a defectes en la maduració de la proteïna. Al procés de biosíntesi intervien xaperones (hsp70, calnexina) que interaccionen amb CFTR. Les proteïnes immadures no poden lliurar-se dels xaperones i acaben sent degradades per les proteases al reticle endoplasmàtic, excepcionalment arriben a la membrana cel·lular. Entre les mutacions d'aquest grup destaca la F508del. La sobreexpressió en línies cel·lulars permet que la proteïna F508del arribi a la membrana, encara que la seva estabilitat és molt reduïda respecte a la proteïna salvatge (Sharma et al. 2001). Les mutacions de classe III alteren la regulació del canal CFTR reduint la seva activitat (G551D, G551S). La regulació del canal depèn de la fosforilació del domini R i de la unió i hidròlisi de l'ATP als dominis NB, les mutacions que interfereixen en aquests processos integren aquest grup. La classe IV la formen les mutacions que afecten els aminoàcids situats al porus del canal, minvant la conducció iònica (R117H, R334W, R347P). Són mutacions amb “error de sentit” que es troben als dominis MS i, generalment, estan associades a un fenotip lleu. Les mutacions de classe V determinen una disminució en la síntesi de proteïna. La majoria són mutacions que afecten l'*splicing* (2789+5G>A, 3849+10kbC>T, 5T). En aquestes mutacions, l'*splicing* normal no és totalment anul·lat i per tant es produeix una quantitat reduïda de CFTR funcional. Les mutacions de classe VI són les que afecten l'activitat reguladora del CFTR vers altres canals iònics (ENaC, ORCC). Inclou mutacions amb “error de sentit” i també mutacions “sense sentit” i “canvi de pauta” que determinen la pèrdua de l'extrem

COOH- terminal (Q1412X, 4279insA). En general, les mutacions de classe I i II ocasionen un fenotip greu FQ-IP, mentre que les mutacions de classe III-VI s'associen a una àmplia variabilitat clínica. Forçosament, la classificació és flexible i així, una mutació que afecti la funció normal de la proteïna per diferents mecanismes pot estar indistintament en més d'una classe. La mutació G551D malmet tan l'activació de CFTR com la regulació d'altres canals (ORCC i $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) i en conseqüència pertany a les classes III i VI.

Funcions de la proteïna CFTR

És palès que CFTR és un component fonamental per a la permeabilitat iònica de les cèl·lules epitelials. La disfunció total o parcial del canal modifica la composició de les secrecions, augmentant la viscositat i desencadenant els processos patològics i l'atròfia dels teixits. A banda del flux de Cl^- , la manca de CFTR afecta als canals que depenen de la seva regulació, principalment al canal ENaC, el bescanviador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ i també altres implicats en el transport de Cl^- (ORCC), K^+ (ROMK2) i Ca^{2+} (CaCC).

S'han abordat diferents estratègies per tal d'esbrinar els mecanismes que regulen l'electrofisiologia cel·lular. Alguns experiments suggereixen que altres molècules intervenen en la interacció dels diferents canals. No obstant, la majoria d'aquests treballs inclouen transportadors i models d'altres espècies (ratolí, porc) i l'extrapolació a cèl·lules humanes podria no ser directa (Ismailov et al. 1997).

Els estudis de proteïnes mutants senyalen que el domini NB1 participa, directa o indirectament, en aquesta regulació. L'assaig en línies cel·lulars i oòcits de *Xenopus laevis* de les proteïnes A455E i G551D indica que mentre ambdues proteïnes mantenen una activitat residual de CFTR, només la A455E conserva la funció reguladora del canal ORCC, el qual és responsable del nivell extracel·lular de Cl^- (Fulmer et al. 1995).

S'ha observat que la regulació de CFTR és específica de teixit. En absència de CFTR, l'absorció de Na^+ és inhibida a les glàndules sudorípares, en canvi s'incrementa a l'epiteli pulmonar, suggerint la presència d'altres factors moduladors també específics (Reddy et al. 1999).

Així mateix, s'especula si CFTR controla la presència d'ATP extracel·lular. L'activació de CFTR en cèl·lules epitelials evidencia la conducció de Cl⁻ i ATP, la qual desapareix quan CFTR és inhibit (Cantiello et al. 1998). La via d'alliberament d'ATP podria ser el mateix CFTR o un altre canal sota el seu control. El treball de Bodas i col·l. (2000) en oòcits de *Xenopus laevis* recolza una segona via per la conducció d'ATP. L'estudi identifica la proteïna de membrana CD39 com el canal permeable a l'ATP i deixa a CFTR un paper regulador secundari.

D'altra banda, el canal CFTR es troba als orgànuls intracel·lulars, on controla el pH, un paràmetre fonamental en el procés de glicosilació de les proteïnes (Biwersi et al. 1994).

Per últim, recentment s'ha demostrat la presència de dímers CFTR a la membrana cel·lular (Ramjeesingh et al. 2003). S'especula si les proteïnes NHE-RF i CAP70 amb dominis PDZ que interaccionen amb l'extrem COOH- terminal de CFTR, també serien el nexa d'unió entre dues molècules CFTR. Com interaccionen diferents proteïnes, on es produeix l'enllaç, quina és la funció dels dímers CFTR i com aquesta es veu afectada per la formació de dímers salvatge-mutant són qüestions que han obert noves línies d'investigació.

A més de la seva responsabilitat en la electrofisiologia cel·lular, s'atribueix a CFTR un paper en l'immunitat de la cèl·lula. Pier i col·l. (1997) van descobrir en cultius cel·lulars de pulmó humans i rosegadors que el primer domini extracel·lular de CFTR és capaç d'absorbir, mitjançant endocitosi, gèrmens com *Pseudomonas aeruginosa*. Al tracte gastrointestinal, la mateixa regió s'uneix al bacteri *Salmonella enterica Typhi*. Els autors postulen que l'individu portador d'una mutació, en tenir menys proteïna CFTR, està millor protegit contra la febre tifoidea (Pier et al. 1998). Ambdós estudis recolzen que CFTR forma part del sistema immune i contribueix activament a la resistència vers les infeccions.

Diagnòstic molecular de fibrosi quística

L'anàlisi mutacional del gen *CFTR* ha permès caracteritzar més de 1.000 mutacions (CFMDB) i definir l'heterogeneïtat molecular a cada població i/o grup ètnic. Aquesta heterogeneïtat molecular és fonamental a l'hora d'establir l'estratègia més idònia a cada població. En els darrers anys, l'anàlisi de mutacions freqüents s'ha fet fàcilment abordable mitjançant equips comercials que posen a l'abast la tecnologia necessària per a la detecció simultània de mutacions, en nombre que pot oscil·lar de 12 a 31. El nivell de detecció assolit a cada població depèn de la freqüència de les mutacions analitzades i pot variar entre el 90%, en poblacions amb baixa heterogeneïtat, i el 70% en poblacions més heterogènies. En aquest rang, al menys un 50% dels pacients seran totalment caracteritzats. Les restants mutacions són, en general, específiques d'una població i de vegades només s'han identificat en un únic pacient. Tanmateix, a la majoria de poblacions, l'heterogeneïtat és suficientment alta com per justificar el cribatge del gen. Les tècniques de cribatge permeten detectar les regions del gen que contenen una alteració de la seqüència i procedir a caracteritzar-la. Amb la seva aplicació, la sensibilitat de l'anàlisi molecular augmenta per sobre del 95%.

Alternativament, l'anàlisi de marcadors intragènics és una eina de gran utilitat que permet diferenciar els gens i aporta la informació necessària per l'anàlisi de lligament. Qualsevol marcador informatiu és útil, amb tot, els més idonis per la seva capacitat informativa són els microsatèl·lits (repeticions de dinucleòtids), dels quals se n'han descrit quatre al gen *CFTR*, IVS1CA, IVS8CA, IVS17bTA i IVS17bCA (Moulin et al. 1997; Morral et al. 1991; Zielenski et al. 1991b). Ja s'ha esmentat prèviament que l'associació específica mutació-haplotip pot facilitar la identificació d'aquesta. L'haplotip 16-46-13 (al·lels dels microsatèl·lits IVS8CA, IVS17bTA i IVS17bCA) està estretament lligat a les mutacions 1811+1.6kbA>G i E92K (Morral et al. 1993).

Malgrat les tècniques disponibles, un 3-5% dels gens FQ no arriben a ser caracteritzats. L'explicació més probable és que la mutació es localitzi en una regió no codificant, que per la seva extensió són difícilment abordables, o bé que es tracti de

delecions/insercions de gran tamany només detectables emprant tècniques més sofisticades (*Southern blot*, camps pulsants, etc.).

La indicació per a un estudi genètic inclou pacients amb diagnòstic de FQ o amb sospita clínica de FQ, pacients amb història familiar i nadons amb resultat positiu al criatge neonatal i/o ili meconial. El diagnòstic molecular possibilita l'assessorament genètic del pacient i els familiars, als quals es pot oferir detecció de portadors i diagnòstic prenatal.

Detecció de portadors

S'aconsella als individus adults amb història familiar de FQ que determina un risc *a priori* superior al de la població general (1/25-30). La capacitat diagnòstica en la detecció de portadors depèn de la informació genètica disponible; per tant, quan és factible, el pas previ és la caracterització molecular del cas índex. Si aquesta no és possible, es recomana l'anàlisi de les mutacions freqüents a la població. Un resultat negatiu condueix a una nova estimació del risc i en cap cas descarta totalment l'*status* de portador (Dequeker et al. 2000).

No es recomana la detecció de portadors a la població general, ja que pot plantejar problemes ètics importants. En primer lloc, per ser efectiva la detecció de portadors hauria de garantir un nivell de detecció alt en un temps raonable, el que és difícil d'aconseguir en poblacions molt heterogènies. A més, cal considerar els aspectes ètics, psicològics i econòmics que comporta. Alguns països amb baixa heterogeneïtat molecular ja han iniciat programes de detecció de portadors a nivell de població general. A curt termini, les noves tecnologies moleculars amb equips de seqüenciadors multicanals i xips de DNA permetran assolir el diagnòstic d'afectats i portadors en un temps i cost raonables.

Diagnòstic prenatal

La FQ és una malaltia autosòmica recessiva. Inherent a aquesta condició, els pares d'un afectat FQ es consideren portadors obligats amb un risc de recurrència del 25% en cada embaràs.

El diagnòstic prenatal està indicat quan ambdós progenitors són portadors d'una mutació, significant un risc alt de FQ a la descendència (1/4). Un segon grup de menor risc, són les parelles en les quals un membre és portador i l'altre pertany a la població general amb un risc, *a priori*, de ser portador de 1/25-30. Per aquest grup, el risc d'un fill afectat s'estima en 1/100-120. Per tal de reduir el risc, s'aconsella l'anàlisi de mutacions freqüents a l'altre membre de la parella. L'estimació final de risc (R) depèn de la freqüència de portadors (q) i de la sensibilitat de l'anàlisi (S) a la seva població, aplicant la fórmula $R = q(1-S)$. Una sensibilitat del 80% permet disminuir el risc de portador fins a 1/125-150, el que significa un risc de FQ al fetus inferior a 1/500, cinc vegades menys que el risc inicial (Dequeker et al. 2000). Si malgrat el baix risc, la parella sol·licita diagnòstic prenatal, s'aconsella la determinació d'enzims intestinals (γ -glutamiltanspeptidasa, fosfatasa alcalina) en una mostra de líquid amniòtic obtinguda a les 17-18 setmanes de gestació (Carbarns et al. 1983) a fi de complementar el diagnòstic molecular. Excepcionalment, països amb una alta incidència de FQ i baixa heterogeneïtat molecular ofereixen assessorament genètic i anàlisi molecular a totes les parelles que projecten o esperen un fill, independentment de si tenen o no història familiar de FQ.

A més, l'anàlisi mutacional està indicat en l'observació ecogràfica de hiperrefringència intestinal fetal, tot i no haver antecedents familiars. Encara que aquesta troballa no és específica, aproximadament un 3% dels casos són deguts a FQ (Muller et al. 1998).

Correlació genotip-fenotip

En conseqüència a l'àmplia heterogeneïtat molecular, la FQ es caracteritza per una gran variabilitat clínica en funció dels teixits afectats (glàndules sudorípares, pulmó, pàncrees, intestí i tracte genital), la gravetat i l'evolució de la malaltia. Per tant, el diagnòstic clínic del pacient es pot produir al llarg de la vida, sovint als primers mesos i/o anys, però també en l'adolescència i l'edat adulta, invalidant l'etiqueta de "malaltia infantil". En general, la presentació clínica en l'adult és lleu i es classifica de "FQ atípica". El diagnòstic de FQ, típica o atípica, ha de complir els criteris establerts per la "Cystic Fibrosis Foundation", el qual inclou una o més manifestacions clíniques i/o història familiar i/o cribatge neonatal positiu i a més, constatació de l'alteració electrofisiològica (test de la suor, diferència de potencial nasal) i/o dues mutacions causants de FQ (Rosenstein et al. 1998). El quadre clínic compatible amb el diagnòstic de FQ i les característiques de les mutacions responsables es presenten a les Taules 2 i 3.

Un dels paràmetres més freqüentment associat a FQ és la IP present al 85% dels pacients. Els estudis de correlació genotip-fenotip indiquen que dues mutacions greus (F508del, G542X, 621+1G>T) amb pèrdua total de funció del CFTR determinen un fenotip FQ-IP, mentre que genotips amb al menys una mutació lleu (R117H, R347P, A455E) conserven una funció residual de CFTR donant un fenotip FQ-SP. En general, el fenotip FQ-SP té millor pronòstic, atès que els pacients presenten un diagnòstic tardà, concentració d'electròlits en un rang intermig, funció pulmonar declinant lentament, millor estat nutricional i supervivència que els FQ-IP (Kristidis et al. 1992; De Braekeleer et al. 1997).

La infertilitat masculina afecta quasi el 100% dels pacients FQ, sense cap associació específica a una mutació. Aquesta inespecificitat es dona també a l'inversa. La mutació 3849+10kbC>T s'ha trobat associada a fenotip infèrtil i fèrtil, suggerint que depenent de l'eficiència de l'*splicing* es pot produir suficient nivell de proteïna per preservar l'estructura del tracte genital (Highsmith et al. 1994).

Molt al contrari, la correlació del genotip amb l'afectació respiratòria és baixa i difícilment predictable, inclús per les mutacions lleus amb una bona evolució

pulmonar. Sens dubte, la influència de factors ambientals, als quals l'aparell respiratori és més susceptible, contribueix a la malaltia pulmonar. Les mutacions clarament associades a afectació pulmonar lleu, A455E i L206W, són excepcionals (Gan et al. 1995; Desgeorges et al. 1995).

El test de la suor alterat és també característic dels pacients FQ. La concentració alta d'electròlits es considera prova diagnòstica positiva. No obstant, alguns pacients amb fenotip FQ presenten determinacions en el rang normal. Quan el test de la suor no té poder diagnòstic, la diferència de potencial nasal (DPN) ofereix millor sensibilitat i especificitat (Knowles et al. 1981). La mesura de DP en mostres de biòpsia rectal estimulades per afavorir la secreció de Cl⁻ indiquen una bona correlació entre l'alteració electrofisiològica i els diferents fenotips, sent la secreció de Cl⁻ positiva al grup control i negativa al grup de pacients FQ. Valors al rang intermig indiquen flux residual de Cl⁻ i estan associats a fenotips FQ-SP (Veeze et al. 1994).

Taula 2. Manifestacions clíniques a la fibrosi quística

- Malaltia sino-pulmonar crònica:
 - Infecció/colonització persistent per gèrmens habituals a FQ
 - Tos crònica i expectoració
 - Anomalies radiològiques (bronquiectàsies, atelectàsies, infiltrats pulmonars)
 - Obstrucció de les vies aèries
 - Poliposi nasal
 - Alteracions nutricionals i gastrointestinals:
 - Intestí: ili meconial, síndrome d'obstrucció distal intestinal, prolapse rectal
 - Pàncrees: insuficiència pancreàtica, pancreatitis recurrent
 - Fetge: hepatitis crònica
 - Nutrició: Retard del creixement, hipoproteïnèmia, avitaminosi
 - Pèrdua salina aguda, alcalosi metabòlica crònica
 - Azoospermia obstructiva (ABCD)
-

Taula 3. Criteris per les mutacions responsables de FQ

-
- Afectar greument la síntesi i/o funció de la proteïna CFTR
 - Introduir un senyal prematur d'aturada
 - Alterar la seqüència *consensus* d'*splicing*
 - Causar un canvi d'aminoàcid que no és detectable en 100 gens normals de portadors FQ del mateix grup ètnic
-

Els estudis de correlació genotip-fenotip senyalen que el curs clínic depèn del tipus de mutació, de la seva posició al gen i de les conseqüències estructurals i funcionals que comporta. Aproximadament un 50% dels pacients FQ presenten un genotip amb la mutació F508del en homocigosi (CFGAC, 1994). Aquest genotip s'associa a un quadre clínic de FQ greu, on les manifestacions característiques, malaltia pulmonar, IP, infertilitat i alta concentració d'electròlits a la suor, apareixen durant els primers mesos de vida (Kerem et al. 1990a). Mutacions “sense sentit” (G542X, R553X, W1282X) i “canvi de pauta” (1609delCA, 1949del84, 2183AA>G) que produeixen proteïnes truncades determinen un fenotip similar al F508del homocigot (Kristidis et al. 1992; Chillón et al. 1992; Nunes et al. 1992; Kilinc et al. 2000).

Les mutacions amb “error de sentit” constitueixen el grup més nombrós (> 500) al gen *CFTR* (CFMDB). Els canvis d'aminoàcid proporcionen informació de la importància de la substitució i de la funció del domini on es troben. Aquestes mutacions s'associen a un ampli espectre fenotípic, des d'una clínica greu (N1303K, G551D) (Osborne et al. 1992; Hamosh et al. 1992), fins a una simptomatologia lleu (P205S, E92K) (Chillón et al. 1993; Nunes et al. 1993).

La majoria de mutacions que alteren l'*splicing* del gen *CFTR* produeixen transcrits normals i aberrants, causant un nivell insuficient de proteïna que portarà al desenvolupament de la malaltia. El fenotip de molts pacients que tenen mutacions a les seqüències *consensus* AG/GT de *splice* (1717-1G>T, 621+1G>T) és el d'una FQ

greu, on la manca de proteïna és causada per la pèrdua de l'exó adjacent (Kristidis et al. 1992). Fora de la regió *consensus*, un *splicing* alternatiu competeix amb el normal; si el nivell de proteïna anòmala és suficientment baix produirà un fenotip FQ lleu (3272-26A>G) (Amaral et al. 2001). En canvi, per la mutació 3849+10kbC>T, el quadre clínic dels pacients és variable. La quantificació de transcrits aberrants indica una bona correlació amb el grau de malaltia pulmonar, però no amb el nivell d'electròlits a la suor, l'*status* pancreàtic o l'edat. Els resultats s'atribueixen a la inestabilitat dels transcrits aberrants i a factors d'*splicing* específics que modifiquen el percentatge de proteïna CFTR a cada teixit (Chiba-Falek et al. 1998).

Sovint, la correlació genotip-fenotip ha aportat certa inconsistència, inclús en aquelles mutacions associades a una FQ típica. Diferències en la gravetat clínica de pacients amb idèntic genotip, alguns dintre d'una mateixa família (R334W, G85E) (Estivill. et al. 1995; Vázquez et al. 1996) suggereixen la intervenció d'altres factors. A més dels factors ambientals, el perfil genètic individual influeix significativament en el fenotip. Variacions de seqüència del propi gen *CFTR* que han estat considerades polimorfismes sense expressió fenotípica al coincidir amb un altre canvi formen al·lels complexes que poden millorar (-102T>A + S549R) o empitjorar (G576A + R668C) l'efecte de la mutació principal (Romey et al. 1999; Pagani et al. 2003).

La cerca de gens modificadors en altres *loci* ha portat a l'anàlisi de dues regions candidates. La regió 19q13 es va localitzar a partir del model murí *Cftr*^{-/-} (Rozmahel et al. 1996). L'anàlisi de marcadors en parelles de germans concordants i discordants per la presència d'ili meconial ha permès acotar una regió de 3 Mb que correlaciona amb el fenotip digestiu (Zielenski et al. 1999). Un segon estudi comprèn la regió 7q31. S'han definit 3 grups de pacients, concordants amb fenotip greu, condordants amb fenotip lleu i discordants. La regió analitzada flanqueja el gen *CFTR* i proposa el gen *LEP* com candidat a modificar el fenotip FQ. El gen *LEP* està relacionat amb la resposta inflamatòria i l'*status* nutricional (Mekus et al. 2003).

Altres fenotips relacionats amb el gen *CFTR*

L'ampli espectre molecular del gen *CFTR*, amb mutacions que retenen part de la funció de la proteïna, permet especular sobre una possible associació entre *CFTR* i altres fenotips, ja sigui amb un paper clarament causal de la malaltia o alternativament, com un factor de predisposició. Aquesta hipòtesi ha portat a l'estudi de malalties monosistèmiques d'etiologia desconeguda i amb una manifestació clínica característica de FQ. El cas més rellevant i inicial d'aquesta cadena d'associacions amb *CFTR* fou l'agenèsia bilateral de conductes deferents (ABCD). La transcendència dels resultats va obrir noves línies d'investigació dirigides a un ampli grup de patologies, bronquiectàsies disseminades (Pignatti et al. 1995), pancreatitis crònica (Cohn et al. 1998), asma (Lázaro et al. 1999), rinosinusitis crònica (Wang et al. 2000), sarcoidosi (Bombieri et al. 2000), aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica (Marchand et al. 2001) i colangitis esclerosant (Sheth et al. 2003).

L'ABCD representa el 1-2% de la infertilitat masculina (Jequier et al. 1985) i és comú a gairebé la totalitat dels homes FQ. Un possible lligam entre ambdós fenotips, va ser suggerit per Holsclaw i col·l. (1971). L'anàlisi mutacional evidencià una alta freqüència de mutacions (64%) al gen *CFTR* i es va postular l'ABCD com una forma reproductiva de FQ (Anguiano et al. 1992). Posteriorment, es va establir una notable associació entre el fenotip ABCD i l'al·lel 5T (Chillón et al. 1995). L'al·lel 5T es troba en una seqüència variable de timidines (5T, 7T i 9T) a l'acceptor d'*splicing* de l'intró 8, depenent de l'eficiència de l'*splicing* es produeix la pèrdua de l'exó 9. Com més petita és la seqüència, menys eficient és l'*splicing* i més alt el percentatge de transcrits sense l'exó 9, disminuint la síntesi de proteïna. En pacients homocigots per l'al·lel 5T, el nivell de proteïna podria estar reduït fins a un 10% (Chu et al. 1993).

L'àmplia varietat de fenotips associats a la variant 5T (normal, portador fèrtil, ABCD, FQ) evidència que altres factors interaccionen en el desenvolupament del fenotip. La influència d'un determinat haplotip *CFTR* (polivariant) s'ha proposat per explicar la diferent penetrància de la variant 5T. Estudis funcionals i de correlació genotip-fenotip recolzen que la penetrància depèn de la combinació al·lèlica (TG)m-5T-M470V (Cuppens et al. 1998; Niksic et al. 1999). La regió polimòrfica (TG)m

presenta un número variable de repeticions del dinucleòtid TG (9-13 repeticions) a l'extrem 5' de la regió (T)_n (Chu et al. 1991). El polimorfisme M470V està localitzat a l'exó 10, un canvi de nucleòtid, adenina per guanina, origina la substitució de l'aminoàcid metionina per valina al codó 470 (Kerem et al. 1990b). L'estudi funcional de M470 i V470 evidencia que la proteïna amb valina és menys funcional (Cuppens et al. 1998). L'haplotip 12TG-5T-V470 és el més freqüent en pacients ABCD, mentre que l'haplotip 13TG-5T-V470 s'ha identificat en pacients FQ. Els haplotips que causen expressió fenotípica es troben molt rarament en el fenotip normal (Arduino et al. 1999).

Així mateix, la regió (T)_n pot influir en la penetrància d'altres mutacions causant una expressió fenotípica variable. L'estudi de Kieseewetter i col·l. (1993) senyala que la variable penetrància de la mutació R117H depèn de l'al·lel present a la regió (T)_n, sent l'al·lel complex R117H-7T característic del fenotip ABCD, i l'al·lel R117H-5T responsable d'un fenotip FQ lleu.

Cap dels estudis realitzats en diferents fenotips ha permès identificar una especificitat similar ni en relació a l'al·lel 5T ni amb cap altra mutació. De fet, una associació com l'existent entre l'ABCD i la variant 5T ha estat descartada en tots els altres fenotips, en els quals la freqüència de l'al·lel 5T és similar a la població general. D'altra banda, els estudis evidencien una relativa alta freqüència de mutacions amb un espectre predominant de mutacions amb "error de sentit". Als fenotips esmentats destaquen, 37% en bronquiectàsies disseminades (Pignatti et al. 1995), 37% en pancreatitis crònica (Cohn et al. 1998), 15% en asma (Lázaro et al. 1999), 7% en rinosinusitis crònica (Wang et al. 2000), 30% en sarcoidosi (Bombieri et al. 2000), 28% en aspergil·losi broncopulmonar al·lèrgica (Marchand et al. 2001) i 37% en colangitis esclerosant (Sheth et al. 2003).

Els estudis d'asma (Lázaro et al. 1999) i rinosinusitis crònica (Wang et al. 2000) postulen que polimorfismes sense expressió fenotípica poden contribuir a una clínica lleu. A diferència dels al·lells complexos en posició *cis*, la proposta planteja la interacció de mutació i polimorfisme quan es troben un a cada gen (posició *trans*). En ambdós fenotips, el polimorfisme M470V presenta una distribució diferent al grup control, amb predomini de l'al·lel M470. Els autors postulen que un genotip CFTR /

M470 podria donar expressió fenotípica, en aquest cas produïda per una hiperfunció de CFTR a l'epiteli respiratori.

La detecció de mutacions poc comuns, per les quals és complicat predir el tipus de disfunció que ocasionen, impedeix l'aprovació d'uns criteris d'actuació i manté una certa reserva a l'espera de resultats que aportin claredat en aquesta direcció.

La recerca en els diferents àmbits ha generat molta informació de la malaltia i les diferents formes de manifestació clínica. El seguiment de pacients en unitats específiques i les noves teràpies a l'abast permeten un tractament precoç que persegueix la millor qualitat de vida dels pacients. El conjunt d'aquests factors a millorat l'expectativa de vida que s'ha vist duplicada en els darrers anys, amb una estimació de 40 anys pels nascuts al 1990 (Elborn et al. 1991). Malgrat la seva inesperada complexitat, els avanços tecnològics i la recerca continuada mantenen l'esperança de trobar teràpies més definitives.