

CFTR: del gen a la proteína

TERESA CASALS SENENT

Introducción

El término "fibrosis quística de páncreas" y la evidencia de que esta patología es de origen genético y herencia recesiva se reconocieron en la primera mitad del siglo XX^{1,2}. Sin embargo, la genética incipiente de la época retrasó más de cuarenta años el descubrimiento del gen causante de la enfermedad. Los primeros diagnósticos moleculares, utilizando marcadores polimórficos en la región candidata del cromosoma 7, se iniciaron en 1985³ y finalmente, el hallazgo del gen CFTR fue publicado en 1989⁴. Como refleja la presente monografía, la complejidad de esta enfermedad monogénica no ha hecho más que aumentar en los últimos veinte años, dando paso a numerosas líneas de investigación relacionadas con su fisiopatología, diagnóstico y terapéutica.

EL GEN CFTR Caracterización y estructura

Los estudios de ligamiento genético acotaron en el brazo largo del cromosoma 7 la región con mayor pro-

babilidad de contener el gen responsable de la fibrosis quística (FQ; MIM #219700). En esta región candidata se identificaron los primeros marcadores con desequilibrio de ligamiento, indicando una asociación con la enfermedad y abriendo la posibilidad del análisis molecular para las familias⁵.

Utilizando técnicas que hoy consideramos pura artesanía molecular, finalmente, el clonaje posicional (*walking and jumping*) condujo a la caracterización del gen CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; *ABCC7*; MIM# 602421) en la región 7q31.2⁴. Su secuencia genómica abarca 190kb y está organizada en 27 exones o secuencias codificantes. El proceso de biosíntesis de la proteína se lleva a cabo en dos etapas consecutivas (Figura 1). La transcripción, en la cual se produce una reducción importante de tamaño eliminando los intrones o secuencias no codificantes. Este transcrito o molécula de RNA mide 6,1kb y contiene 4.400 nucleótidos. En la segunda fase, la información del RNA es "traducida" por tripletes incorporando los aminoácidos a la cadena polipeptídica. La proteína CFTR contiene 1.480 aminoácidos y su peso molecular es de 170kDa⁴.

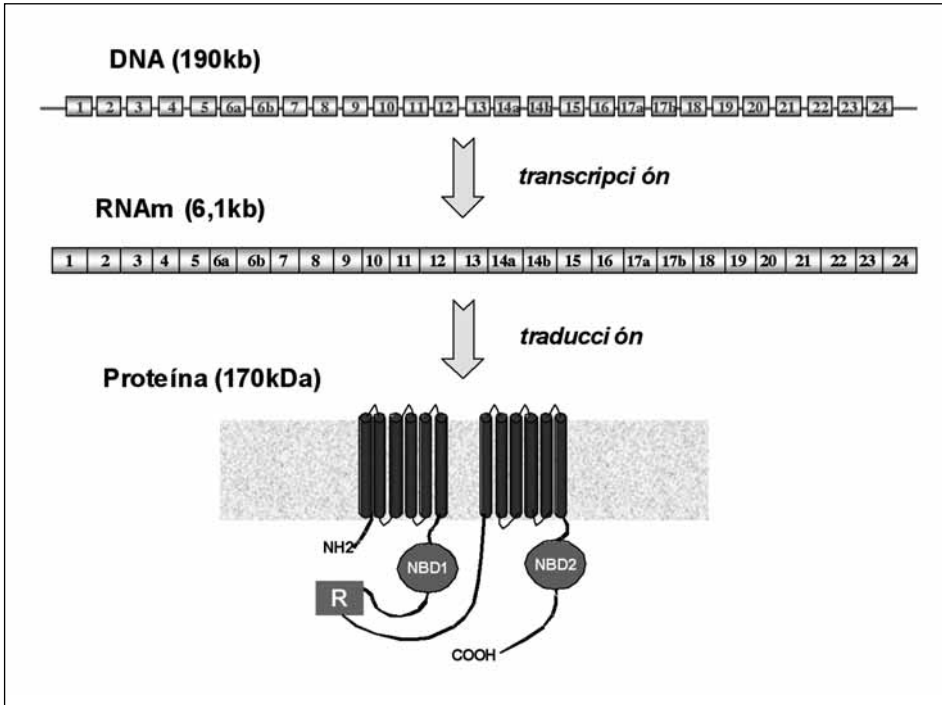


Figura 1. Biosíntesis de la proteína CFTR y localización en la membrana celular. Transcripción: proceso en el cual la molécula de DNA elimina los intrones, quedando unidas las regiones codificantes o exones. El RNAm (RNA mensajero) sale del núcleo para sintetizar la proteína. Traducción: síntesis del polipéptido en el retículo endoplasmático. Tras el proceso de maduración, la proteína glicosilada alcanza la membrana celular.

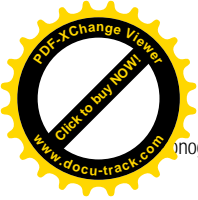
Diversos trabajos han evidenciado que la expresión de *CFTR* se encuentra estrictamente regulada. El análisis de la región promotora ha conducido a la identificación de diferentes puntos "open reading frame" (inicio de transcripción) y a un complicado mecanismo de regulación, características que determinan su expresión tejido dependiente y la especificidad observada a lo largo del desarrollo⁷.

Mutaciones *CFTR* y métodos de detección

La nomenclatura de las mutaciones señala el tipo de alteración y su posición en el gen o la proteína. En el

periodo 1989-2008 se han documentado 1.600 mutaciones en el Consorcio de Análisis Genético de Fibrosis Quística (CFGAC)⁸.

Entre las mutaciones *CFTR* predominan las alteraciones puntuales que afectan a uno o pocos nucleótidos. Las mutaciones "error de sentido" (*missense*) introducen el cambio de un nucleótido que determina a su vez la sustitución de un aminoácido. Por ejemplo, la mutación L206W en la cual el triptófano ocupa la posición de la leucina en el codón 206. Estas mutaciones representan un 41% del total y son el grupo más numeroso. Las mutaciones "cambio de pauta" (*frameshift*) se deben a la inserción/delección de uno o pocos nucleótidos y generan una proteína truncada. La mutación 1609delCA indica la pérdida de dos bases,



citocina y adenina. Un 16% de las mutaciones *CFTR* son de este tipo. Si la pérdida o inserción de nucleótidos es múltiplo de tres no repercute sobre la pauta de lectura (*in frame*). Este grupo incluye la mutación F508del y representa un 2%. Las mutaciones que modifican las señales de definición del exón (*splicing*) producen proteínas inestables de distinto tamaño, ya sea por la incorporación de una secuencia no codificante como ocurre en la mutación 1811+1,6kbA>G que añade 16 aminoácidos a la proteína; o bien por la eliminación de una secuencia codificante, como la pérdida del exón 5 en la mutación 711+1G>T. Un 13% de las mutaciones *CFTR* afectan las señales para el correcto *splicing*. Otro 10% corresponde a mutaciones "sin sentido" (*nonsense*) en las que el cambio de nucleótido origina un triplete de terminación. Esta señal prematura de parada interrumpe la síntesis de la proteína y se reconoce por la letra "X" en su nomenclatura (Q890X). La estadística del CF-GAC también contabiliza las mutaciones con una frecuencia superior al 1% y que se han encontrado, indistintamente, en pacientes y en población sana. A priori, a estas mutaciones que representan un 15% del total, no se les atribuye expresión clínica.

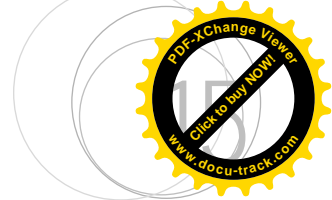
Aunque se han impuesto los *kits* comerciales para el análisis de mutaciones prevalentes, la mayoría de mutaciones puntuales se detectan utilizando técnicas de rastreo. Estas técnicas son sensibles a las pequeñas variaciones de una secuencia que modifican su movilidad en un campo eléctrico. Los laboratorios disponen de una amplia gama, desde las clásicas, electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) o conformación polimórfica de la cadena sencilla (SSCP), a la cromatografía líquida de alta presión desnaturalizante (dHPLC) o la secuenciación completa del gen⁹. El uso de estas técnicas ha permitido, en la mayoría de poblaciones, niveles de detección superiores al 90%. Sin embargo, solo excepcionalmente, se ha alcanzado el 100%.

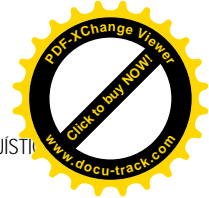
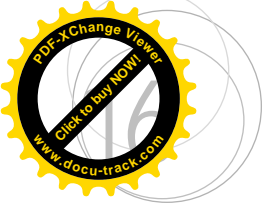
El desarrollo de nuevas técnicas cuantitativas capaces de determinar el número de copias de una secuencia determinada, ha conducido a la caracterización de

grandes deleciones e inserciones/duplicaciones. Con estas técnicas se analizan las regiones codificantes, ya sea de forma simultánea (amplificación múltiple y ligación de sonda, MLPA), o en grupos seriados (PCR múltiple cuantitativa, QMP; PCR cuantitativa a tiempo real, *real time*-PCR)⁹. En el gen *CFTR* su aplicación ha dado buenos resultados, con un porcentaje de deleciones/inserciones que ya se aproxima al 3%⁸. Estos reordenamientos pueden afectar desde un exón o fracción del mismo hasta la secuencia completa del gen. La mayor dificultad radica en determinar los puntos de rotura que, generalmente, se encuentran en las largas regiones intrónicas. La deleción *CFTR*dele2,3 abarca 21kb e incluye los exones 2, 3 y buena parte de los intrones flanqueantes¹⁰. A diferencia de otras mutaciones, esta deleción ha sido identificada en el 6% de los alelos FQ de la población eslava. Una frecuencia poco común entre las mutaciones *CFTR* y que le confiere prioridad en el análisis de cualquier paciente procedente del Este de Europa. En la población española se han identificado ya ocho reordenamientos (siete deleciones y una duplicación) con un porcentaje global superior al 1% (Tabla 1), siendo la deleción *CFTR*50kdel la que presenta una mayor prevalencia (0,45%) (11: Casals, comunicación personal).

Origen geográfico y étnico

Una de las primeras observaciones del estudio molecular ha sido la irregular distribución de las mutaciones. Es patente el gradiente Norte – Sur de la mutación F508del en Europa, con frecuencias que oscilan del 85% (Dinamarca) al 21% (Turquía). Estas diferencias pueden, incluso observarse en regiones geográficas más reducidas. En la Península Ibérica el rango de la F508del varía entre un 80% (Región Cantabria) y un 45% (Andalucía)¹². Cuanto menor es la frecuencia de la mutación mayoritaria, mayor es la heterogeneidad molecular esperada en una determinada región. Sólo cinco mutaciones FQ se encuentran ampliamente representadas (>1%) en las poblaciones de origen caucásico, F508del, G542X, G551D, N1303K y W1282X⁸.



**Tabla 1. Reordenamientos CFTR en la población FQ española**

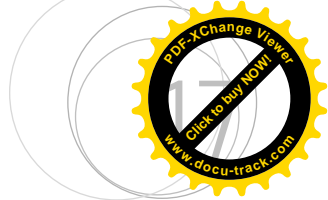
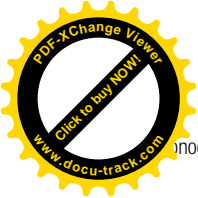
Mutación	Nº alelos	%
CFTRdel50kb	9	0,45
CFTRdele2,3 *	3	0,15
CFTRdele17a-18	4	0,20
CFTRdele19	2	0,10
CFTRdele20	4	0,20
CFTRdele22-24	2	0,10
CFTRdele24	1	0,05
CFTRduplProm-3	2	0,10
TOTAL (n=8)	27	1,35

*, determinado su origen de Europa del Este

Las grandes diferencias en el espectro mutacional vienen determinadas por el emplazamiento geográfico y la etnia de origen. Las situaciones que se encuentran son muy diversas. Una población cerrada con alto grado de endogamia favorece la presencia de mutaciones específicas. Las mutaciones F508del y M1101K en la población Hutterita, o la mutación W1282X en los judíos Ashkenazi¹³ reflejan esta situación. Por el contrario, una población abierta al comercio y/o bajo repetidas colonizaciones, presenta mayor heterogeneidad molecular. La población española, con más de 200 mutaciones caracterizadas, es una de las más heterogéneas en la costa Mediterránea¹⁴. Al menos 23 mutaciones pueden considerarse comunes (>0,5%) en nuestra población (Tabla 2).

De forma similar, los datos moleculares de Latino América señalan, por un lado, una menor incidencia de FQ en estas poblaciones y por otro, una alta hete-

rogeneidad como resultado de la mezcla de etnias muy diversas. En este mestizaje han intervenido la población aborigen y las de otros continentes que llegaron con las colonizaciones europeas a partir del siglo XV. El asentamiento de una determinada población es reconocible por sus mutaciones específicas. Por ejemplo, un hallazgo interesante en Latino América es la presencia de la mutación mediterránea G542X. La frecuencia más significativa de esta mutación en Europa se encuentra en España (7,7%). Curiosamente, su detección también sobresale en Argentina (4,5%), Méjico (6,2%), Cuba (6,8%), Brasil (8,8%) y Costa Rica (25%)¹⁵. En genética poblacional, una distribución de estas características se conoce como "efecto fundador" y es imputable a una población determinada. La presencia de las mutaciones G542X y 1811+1,6kbA>G en Latino América se atribuye a un efecto fundador de la población española¹⁵.

**Tabla 2. Mutaciones prevalentes en la población FQ española**

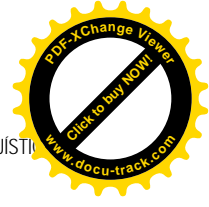
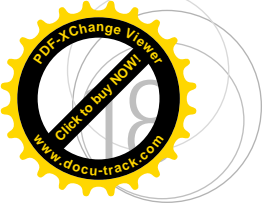
Mutación	Exon / Intron	Nº alelos	(%)
F508del	E.10	1009	(51,7)
G542X	E.11	150	(7,7)
N1303K	E.21	57	(2,9)
1811+1.6kbA>G	I.11	36	(1,8)
R334W	E.7	35	(1,8)
L206W	E.6a	32	(1,6)
711+1G>T	I.5	31	(1,6)
Q890X	E.15	28	(1,4)
R1162X	E.19	25	(1,3)
2789+5G>A	I.14b	24	(1,2)
R1066C	E.17b	23	(1,2)
I507del	E.10	21	(1,1)
1609delCA	E.10	18	(0,9)
712-1G>T	I.5	18	(0,9)
3272-26A>G	I.17a	18	(0,9)
2183AA>G	E.13	16	(0,8)
G85E	E.3	15	(0,8)
2869insG	E.15	15	(0,8)
W1282X	E.20	15	(0,8)
V232D	E.6a	14	(0,7)
A1006E *	E.17a	12	(0,6)
2184insA	E.13	11	(0,5)
K710X	E.13	11	(0,5)
TOTAL (n = 23)		1.634	(83,5)

*. alelo complejo: A1006E, V562I, IVS8-5T

En general, las mutaciones características de una determinada región y/o etnia son bien conocidas. Por consiguiente, es fundamental averiguar el origen de cada paciente para poder determinar el nivel de detección del análisis molecular y aportar, en la medida de lo posible, la máxima especificidad. Este aspecto tiene particular relevancia con los movimientos migratorios actuales.

Fenotipos asociados

Las mutaciones *CFTR* que originan cambios estructurales drásticos son fácilmente asociadas a FQ. Sin embargo, como se señala más adelante, esta circunstancia se da en un número limitado de mutaciones. Por consiguiente, a pesar de los esfuerzos realizados, todavía son bastantes las mutaciones en



las que la asociación genotipo-fenotipo no se ha establecido de forma concluyente.

Con la información disponible y un interés más práctico, dos consensos recientes proponen la clasificación de mutaciones en función del fenotipo asociado. Estos fenotipos abarcan no solo las diferentes formas de FQ sino también otras patologías en las que se ha evidenciado un papel de *CFTR* (*CFTR-related disorders*, CFTR-RD). Actualmente, el grupo CFTR-RD incluye agenesia bilateral de conductos deferentes, pancreatitis crónica y bronquiectasias diseminadas. Un porcentaje variable de pacientes CFTR-RD cumple criterios diagnósticos de FQ, por lo que ante una clínica sugestiva se recomienda su evaluación en una Unidad especializada⁹.

Además, hay que tener presente que el concepto "mutación" hace referencia a cualquier cambio en la secuencia genómica. Sin embargo, no todas las mutaciones de un gen van a determinar una sintomatología definida. Con estas premisas, el Consenso sobre el uso e interpretación de las mutaciones¹⁶ define cuatro categorías: A) mutaciones asociadas a FQ (F508del); B) mutaciones asociadas a CFTR-RD (5T-12TG); C) mutaciones sin expresión clínica (I148T); D) Mutaciones con significación clínica desconocida o incierta (D836Y).

Indicaciones del estudio molecular

El estudio genético está indicado en pacientes que refieren antecedentes familiares o ante una sospecha clínica, teniendo en cuenta la gran variabilidad fenotípica que presenta la enfermedad y que excepcionalmente, puede ir acompañada de un test de sudor normal o en el límite (Figuras 2 y 3). En pacientes con clínica dudosa, identificar las dos mutaciones conduce a la confirmación del diagnóstico y al control y tratamiento del paciente en una Unidad especializada⁹.

En el periodo perinatal, se debe descartar el diagnóstico de FQ cuando el neonato presenta íleo meconial

o hipertripsinemia (Figura 2). También es preceptivo el análisis molecular de los padres, cuando se advierte en la ecografía fetal un patrón de obstrucción intestinal. Estas situaciones se asocian con relativa frecuencia a FQ. Alrededor de un 15% de los pacientes FQ presentan íleo meconial o un equivalente al nacer. Los programas de cribado neonatal detectan un 0,5-1% de casos con hipertripsinemia, indicando en este grupo de riesgo el estudio clínico y molecular. Por último, un 3% de los fetos con hiperrefringencia intestinal acaban con un diagnóstico de FQ⁹.

Una de las ventajas del estudio molecular es poder ofrecer asesoramiento genético a los pacientes y su entorno familiar. Para ello es imprescindible confirmar la herencia paterna y materna de las mutaciones identificadas. El estudio de segregación aporta la máxima fiabilidad para los diagnósticos sucesivos (detección de portadores, diagnóstico prenatal o preimplantacional). Alternativamente, frente a un diagnóstico clínico inequívoco, los estudios moleculares se puede llevar a cabo combinando el análisis directo (mutación conocida) con el análisis de marcadores intragénicos (SNP, microsatélites). En un diagnóstico prenatal se recomienda complementar el análisis de mutaciones con el análisis de microsatélites, ya que éstos aportan información adicional sobre una posible contaminación materna de la muestra fetal⁹.

PROTEINA CFTR Estructura y regulación

CFTR es un canal de iones cloruro (Cl⁻) integrado en la superfamilia de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*)¹⁷. Esta familia de proteínas homólogas presenta una estructura característica con dos dominios transmembrana (TMD1, TMD2), cada uno formado por seis segmentos y dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBD1, NBD2). Los dominios NB contienen tres secuencias específicas de unión a ATP (*Walker A*, *Walker B*, *Signature sequence*). A diferencia de las otras proteínas de la familia, CFTR contiene

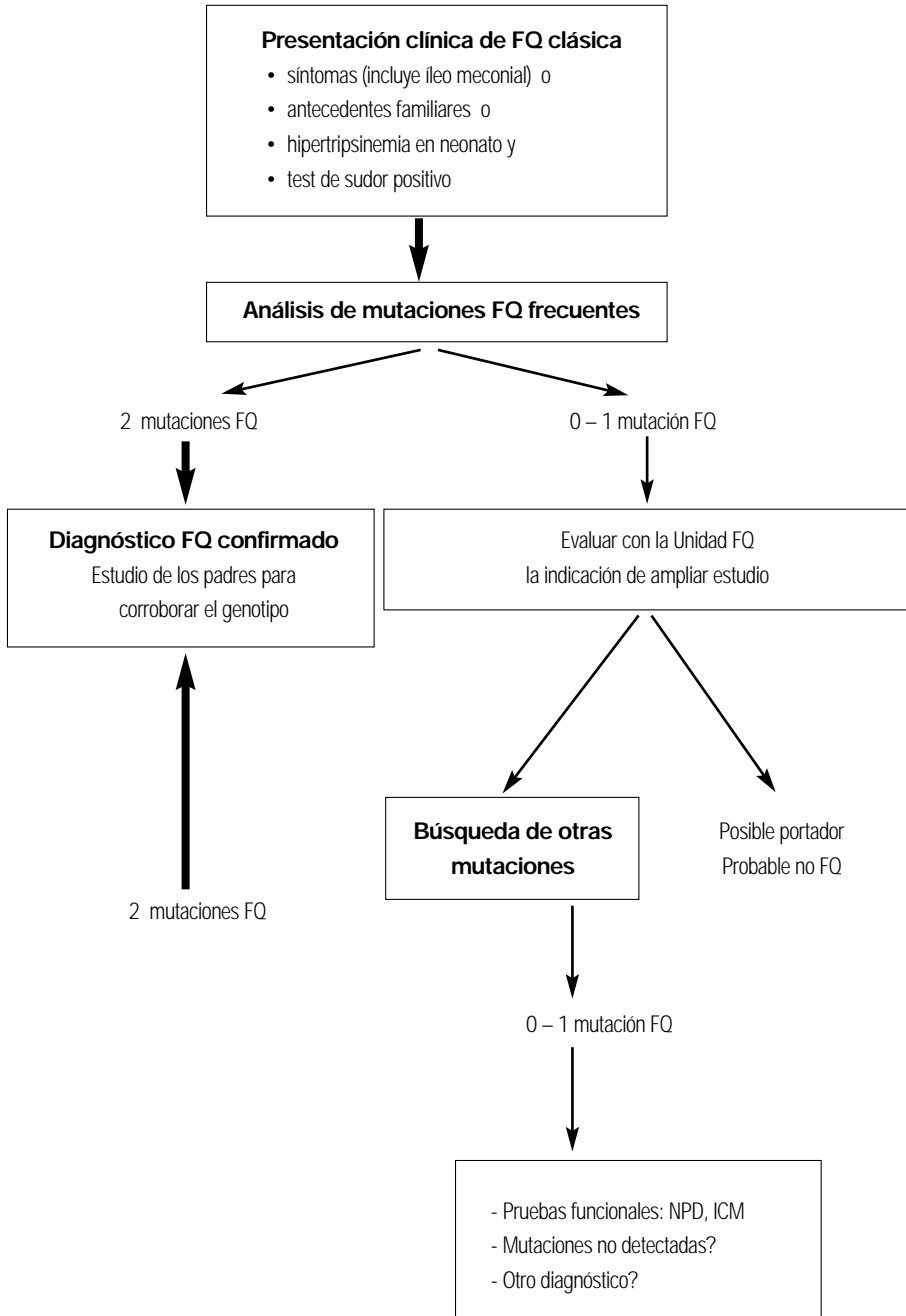


Figura 2. Protocolo recomendado en el estudio molecular de un paciente con criterios clínicos de fibrosis quística (ref. 9)
NPD, diferencia de potencial nasal; ICM, medición del cloruro intestinal

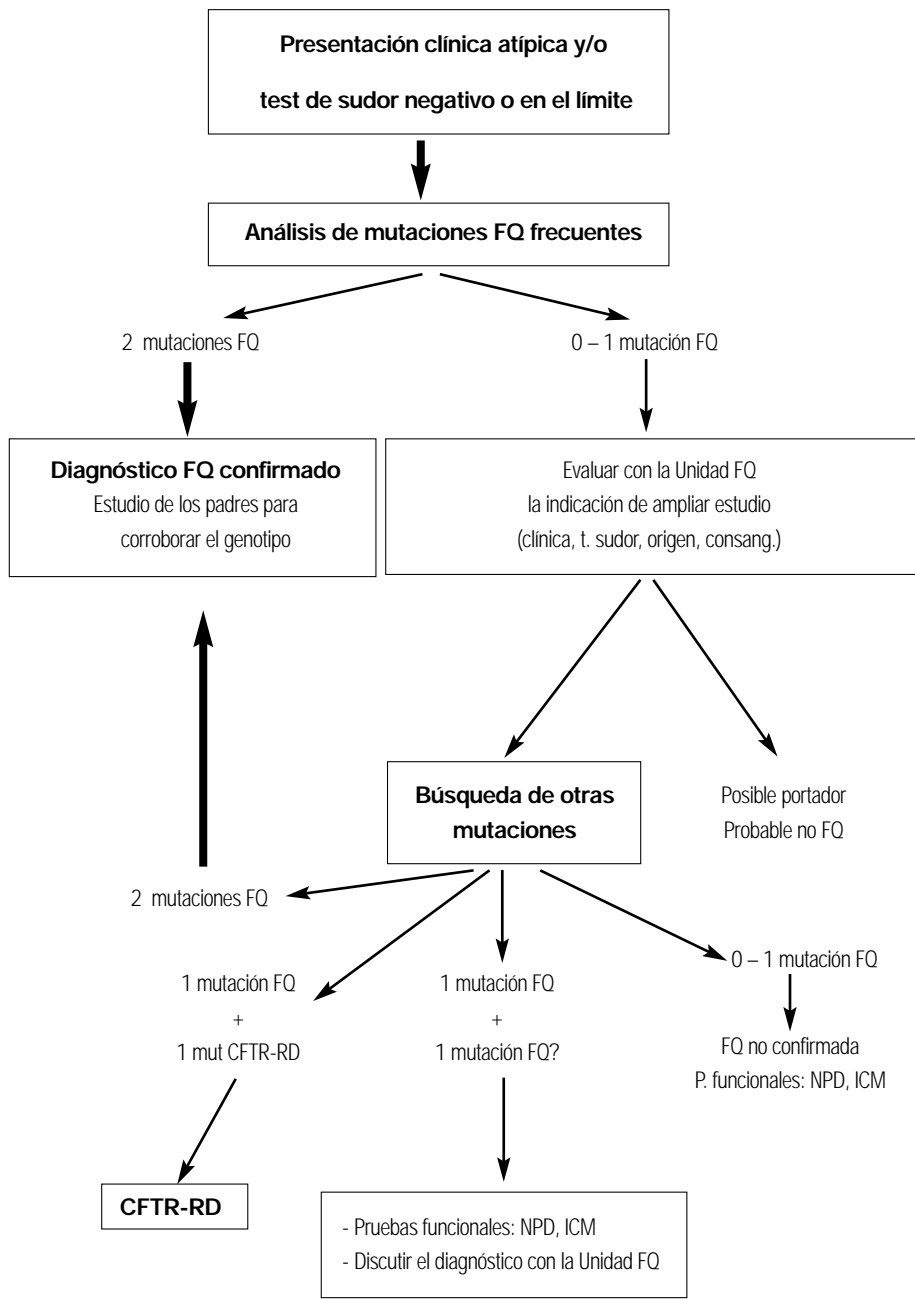
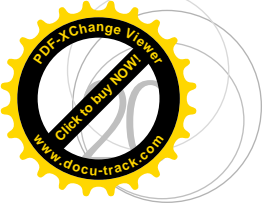
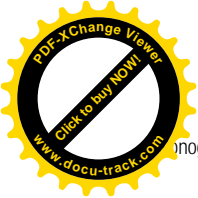


Figura 3. Protocolo recomendado en el estudio molecular de un paciente con clínica sugestiva de FQ (ref. 9). NPD, diferencia de potencial nasal; ICM, medición del cloruro intestinal



un dominio regulador (R) dispuesto entre los dominios NBD1 y TMD2 (Figura 1). La actividad de CFTR depende de la fosforilación del dominio R por proteína quinasa A (PKA) y de la hidrólisis de ATP. Este proceso modifica la configuración de la molécula para regular la apertura y cierre del canal y permite, de este modo, el transporte de iones y agua. Por consiguiente, la ausencia de CFTR altera la homeostasis (equilibrio dinámico) esencial de la membrana apical y determina una mayor viscosidad de las secreciones en el epitelio. Aunque este efecto es común para todo el sistema exocrino, pulmón y páncreas son los tejidos más perjudicados en pacientes FQ. Asimismo, la disfunción de CFTR en las glándulas sudoríparas bloquea la reabsorción de sales (ClNa) determinando su elevada concentración en el sudor¹⁸.

El mecanismo que controla la apertura y cierre del canal sigue siendo motivo de debate. En un trabajo reciente, Gadsby *et al.*¹⁹ postulan que es condición previa y necesaria la fosforilación del dominio R mediante PKA. Mientras se mantiene este estado, el canal se abre y cierra regularmente siempre que se produzca suficiente aporte de ATP y la dimerización NBD1-NBD2 en pasos sucesivos. La estrecha unión ATP-NBD1 es estable durante varios minutos, en este período la unión ATP-NBD2 da paso a la dimerización NBD1-NBD2 que sería la señal para una apertura relativamente estable del canal. La hidrólisis del ATP en NBD2 conduce a la disrupción del heterodímero NBD1-NBD2 y a la pérdida de señal, produciendo el cierre del canal. La hidrólisis del ATP sería la "señal" para el cambio de conformación y no una fuente de energía como se había propuesto con anterioridad. Además, los autores defienden la actividad del canal único, cuestionando la hipótesis de que un canal activo estaría formado por dos moléculas de CFTR unidas por sus dominios PDZ en el extremo COOH-terminal²⁰.

Antes de alcanzar la membrana, CFTR se une a un gran número de proteínas celulares que intervienen en su proceso de maduración y localización¹⁸. Muchas de estas proteínas ya se han identificado, pero toda-

via se desconoce su papel específico en la biosíntesis, conformación, desplazamiento y estabilidad de CFTR.

Otra dificultad para entender la regulación del canal CFTR es que todavía no se ha resuelto su estructura tridimensional completa. Por el momento existen modelos de los dominios NB y del posible efecto que algunas mutaciones producen sobre su conformación¹⁹.

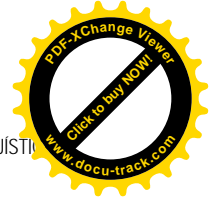
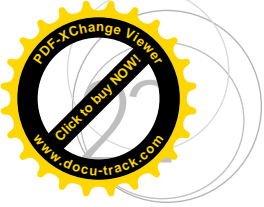
Funciones del canal

CFTR juega un papel esencial en la permeabilidad iónica de la célula epitelial, por consiguiente, es predecible que su actividad influya sobre otras proteínas de membrana de forma más o menos directa. De hecho, el estudio de CFTR ha conducido a diferentes hipótesis sobre su influencia en diversas alteraciones celulares.

La primera y más previsible es que la función/disfunción de CFTR afecta no sólo al transporte específico de aniones, cloruro y bicarbonato, sino también a otros transportadores iónicos de la membrana (ENaC, ORCC, Cl-/HCO₃⁻, CaCC). Se cree que esta regulación de CFTR sería específica de cada tejido, ya que, en ausencia de CFTR, la absorción de Na⁺ (ENaC) aumenta en el epitelio pulmonar y disminuye en las glándulas sudoríparas. Este efecto contrario sugiere la intervención específica de factores genéticos moduladores²¹.

Otro efecto secundario al fallo del transporte aniónico es el descenso de pH en el fluido extracelular de los diferentes tejidos. La pérdida del pH alcalino, asociada a la falta de HCO₃⁻, es especialmente relevante en el páncreas donde podría influir en la secreción de mucinas y el aumento de la viscosidad¹⁸.

También se especula sobre el papel de CFTR en el transporte extracelular de ATP. Bodas *et al.*²² sugieren que es otra proteína la que libera ATP, probablemente regulada por CFTR.



Asimismo se investiga la participación de CFTR en el círculo vicioso infección-inflamación. Un tema sobre el que todavía se debate cuál es el papel de CFTR en la inmunidad celular y de que forma se desarrolla. O propuestas más recientes en torno a si la falta de tiocianato, secundaria a la disfunción de CFTR, podría ser un desencadenante de la infección²³.

Causas de la inactividad

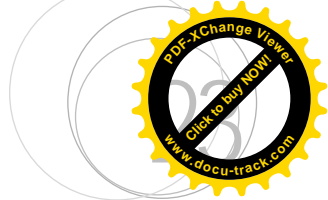
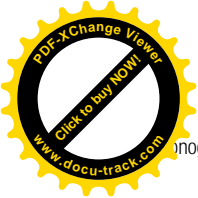
La alta homología observada entre proteínas CFTR de diferentes especies y el preciso mecanismo requerido para la regulación de CFTR sugieren que cualquier pequeña alteración en la secuencia del gen puede repercutir en la síntesis y/o estructura de la proteína, modificando en mayor o menor grado, su función normal. Por consiguiente, el impacto de una mutación va a depender del tipo de alteración, la región comprometida y la actividad residual de la proteína mutante.

Las mutaciones que determinan un codón de parada (nonsense, G542X), un cambio en la pauta de lectura (*frameshift*; 2183AA>G) o afectan la definición del exón variando alguna secuencia consenso (*splicing*; 712-1G>T) producen proteínas truncadas o transcritos inestables que son rápidamente degradados. Estas mutaciones con ausencia total de proteína constituyen la clase I. En otras ocasiones, la mutación modifica la cadena polipeptídica de forma que ésta no puede adquirir la conformación adecuada. Durante el proceso de maduración, estas proteínas son reconocidas por chaperonas y eliminadas en el retículo endoplasmático. La mutación F508del es la más representativa de la clase II. Otras mutaciones determinan la sustitución de un solo aminoácido y producen cambios estructurales que no siempre impiden el anclaje de la proteína en la membrana celular, pero si que pueden alterar la regulación de apertura-cierre del poro (clase III; G551D) o su conductividad (clase IV; R334W). Finalmente, las mutaciones que crean nuevas señales de *splicing* producen un porcentaje variable de transcritos aberrantes, con un tamaño inferior (2789+5G>A) o superior (3272-26A>G) al nor-

mal, que por lo general, son inestables. Estas mutaciones conservan la síntesis de proteína normal, aunque en menor proporción (Clase V).

Al margen de algunas excepciones, las mutaciones de clase I, II y III se asocian a una clínica grave, mientras que las mutaciones de clase IV y V, al mantener una actividad residual se asocian a un fenotipo leve dentro de un rango variable²⁴. También se ha observado un efecto predominante de la mutación leve sobre la grave, de manera que pacientes con una o dos mutaciones de clase IV/V presentan un fenotipo menos grave que aquellos en los que ambas mutaciones son de clase I/II/III. Estas consideraciones generales en la correlación genotipo-fenotipo son útiles a nivel poblacional, pero no es posible hacer el pronóstico de un paciente exclusivamente en base al genotipo *CFTR* que presenta. Esta limitación se debe a que cada fenotipo está sujeto a diferentes factores genéticos y ambientales¹⁶.

Determinar a que clase pertenece una mutación requiere el análisis de la proteína mutante con tecnologías específicas para determinar su síntesis, proceso de maduración, actividad y estabilidad. Por consiguiente, el número de este tipo de estudios es todavía limitado y sus conclusiones, a veces sorprendentes, especialmente cuando se trata de mutaciones que sustituyen un aminoácido (41% del total). El estudio funcional de mutaciones *missense* en el exón 12 evidencia que dos de las mutaciones (D565G, G576A) producen transcritos aberrantes reduciendo el nivel de proteína normal (25). Este mecanismo las equipara a las mutaciones de clase V. También inesperado es el resultado de las mutaciones P205S y L206W, ambas en el tercer segmento del dominio TM1 y asociadas a fenotipo leve. A diferencia de otras mutaciones en los dominios TM que alteran la conductancia del canal, el análisis de estas mutaciones demuestra su efecto sobre la conformación de la molécula (clase II) reduciendo la cantidad de proteína que llega a la membrana sin modificar significativamente la conductancia de la proteína mutante²⁶. Por otro lado, el estudio de ocho mutaciones "error de sentido" en el extremo NH₂-terminal evidencia un comportamiento



variable de las proteínas mutantes producidas, desde la ausencia total (S50P, G85E) hasta una actividad similar a la proteína normal (R75Q)²⁷.

Finalmente, no hay que olvidar que una misma mutación puede tener un efecto múltiple y ser incluida indistintamente en más de un grupo por lo que es conveniente observar esta clasificación con flexibilidad.

Retos futuros

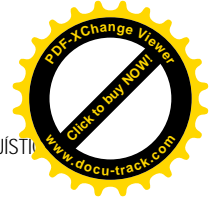
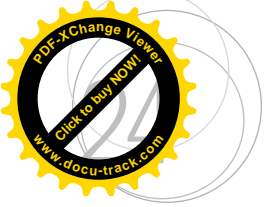
En los últimos 20 años la complejidad de la FQ ha aumentado progresivamente. Se ha conseguido un gran acopio de información, pero todavía falta encajar numerosas piezas del puzzle y mejorar nuestra comprensión de la enfermedad. Algunas preguntas fundamentales siguen en estudio: cómo es la estructura tridimensional de CFTR; qué proteínas intervienen en su maduración, localización, función y reciclaje y cómo interactúan; qué genes modulan la expresión de *CFTR*; y cuales tienen una expresión diferencial al co-tejar células FQ y normales. También es importante encontrar un modelo animal idóneo para el ensayo de dianas terapéuticas. En definitiva, queda por determinar a qué nivel y de qué forma actuar sobre uno o varios de estos elementos para revertir la enfermedad con los mínimos efectos secundarios.

Entre los abordajes terapéuticos, reparar o introducir el gen *CFTR* normal sigue siendo el objetivo de la terapia génica. El problema principal es encontrar un vector que combine inocuidad (baja respuesta inmune) y suficiente eficacia en la expresión del gen. Alternativamente, las células madres mesenquimales, capaces de ser diferenciadas en células pulmonares, constituyen una nueva línea de investigación en terapia celular. Mientras estos estudios prosiguen su avance, la investigación dirigida al rescate de la proteína ha pasado a primer plano¹⁸.

La terapia farmacológica plantea distintas estrategias en función del tipo de mutación y obviamente, la mutación F508del es la diana prioritaria. Para ésta y otras mutaciones de clase II, el objetivo es identificar micromoléculas capaces de mejorar tanto la eficiencia del proceso de maduración (correctoras), como la actividad del canal (potenciadoras)²⁸. Las moléculas correctoras aumentarían el nivel de proteína madura en la membrana, mientras que las potenciadoras mejorarían la conductancia. Una de estas moléculas potenciadoras, VX-770, está ya en fase experimental en pacientes FQ (fase I). Sin embargo, es poco probable que un tratamiento basado únicamente en moléculas potenciadoras sea suficiente para recuperar la normalidad celular. Por consiguiente, se plantea la necesidad de identificar una combinación de fármacos (correctores y potenciadores) o un fármaco polivalente que permita recuperar el equilibrio iónico de la célula epitelial²⁹.

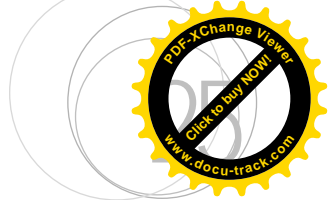
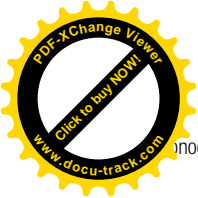
Un abordaje distinto se hace para mutaciones que determinan una señal de parada prematura (proteína truncada). En este tipo de mutaciones se ensaya el tratamiento con aminoglicósidos (gentamicina). Estos antibióticos tienen la particularidad de eludir la señal "stop" e incorporar en su lugar un aminoácido al azar³⁰. Mediante este "salto" se logra la síntesis de una proteína completa aunque de funcionalidad incierta. Otro inconveniente de los aminoglicósidos es que no actúan específicamente sobre *CFTR* y por consiguiente, su repercusión negativa sobre otros genes debe ser evaluada con suma cautela.

Una vez evidenciada la notable complejidad de esta enfermedad monogénica, es indudable que la investigación (básica y aplicada) requiere un abordaje multidisciplinar para conseguir rectificar su curso natural.

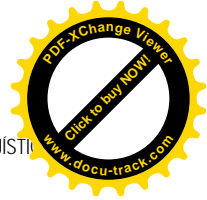
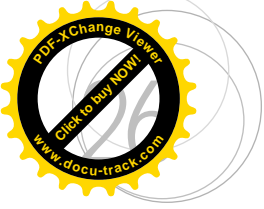


Bibliografia

1. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am J Dis Child* 1938, 56: 344-399
2. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of the etiology. *Am J Dis Child* 1946, 72: 62-80
3. Tsui L-C, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* 1985, 230: 1054-1057
4. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989, 245: 1059-1065
5. Estivill X, Scambler PJ, Wainwright BJ, Hawley K, Frederick P, Schwartz M, et al. Patterns of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis. *Genomics* 1987, 1: 257-263
6. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989, 245: 1066-1073
7. White NL, Higgins CF, Trezise AE. Tissue-specific in vivo transcription start sites of the human and murine cystic fibrosis genes. *Hum Mol Genet* 1998, 7: 363-369
8. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC), <http://www.genet.sickkids.on.ca>
9. Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, et al. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders - updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2008, doi: 10.1038/ejhg.2008.136
10. Dörk T, Macek M Jr, Mekus F, Tümmler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21kb), in the CFTR gene: a cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* 2000, 106: 259-268
11. Ferec C, Casals T, Chuzhanova N, Macek M, Bienvenu T, Holubova A, King C, et al. Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanism. *Eur J Hum Genet* 2006, 14: 567-576



12. Estivill X, Bancells C, Ramos C. for the BIOMED CF Mutation Analysis Consortium. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 1997, 10: 135-154
13. Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002, 19: 575-606
14. Alonso MJ, Heine-Sunyer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD, et al. Spectrum of mutations in the CFTR gene in Cystic Fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet* 2007, 71: 194-201
15. Pérez MM, Luna MC, Pivetta OH, Keyeux G. CFTR gene analysis in Latin American CF patients: heterogeneous origin and distribution of mutations across the continent. *J Cyst Fibros* 2007, 6:194-208
16. Castellani C, Cuppens H, Macek Jr M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008, 7:179-196
17. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, et al. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990, 346: 362-365
18. Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 2008, 77: 701-726
19. Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature*. 2006, 440: 477-483
20. Ramjeesingh M, Kidd JF, Huan LJ, Wang Y, Bear CE. Dimeric cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exists in the plasma membrane. *Biochem J* 2003, 374: 793-797
21. Reddy MM, Light MJ, Quinton PM. Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature* 1999, 402: 301-304
22. Bodas E, Aleu J, Pujol G, Martin-Satué M, Marsal J, Solsona C. ATP crossing the cell plasma membrane generates an ionic current in xenopus oocytes. *J Biol Chem* 2000, 275: 20268-20273
23. Moskwa P, Lorentzen D, Excoffon KJ, Zabner J, McCray PB Jr, Nauseef WM, et al. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 175:174-183
24. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993, 73: 1251-1254
25. Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, Casals T, Baralle FE. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet* 2003, 12: 1111-1120
26. Clain J, Lehmann-Che J, Duguépéroux I, Arous N, Girodon E, Legendre M, Goossens M, et al. Misprocessing of the CFTR protein leads to mild cystic fibrosis phenotype. *Hum Mutat*. 2005, 25: 360-371



27. Gené G, Llobet A, Larriba S, de Semir D, Martínez I, Escalada A, Solsona C, Casals T, Aran JM. N-terminal CFTR missense variants severely affect the behavior of the CFTR chloride channel. *Hum Mutat* 2008, 29: 738-749
28. Amaral MD, Kunzelmann K. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 2007, 28: 334-341. Erratum in: *Trends Pharmacol Sci* 2007, 28: 447
29. Ameen N, Silvis M, Bradbury NA. Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *J Cyst Fibros* 2007, 6:1-14.
30. Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, et al. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med* 2007, 5: 5

Glosario

Alelo	formas alternativas de un gen
haplotipo	combinación de alelos en <i>loci</i> próximos que se transmiten en bloque
microsatélites	repeticiones en tándem de dos / tres nucleótidos
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
splicing	proceso en el cual se eliminan los intrones y se genera el RNA