



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

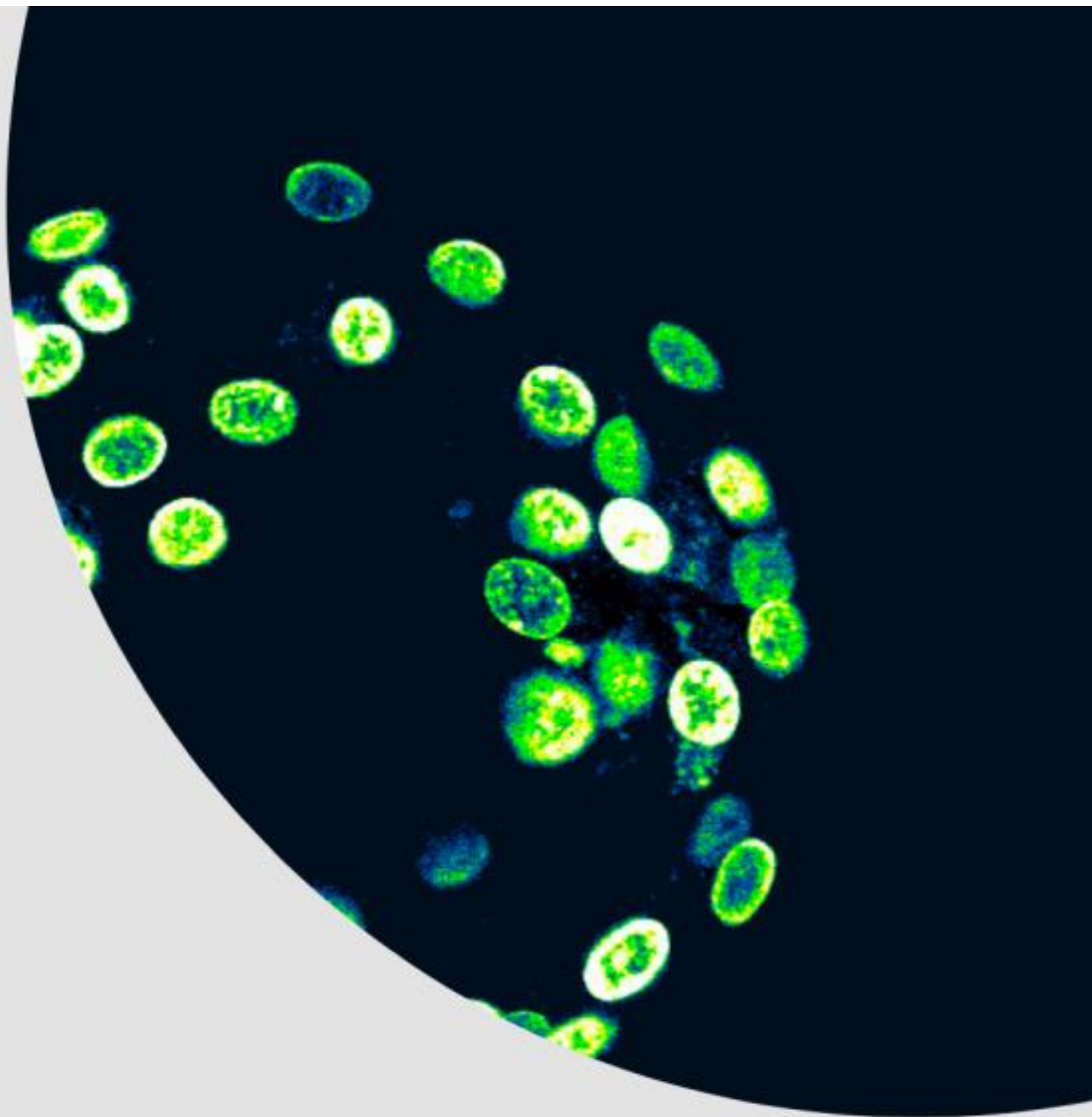
Estudio de biomarcadores celulares para la implementación de terapias personalizadas en Fibrosis Quística

Maite Calucho Prim

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Estudio de biomarcadores celulares para
la implementación de terapias personalizadas
en Fibrosis Quística**

Tesis Doctoral - 2021
Maite Calucho Prim

Tesis Doctoral

Barcelona, 2021

Estudio de biomarcadores celulares para la
implementación de terapias personalizadas en Fibrosis
Quística

Memoria presentada por:

Maite Calucho Prim

Para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Genética



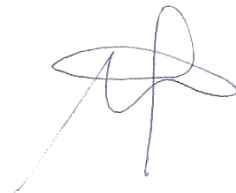
Dr. Eduardo F. Tizzano

Director



Dra. Susanna Balcells

Tutora



Maite Calucho Prim

Doctoranda



AGRADECIMIENTOS

El doctorat, com la vida, és un camí que s'ha d'anar traçant pas a pas. Aquest camí, de gairebé sis anys, ha sigut ple de pedres, que he hagut d'anar esquivant o saltant. Durant aquest viatge, m'he creuat a moltes persones que m'han ajudat i que m'agradaria donar-les les gràcies, sense estendre'm massa.

Al meu director de tesis, Eduardo Tizzano i la meva segona “directora”, Silvia Gartner.

Als meus dos tutors de la UB, Daniel Grinberg i Susanna Balcells, per estar sempre atents.

Al tot l'equip de l' UFQ.

Als diversos col·laboradors dels projectes, sense els quals hagués sigut impossible realitzar totes aquestes investigacions. Els cirurgians pediàtrics, en especial, al sempre disponible i amable, Carles Giné. Al grup d' *Stem Cells* del VHIO, sobretot al Dr Jordi M. Quintanilla, moltes gràcies per la teva generositat i paciència!. Al grup d'estadística aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), especialment al Llorenç Badiella, per la seva professionalitat i humanitat. A les meravelloses tècniques de microscòpia de l' IRB, Anna i Lúdia, infinites gràcies per facilitar-me la vida. A la Marta Valeri de la UAT del VHIR...Marta, moltes gràcies per l'entusiasme que li has posat als meus estudis, per l'interès que has tingut, per quedar-te fins ben tard i per les nostres xerrades durant les hores de microscopi. Raquel i Marc Moltó.

Un agraïment especial a les fundacions que durant tots aquests anys ens han donat suport econòmic: Fundación Daniel Bravo, Fundación Mútua Madrileña y Fundació Arcadi. Un agraïment molt especial a tots els pacients i familiars que han donat el seu consentiment per participar en aquests estudis, així com els individus controls.

Personal VHIR: **Clara, Paola, Judith, Paula B, Pauli**, Lorena, M Ribasés, Cris, Laura, Maria, Mireia, VIH Carla, Laura, Antonio, Jon, Núria, Nerea, Marina, Ana, Sebas, Joan, David, M Jose, Txell, m'han prestat material i coneixement quan ho he necessitat Barquinero, BOCP Laura, Mario, Vanesa, LUPUS Cris, Sandra, Núria Camats, Noelia, Coordinació Anna, Eulàlia, Fàtima, Helena, Rosa, Personal recepció, empleades de l'empresa Clece/Avant amb les que m'he creuat durant aquest temps, en especial Montse i Vicky, i investigadors que sempre m'han escoltat i s'han interessat pel meu projecte (Anna Badia, Montse Molano, Mònica Vall, Duran i Maria Martell).

A la meva família, que tot i no entendre massa a què em dedico, sempre m'han donat suport.

Als de la Uni, tot i que els nostres camins ara són molt diferents, sempre sento el suport vostre, Achille i Silvia.

Al meu grup de sempre: Ari, Anna, Marta, Núria C i Núria A.

Als meus pares. Mai tindria prou paraules per agrair tot el que heu fet per a mi.

Volia fer especial menció a les amigues i companyes que m'han recolzat i ajudat d'una manera excepcional en aquests últims dos mesos d' *sprint* final: Judith, Paula B, Paula R, Ari, Anna i Marta. A les meves "editores personals", Judith i Paula B (jeje), a les quals estic infinitament agraïda de tota la ajuda que m'han donat, per *formatejar* aquesta tesis, plasmar la meva idea de portada i estar sempre disponibles per a tot. M'heu obert els vostres braços per a tot el que he necessitat i m'heu regalat el vostre temps. Us estaré sempre agraïda!!!

LISTA DE ABREVIACIONES

Las abreviaciones más utilizadas, están marcadas con *

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALI	<i>Air liquid interface</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AQP	Acuaporinas
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
*AUC	<i>Area Under the Curve</i>
BAL	Lavado broncoalveolar o <i>Broncoalveolar lavage</i>
*CFTR	Gen <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
*CFTR	Proteína <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
EMA	Agencia Europea del Medicamento o <i>European Medicines Agency</i>
ENaC	Canal transportador de Na ⁺ o <i>epithelial sodium channel</i>
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos o <i>Food and Drug Administration</i>
FEV₁	Flujo espiratorio forzado en un segundo o <i>forced expiratory volume per 1 second</i>
*FIS	<i>Forskolin induced sweating</i>
*FQ	Fibrosis quística
*FR	Reducción fraccional o <i>fraction reduction</i>
GJ	Uniones comunicantes o <i>gap junctions</i>
HUVH	Hospital Universitari Vall d'Hebron
IF	Inmunofluorescencia
*IFRA	Área interna de reservorio de fluidos o <i>Inner fluid reservoir areas</i>
IL-8	Interleucina 8
IP	Insuficiencia pancreática
iPSCs	<i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
LSVA	Líquido de superficie de las vías aéreas
NMD	<i>Nonsense mediated decay</i>
NBD	Dominios de unión a nucleótidos o <i>nucleotide binding domain</i>
*n.s.	No significativo
Po	Probabilidad de apertura del canal
PAP	Proteína asociada pancreática
PKA	Proteína kinasa A
PKC	Proteína kinasa C
PTC	<i>Premature termination codon</i>
*PTC-124	Peptidil transferasa 124

RE	Retículo endoplasmático
*SD	Desviación estándar
*s.d.	Sin determinar
*SEM	Error estándar de la media
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIR	Tripsina inmunoreactiva
TJ	Uniones estrechas o <i>tigh juntcions</i>
TMD	Dominios transmembrana o <i>transmembrane domain</i>
UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
UFQ	Unidad de Fibrosis Quística
VHIR	Vall d'Hebron Institut de Recerca
VHIO	Vall d'Hebron Institut d'Oncologia
*WT	<i>Wild-type</i>

ÍNDICE

I – Resumen	10
II– Introducción	13
1. El gen CFTR	14
2. Tejido epitelial: composición y características	15
3. Localización y función WT-CFTR	17
4. Manifestaciones clínicas de FQ	18
4.1 Enfermedad respiratoria	18
4.2 Insuficiencia pancreática	18
4.3 Otras afectaciones.....	19
5. Genes y factores ambientales modificadores de la enfermedad de FQ.....	20
6. Diagnóstico de FQ	20
7. Variantes patogénicas en el gen CFTR	21
7.1 Clasificación de las variantes según el defecto que producen en la proteína CFTR	21
7.2 Clasificación de las variantes según <i>theratype</i>	22
8. Terapias para FQ.....	22
8.1 Terapias clásicas para FQ.....	22
8.2 Fármacos moduladores del CFTR.....	23
8.2.1 Potenciadores	23
8.2.2 Correctores.....	24
8.2.3 Agentes <i>read-through</i>	26
8.2.4 Amplificadores	27
8.2.5 Estabilizadores	28
8.3 Terapias avanzadas en desarrollo	28
8.3.1 Terapia génica.....	28
8.3.2 Edición génica	28
9. Modelos celulares <i>in vitro</i> para el estudio de la funcionalidad de CFTR	28
9.1 Organoides intestinales.....	29
9.2 Modelos respiratorios	31
III – Hipótesis y objetivos	34

IV – Material y Métodos	36
1. Pacientes e individuos controles incluidos en los estudios y aspectos éticos	37
2. Nasoesferas	37
2.1 Extracción células epiteliales nasales humanas.....	37
2.2 Cultivo de nasoesferas a partir de células epiteliales nasales humanas.....	37
2.3 Tinción de nasoesferas para observar estructura y tipos celulares	38
2.4 Inmunofluorescencia en nasoesferas para detectar proteína CFTR.....	38
2.5 Ensayo funcional en nasoesferas mediante microscopía <i>in vivo</i>	40
3. Organoides intestinales	43
3.1 Obtención de biopsias rectales	43
3.2 Cultivo de organoides intestinales.....	44
3.3 Experimento de imagen <i>in vivo</i> de organoides intestinales para probar diversos fármacos	46
4. Análisis estadístico.....	49
V – Resultados	51
1. Validación de las nasoesferas para el estudio de la funcionalidad de CFTR y la respuesta a moduladores en FQ.....	52
2. Estudio de la expresión de CFTR en nasoesferas	60
3. Correlación entre los ensayos funcionales en nasoesferas y organoides intestinales de pacientes con FQ con distintos genotipos	63
4. Análisis de la restablecimiento funcional de CFTR después del tratamiento con moduladores en nasoesferas de pacientes FQ con diferentes genotipos	72
5. Anexos resultados	77
VI – Discusión	83
VII – Conclusiones	97
VIII –Líneas de investigación para la continuación de este trabajo de tesis	100
IX – Bibliografía	102
X – Anexos	113

«El conocimiento es una riqueza que se puede transmitir sin empobrecerse».

Nuccio Ordine

I – Resumen

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva que ocurre cuando existen variantes patogénicas bialélicas en el gen *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR), y que codifica por una proteína con el mismo nombre. La proteína CFTR se encuentra en las células epiteliales del organismo y funciona, preferentemente, como transportadora de iones Cl^- y HCO_3^- . Presenta un papel regulador especialmente importante en los epitelios respiratorio y pancreático, tejidos en donde se observa una elevada afectación cuando hay disrupción de la función de CFTR. Actualmente, se han descrito alrededor de 2100 variantes identificadas como causantes de la enfermedad y que se clasifican en siete grupos, I-VII, dependiendo del defecto que producen en la proteína CFTR. Un avance importante en el tratamiento de la enfermedad fue el descubrimiento hace pocos años de unas pequeñas moléculas, llamadas moduladoras, capaces de reparar algunos de los defectos iniciales de la proteína CFTR. Varias de estas moléculas han sido aprobadas por las agencias del medicamento estadounidenses y europeas para tratar a pacientes FQ-CFTR que presenten determinados genotipos. Para valorar la funcionalidad de CFTR antes y después del tratamiento con moduladores, es necesaria la realización de ensayos funcionales *in vitro* en muestras de pacientes. Entre los estudios funcionales, los más destacados se realizan en organoides intestinales, provenientes de epitelio rectal, y en modelos *in vitro* derivados de células del sistema respiratorio. Para el desarrollo de esta tesis doctoral, se optó por establecer y validar ensayos en células epiteliales nasales y así, poder mimetizar la función CFTR en el sistema respiratorio. Para ello, se optimizó el ensayo funcional en el cultivo de las nasoesferas, estructuras tridimensionales formadas de manera fácil y rápida a partir de epitelio nasal humano. Después de la modificación y mejora del protocolo original del ensayo funcional en nasoesferas, esta metodología muestra la capacidad para representar respuestas del epitelio respiratorio *in vitro*. También se describen nuevas maneras de analizar las nasoesferas para categorizar mejor las respuestas de CFTR en *wild type* (WT)-CFTR (n=7) y en FQ-CFTR (n=7). Se describe por primera vez, la correlación, en muestras del mismo paciente, entre los resultados del estudio funcional en nasoesferas con los resultados del ensayo funcional en organoides intestinales (n=3). Para finalizar, se amplió el ensayo funcional en nasoesferas con diez pacientes FQ-CFTR, que presentan variedad de genotipos, con y sin incubación de fármacos moduladores. En esta tesis doctoral, se concluye que el ensayo funcional en nasoesferas puede utilizarse como biomarcador de la funcionalidad de CFTR a nivel respiratorio. Este estudio se puede llevar a cabo como ensayo inicial o herramienta complementaria de otros estudios más complejos e invasivos como los ensayos en organoides intestinales.

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease that occurs when there are biallelic pathogenic variants in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* gene and codifies for a protein with the same name. CFTR protein is located in the epithelial cells and it acts as a Cl⁻ and HCO₃⁻ transporter. It presents an important regulatory role in the respiratory epithelia and pancreas. Currently, around 2,100 variants have been described and they are grouped into seven classes, depending on the caused CFTR defect. An important advance in the treatment of the disease was the discovery of small molecules, called modulators, capable of repairing some of the initial defects of the CFTR protein. Some of these molecules have been approved as a clinical treatment only for specific *CFTR* genotypes by the American and European drug agencies. To assess CFTR functionality, before and after modulator treatment, is relevant to perform functional *in vitro* assays in patient-derived cells. Among the existent functional assays, the most remarkable are the assays using intestinal organoids, from the rectal epithelium, and respiratory cell models. For this thesis, a functional assay using a nasal model was chosen in order to mimic the respiratory CFTR responses. Nasospheroids are three-dimensional structures easily and rapidly formed from nasal epithelial human cells and, during this thesis, it has been demonstrated its capacity to represent respiratory *in vitro* responses. The description of new ways to analyze nasospheroids are also described to better categorize CFTR responses in wild type (WT)-CFTR (n = 7) and FQ-CFTR (n = 7) groups. For the first time, the correlation between the results of the functional assay in the nasospheroids with those obtained in intestinal organoids from the same individuals (n=3) was described. Finally, the functional assay in nasospheroids was expanded with ten CF patients, presenting a variety of genotypes, with and without modulators. In the present doctoral thesis, it is concluded that the functional assay in nasospheroids can be used as a biomarker of CFTR functionality at the respiratory level. This study can be carried out as an initial test or a complementary tool for other studies.

II- Introducción

1. EL GEN CFTR

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad con patrón de herencia autosómico recesivo causada por dos variantes patogénicas bi-alélicas en el gen *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR). Este gen fue identificado como causante de la enfermedad en el año 1989 [1] en el Hospital *Sick Children* de Toronto (Canadá) gracias a la técnica de la clonación molecular y aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN). El gen se localiza en el brazo largo (q) del cromosoma 7, y consiste de 27 exones y codifica por una proteína que lleva el mismo nombre, CFTR. Ésta, pertenece a la familia de proteínas transportadoras dependientes de adenosín trifosfato (ATP), llamadas “transportadoras ABC” (del inglés *ATP-binding cassette*). Este grupo de proteínas se encuentran en múltiples organismos eucariotas y procariotas y tienen como función el transporte de solutos a través de membranas celulares. Se han detectado transcritos de ácido ribonucleico (ARN) de CFTR en diversos tejidos epiteliales del organismo: páncreas, epitelio nasal, bronquial y glándulas submucosas de los bronquios, intestino, glándulas sudoríparas, e hígado [1] (ver sección 4).

La proteína CFTR sintetizada presenta 1480 aminoácidos y un peso molecular de 170 kDa. Después de la síntesis de *wild type* (WT)-CFTR en el retículo endoplasmático (RE), se transporta hacia la membrana plasmática por el complejo de Golgi. Finalmente, la proteína funcional se inserta en la superficie apical de las células epiteliales, donde actúa principalmente como canal transportador de Cl^- y HCO_3^- [2, 3]. Al igual que las otras proteínas transportadoras de la familia ABC, su estructura tridimensional posee dos dominios transmembrana (*transmembrane domain*, TMD) y dos dominios citosólicos de unión a nucleótidos (*nucleotide-binding domain*, NBD) [1, 4, 5]. Los dos dominios transmembrana, TMD1 y TMD2, poseen una estructura idéntica entre ellos, con 6 hélices transmembrana y se encuentran unidos por el dominio regulador R (**Figura 1**). CFTR es la única proteína de la familia ABC que posee un dominio citoplasmático R, que controla la apertura y cierre del canal transportador [6, 7]. Para la apertura del canal CFTR, es necesario que las proteínas kinasas A (PKA) y C (PKC) fosforilen el dominio R. Este dominio, se disociará del compuesto NBD1, dejando accesible los sitios de unión de ATP encontrados en NBD [8, 9]. La unión ATP-NBD permite la dimerización de NBD1 y NBD2, que a su vez, da lugar a un cambio conformacional de las estructuras intracelulares TMD, dejando así abierto el canal para el transporte de Cl^- [10]. El cierre del canal empieza por la hidrólisis de ATP y posterior desestabilización del dímero NBD [11].

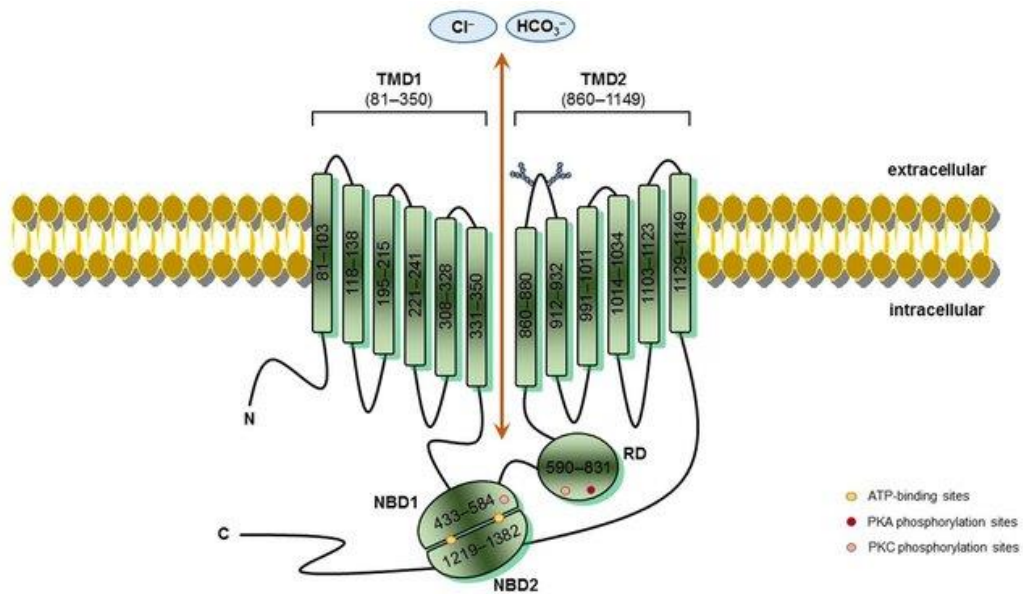


Figura 1. Estructura y disposición en la membrana de la proteína CFTR. Extraída de Lopes-Pacheco *et al* 2016 [12].

2. TEJIDO EPITELIAL: COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS

Los tejidos epiteliales están compuestos por una o varias capas de células conectadas que cubren una superficie o una cavidad. La característica más remarcable del tejido epitelial es su polarización; la membrana apical está en contacto con la zona externa o lumen, mientras que la membrana basolateral es la que está en contacto con el intersticio. Cada membrana expresa distintas proteínas dependiendo de su función; la membrana apical funciona como barrera física y química a agentes externos que potencialmente pueden ser patógenos o tóxicos mientras que la membrana basolateral, se encarga de la asimilación y captación de nutrientes, iones y oxígeno de la sangre.

El epitelio se conforma de células epiteliales unidas entre sí mediante un entramado de proteínas de unión. Éstas, generan una barrera bioquímica entre las membranas apical y basolateral, manteniendo la polarización epitelial e impidiendo el libre flujo de sustancias [13]. Estos complejos proteicos forman las estructuras denominadas uniones estrechas o *tigh junctions*, uniones adherentes o *zónula adherens*, desmosoma o *macula adherens* y uniones comunicantes o *gap junctions*. En el epitelio, encontramos dos tipos de transporte de solutos: el transporte paracelular y el transcelular. El transporte paracelular, que ocurre entre las células, es un transporte pasivo controlado por gradiente electroquímico y la permeabilidad celular. No requiere de energía, ya que la difusión se produce a través de un gradiente de concentración, ni tampoco de proteínas transportadoras. En cambio, el transporte transcelular (a través de la célula), puede

ser activo (dependiente de ATP) o pasivo (por difusión) (**Figura 2.A**). La absorción y secreción de solutos, funciones básicas del tejido epitelial, ocurren mediante ambos tipos de transporte. Por lo general, la absorción de sales (**Figura 2.B**), depende del transporte activo transepitelial de Na^+ , que ocurre desde la zona apical hacia la basolateral, por el transportador de Na^+ ENaC (de sus siglas en inglés, *epithelial sodium channel*). Cuando llega a la membrana basolateral, la absorción de Na^+ es dirigida por el intercambiador de Na^+/K^+ . El transporte de H_2O y Cl^- hacia el intersticio se realiza mediante transporte pasivo paracelular y transcelular (facilitado por las proteínas transportadoras acuaporinas, AQP). Por otro lado, la secreción de sales en el epitelio (**Figura 2.C**), está regulada por el transporte activo transepitelial de Cl^- hacia el lumen. Participan numerosos canales insertados en la membrana apical, predominantemente el CFTR. Los canales SLC26 y ANO1, se expresan sólo en algunos tejidos epiteliales y los transportadores CFTR y ANO1 también participan en el transporte de HCO_3^- . En la membrana basolateral, el transporte de Cl^- ocurre mediado por el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, denominado NKCC1. El transporte de H_2O y Na^+ hacia el lumen se realiza mediante transporte pasivo paracelular y transcelular (mediante AQP).

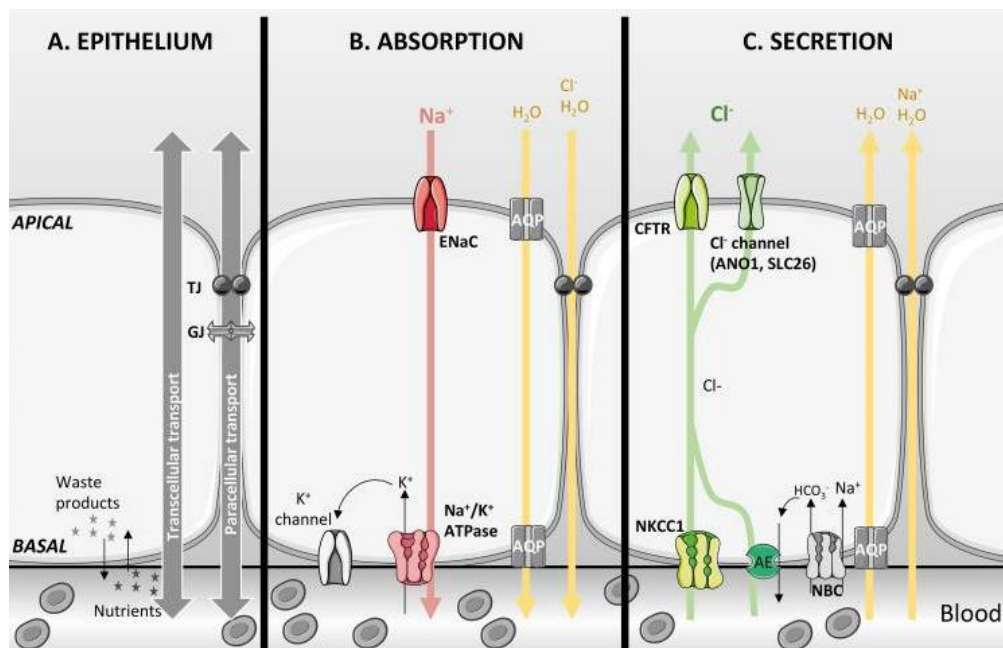


Figura 2. Características de las células epiteliales: polarización, uniones celulares y transporte de iones y H_2O . (A) Las células epiteliales presentan una membrana polarizada: la membrana apical, que se encuentra en contacto con el exterior o lumen, y la membrana basal o basolateral, en contacto con el torrente sanguíneo, de dónde se captarán nutrientes y se desecharán los productos de desecho. Para mantener la polarización epitelial, entre las células encontramos las uniones estrechas o *tigh junctions* (“TJ”) y las uniones comunicantes o *gap junctions* (“GJ”), entre otras. Estas permiten el transporte paracelular (entre dos células), un transporte pasivo mediante difusión que no requiere de energía. También encontramos el transporte transcelular (a través de la célula), que puede ser activo (mediante transportadores e intercambiadores de iones) o pasivo. El epitelio se encarga de la absorción y secreción de nutrientes e iones;

la absorción (**B**) ocurre desde el exterior hacia el interior, y está dominada por el transporte de Na^+ , y la secreción (**C**), ocurre en sentido contrario, desde el intersticio hacia el lumen, y está regulada principalmente por Cl^- . El CFTR, insertado en la membrana apical, actúa como principal transportador de iones Cl^- hacia el lumen. El transporte de H_2O ocurre en ambas direcciones de manera pasiva, por difusión, o con la ayuda de las proteínas transportadoras acuaporinas (“AQP”). Figura extraída de Saint-Criq *et al* 2017 [14].

3. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN WT-CFTR

Cómo se ha descrito en la sección 1, la proteína CFTR se expresa en los tejidos epiteliales del organismo, por lo que está involucrada en la función de todas las glándulas exocrinas (sudoríparas, respiratorias, páncreas, hígado y vía biliar, intestino y sistema reproductor) [15]. Sin embargo, presentan un papel regulador especialmente importante en los tejidos donde hay mayor expresión de ARNm-CFTR, los epitelios respiratorio y pancreático.

En el sistema respiratorio, el canal CFTR regula la composición del líquido de superficie de las vías aéreas (LSVA). Éste, se encuentra por encima de la membrana apical, formando una capa de unos 10 μm de grosor y se compone de la secreción mucosa y del líquido periciliar (**Figura 3**). La capa LSVA en su conjunto actúa como barrera bioquímica para evitar la entrada de bacterias y sustancias nocivas al torrente sanguíneo [16]; las partículas tóxicas quedan atrapadas en el mucus del LSVA, impidiendo su entrada a tejidos más profundos. El aclaramiento mucociliar, el proceso por el que el LSVA se limpia y se remueve, depende del movimiento ciliar (mediante los cilios de las células ciliadas) y la hidratación epitelial, regulada por CFTR [17].

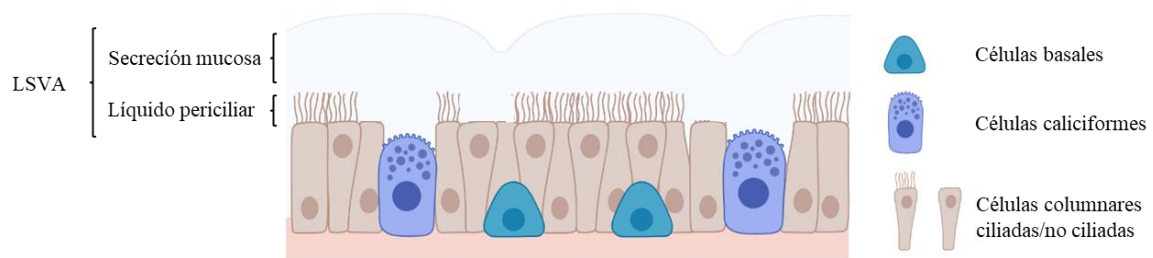


Figura 3. Tipos celulares del epitelio respiratorio. El epitelio respiratorio se encuentra formado, principalmente por células columnares, ciliadas o no ciliadas. Las células columnares son las que dan sostén al epitelio, permiten la absorción de nutrientes y actúan como barrera protectora de agentes externos. Las células ciliadas, mediante el movimiento de sus cilios, se encargan de la limpieza de bacterias y partículas potencialmente nocivas que quedan atrapadas en el LSVA. También encontramos células no columnares, que presentan distintas funciones. Las células caliciformes son las productoras del mucus de la capa de LSVA, que impedirá la entrada de patógenos externos. Y las células basales, sostén del epitelio respiratorio, son células pluripotenciales con capacidad de diferenciarse a caliciformes y ciliadas. Figura de elaboración propia.

Algunos estudios indican que el canal CFTR también participaría en la regulación de la actividad de otras proteínas transportadoras de iones. Por ejemplo, regula los canales SLC26 (canal de Cl^-), CaCCs (canal de Ca^{2+}) y canales de Na^+ para mantener la hidratación epitelial y el aclaramiento de las vías respiratorias [18].

El páncreas es uno de los órganos con mayor expresión de CFTR. El páncreas exocrino, se encarga de la secreción pancreática, necesaria para regular la digestión enzimática. La proteína CFTR se expresa en las células ductales del páncreas exocrino y regula la secreción de Na^+ y HCO_3^- . La concentración de HCO_3^- es esencial para obtener un pH alcalino en las secreciones pancreáticas y controlar la neutralización de las enzimas digestivas del páncreas.

La proteína CFTR al localizarse en diferentes tejidos, su disfunción da lugar a una sintomatología muy amplia (sección 4 y **Tabla 1**).

4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE FQ

4.1 Enfermedad respiratoria

La presentación clínica de los pacientes con FQ suele ser multiorgánica, siendo la afectación pulmonar la principal causa de morbilidad y mortalidad. La barrera paracelular formada por las *tight junctions* se ve alterada en las células que expresan las variantes patogénicas de *CFTR* [19]. Esto, permite el acceso de partículas potencialmente dañinas hacia el intersticio. La disfunción del transporte de iones y agua junto con la disfunción de la barrera paracelular, deriva, en primera instancia, en la deshidratación del tejido epitelial y a la alteración en la composición del LSVA [20, 21]. Esto, conlleva a la reducción de actividad microbiana y dificultad en la limpieza mucociliar. La alteración en el aclaramiento del LSVA, da lugar a la acumulación de secreciones en las vías respiratorias, que quedan obstruidas. Se crea un ambiente favorable a recurrentes infecciones pulmonares por microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* los más comunes). Las infecciones, producen una respuesta inflamatoria excesiva [22, 23] caracterizada por una elevada presencia de neutrófilos. La cronificación de la inflamación, infección y obstrucción da lugar a una enfermedad pulmonar crónica con daños en la integridad del tejido respiratorio, múltiples bronquiectasias e insuficiencia pulmonar que deriva en fallo respiratorio irreversible [16] (**Figura 4a**).

4.2 Insuficiencia pancreática

La insuficiencia pancreática (IP) es la segunda característica fenotípica más recurrente entre pacientes con FQ. En el páncreas, como ya se ha mencionado, la proteína CFTR se encuentra en las células ductales proximales regulando el intercambio iónico $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. Ya en la etapa

neonatal, se observan desordenes derivados de la desregulación de CFTR en el páncreas [24]. La disfunción de CFTR produce una secreción pancreática con elevada concentración de proteínas, que acaban depositándose en los conductos pancreáticos y obstruyéndolos. La actividad enzimática queda disrumpida, generando malabsorción y problemas gastrointestinales y nutricionales. El parénquima acinar se destruye y se sustituye por tejido fibroso. Todas estas alteraciones acaban resultando en IP irreversible (**Figura 4b**).

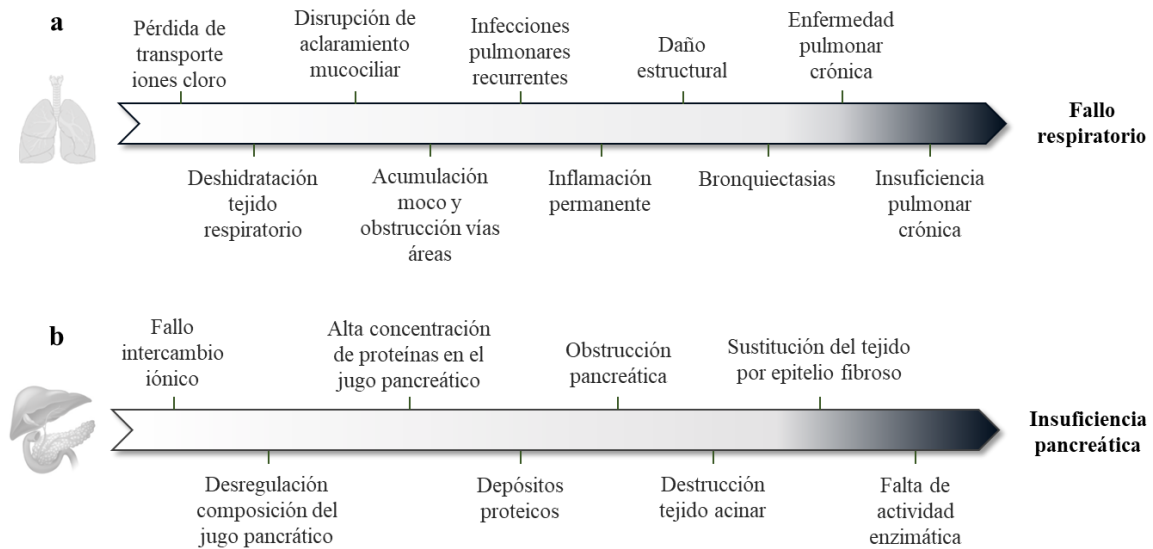


Figura 4. Resumen y evolución de las enfermedades respiratoria y pancreática en pacientes FQ. Figura adaptada de Nelson L Turcios *et al* 2020 [16].

4.3 Otras afectaciones

Debido a la amplia expresión de la proteína CFTR en el organismo, diversos tejidos, sistemas y órganos también se ven afectados cuando se disrumpe la actividad de CFTR (**Tabla 1**). Entre las disfunciones observadas, cabe destacar el íleo meconial, una obstrucción intestinal que puede derivar en necrosis o perforación en casos graves y se presenta en el 15-20% de los casos de FQ [25]; malabsorción de nutrientes, que causa déficits nutricionales en pacientes FQ; ausencia congénita de vasos deferentes en varones, que provoca infertilidad, y diabetes derivada de FQ, cuya frecuencia se ve aumentada en pacientes de edad más adulta.

Tejido, sistema o órgano	Disfunción
Intestino	Íleo meconial, malabsorción de nutrientes, inflamación intestinal, disbiosis, prolapso rectal, obstrucción distal intestinal
Páncreas endocrino	Diabetes derivada de FQ

Hígado	Cirrosis biliar, circulación entereopática alterada, cálculos biliares
Huesos	Osteoporosis, osteoartropatía hipertrófica
Sistema reproductor	Ausencia de vasos deferentes (masculino) Anormalidades en el mucus cervical (femenino)
Riñón	Cálculos urinarios
Glándulas sudoríparas	Reabsorción de iones interrumpida → pérdida elevada de Na ⁺ y Cl ⁻ en sudor → deshidratación

Tabla 1. Resumen de alteraciones en el organismo debidas a la disfuncionalidad de CFTR. Tabla de elaboración propia; con referencias [26-29].

5. GENES Y FACTORES AMBIENTALES MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD DE FQ

La variabilidad fenotípica observada en pacientes FQ, sugiere la presencia de factores modificadores de la enfermedad. Se calcula que la gravedad de la enfermedad pulmonar, principal característica de la FQ, podría verse influida en un 50% por genes modificadores [30, 31] relacionados con la respuesta inmune y/o factores inflamatorios como el factor de crecimiento transformante β (TGF β) o la interleucina 8 (IL-8) [32]. Otras características fenotípicas secundarias en la FQ, como la insuficiencia pancreática exocrina, diabetes, obstrucción intestinal o factores nutricionales, también se verían afectados por genes modificadores [33, 34], factores epigenéticos y ambientales [35-38].

6. DIAGNÓSTICO DE FQ

En la actualidad, la mayoría de países aplican el programa de cribado neonatal para la FQ y, por lo tanto, los niños afectados son diagnosticados en una fase casi siempre asintomática. El estudio, se inicia con la determinación de la tripsina inmunoreactiva (**TIR**) en una muestra de sangre del talón a los 2 – 3 días de vida. El estudio genético de variantes patogénicas y el análisis de los valores de proteína asociada pancreática (**PAP**), son los estudios iniciales complementarios a TIR. Dependiendo de la población y del protocolo, se establecen diferentes estrategias diagnósticas: TIR/TIR/ADN; TIR/ADN o TIR/PAP/ADN. Si el resultado es positivo, se deriva al recién nacido a la unidad de FQ para realizar la prueba del sudor. La prueba del sudor se basa en la determinación de la concentración de Cl⁻ en sudor y es el “patrón de oro” del diagnóstico de la FQ. La prueba se clasifica como “normal” (Cl⁻ < 30 mmol/l), “valor intermedio” (Cl⁻ = 30 – 59

mmol/l) o “positiva” ($Cl^- \geq 60$ mmol/l). Aquellos pacientes en los que persisten valores intermedios, deben ser estudiados cuidadosamente, incluyendo un estudio genético ampliado y la repetición de la prueba del sudor a los 6 meses. En aquellos países o regiones que no disponen del programa de cribado, la presentación de una infección respiratoria y/o neumonías recurrentes y/o desnutrición, es lo que deriva en sospecha de FQ. La mayor parte de los casos, suelen diagnosticarse en los primeros años de vida [39].

7. VARIANTES PATOGÉNICAS EN EL GEN *CFTR*

Hasta el presente, se han descrito alrededor de 2100 variantes patogénicas a lo largo de todo el gen *CFTR* [40]. La mayoría de variantes causantes de la enfermedad son variantes puntuales que afectan a un solo nucleótido (91%): (i) variantes con cambio de sentido, *missense*, (cambio en una de las bases que produce un codón y aminoácidos distintos al esperado), (ii) variantes de parada, *nonsense*, (se introduce un codón de terminación prematuro), (iii) deleciones/inserciones con cambio de pauta de lectura, *frameshit*, o (iv) sin cambio de pauta, *in-frame*, (v) cambios que afectan al procesamiento del ARN, *splicing* y (vi) variantes que producen la pérdida de un aminoácido. También encontramos grandes inserciones/deleciones que pueden abarcar más de un exón (2.6% de los casos) y, en un porcentaje muy reducido (0,8%), variantes patogénicas en el promotor del gen *CFTR* [41, 42].

7.1 Clasificación de las variantes según el defecto que producen en la proteína CFTR

Las variantes patogénicas en *CFTR* se han clasificado dependiendo del defecto que produzcan en la proteína CFTR. Así pues, encontramos 7 grupos, I-VII. Las variantes de clase I presentan un codón de terminación (o STOP) prematuro (*Premature Termination Codon*, PTC) (11% pacientes) [40], por lo que la proteína CFTR producida es muy inestable y se degrada, o ésta es ausente. También se incluyen dentro de la clase I las inserciones y deleciones que cambian la pauta de lectura causando ausencia total de proteína. Algunos autores subclasifican las variantes de clase I en Ia y Ib. Ia serían las grandes deleciones del gen *CFTR*, por lo que no encontramos ARNm. Más recientemente, esta clase se ha clasificado cómo VII (ver más abajo). La clase Ib (frecuentemente clasificada simplemente como clase I), son las variantes sin sentido que presentan un codón STOP prematuro [43]. Las variantes de clase II, son aquellas en dónde el procesamiento y plegamiento de la proteína es defectuoso. La mayoría de los péptidos anormales son retenidos en el RE, reconocidos como aberrantes por los sistemas de calidad de control de la propia célula y degradados por el sistema ubiquitina-proteosoma [44-46]. Dentro de esta clase, encontramos la variante patogénica más frecuente en FQ, F508del (50 – 78% de los alelos FQ). Las variantes de clase III generan proteínas maduras que se transportan hacia la membrana plasmática, pero con alteraciones en los dominios NBD o R. Estas alteraciones producen desde una leve reducción de la apertura del canal hasta una pérdida grave de función. Las variantes de

clase IV presentan una proteína con alteraciones en la conductancia [47, 48]. La clase V da lugar a una producción disminuida de proteína funcional debido a un *splicing* alternativo en *CFTR* o anormalidades *splicing* [49, 50]. Las variantes de clase VI provocan una proteína funcional, pero con una conformación inestable [51], por lo que son rápidamente degradadas por endocitosis [52]. En la clase VI se observan menores cantidades de proteína en la superficie celular [51, 52]. Por último, las variantes clasificadas como clase VII son las que presentan grandes deleciones en el gen *CFTR*.

Las variantes de clases I, II, III y VII se asocian a fenotipos clínicamente graves, con insuficiencia pancreática y enfermedad pulmonar. Por ello, también se denominan variantes de función mínima. Por otro lado, las variantes de clase IV, V y VI permiten el transporte residual de Cl⁻ y se asocian a fenotipos FQ más leves, con suficiencia pancreática. También se denominan variantes de función residual [41, 53].

7.2 Clasificación de las variantes según *theratype*

En los últimos años, ha aparecido una categorización alternativa a los grupos I-VII: la clasificación de las variantes *CFTR* por *theratype*, es decir, dependiente de la respuesta funcional y bioquímica hacia los fármacos moduladores (ver sección 8.2). Mediante los *theratypes*, se pueden clasificar variantes complejas, evaluar respuestas farmacológicas de variantes minoritarias o desconocidas y comparar respuestas a fármacos moduladores de variantes *CFTR* de manera individualizadas [54, 55].

8. TERAPIAS PARA FQ

8.1 Terapias clásicas para FQ

La FQ ha sido históricamente una enfermedad sin tratamiento específico. Las terapias tradicionales han ido dirigidas a tratar las consecuencias derivadas de la disfuncionalidad de la proteína CFTR. Así pues, los tratamientos clásicos se han centrado en aumentar el aclaramiento mucociliar y controlar las recurrentes infecciones pulmonares entre otros. Agentes mucolíticos, broncodilatadores, compuestos anti-microbianos, antiinflamatorios, soporte nutricional y técnicas de fisioterapia respiratoria han sido utilizados para tratar la sintomatología clásica del paciente con FQ. A pesar de que la FQ continúa siendo una enfermedad incurable, los tratamientos y la creación de unidades de FQ con equipos multisistémicos especializados, fundamentalmente en países desarrollados, han proporcionado un incremento significativo de la esperanza y la calidad de vida en pacientes FQ [56].

8.2 Fármacos moduladores del CFTR

Para abordar el defecto principal de la enfermedad FQ, nuevas estrategias terapéuticas se han desarrollado en los últimos 10 años. La más eficaz hasta la fecha, ha sido el uso de fármacos moduladores, dirigidos a restablecer los defectos iniciales de la proteína CFTR. Estas pequeñas moléculas químicas pueden clasificarse según su actuación sobre la proteína CFTR (**Figura 6**).

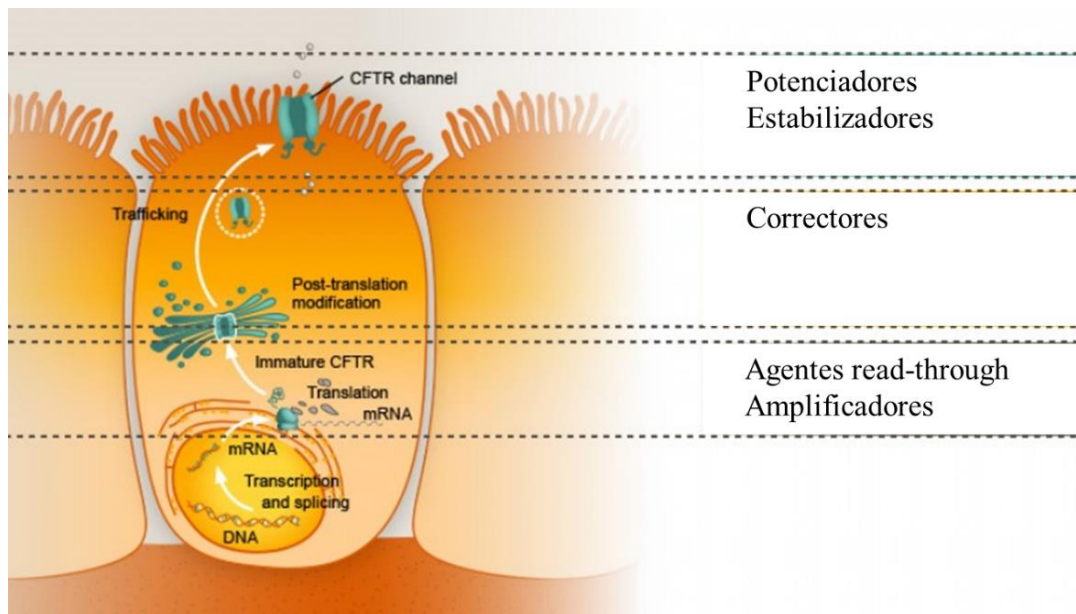


Figura 6. Clasificación de los moduladores según la actuación que presentan hacia la proteína CFTR: promover la traducción o translación de proteína (agentes *read-through* y amplificadores), favorecer modificaciones post-traslacionales y/o el tráfico proteico (correctores) y mejorar la conductancia y/o la estabilidad conformacional en la membrana plasmática (potenciadores y estabilizadores). Modificado [57].

A continuación, se detallan los moduladores que han demostrado, en la práctica clínica, una disminución de los valores de Cl^- en sudor, mejoras en la función respiratoria, una reducción del número de exacerbaciones respiratorias, un incremento en el índice de masa corporal y, como consecuencia, una mejor calidad de vida. Estas moléculas han sido aprobadas por las agencias *Food and Drug Administration* (FDA) (Estados Unidos) y *European Medicines Agency* (EMA) (Europa), pero sólo para determinados genotipos de FQ. La aplicación de estas moléculas en la práctica clínica ha supuesto reducir la gravedad clínica y ralentizar el progreso de la enfermedad.

8.2.1 Potenciadores

El primer grupo de moduladores, son moléculas potenciadoras de la conductancia. Éstas, incrementan la probabilidad de apertura del canal (P_o) CFTR y la conductancia de cada uno de ellos. Las moléculas potenciadoras van dirigidas a reparar los defectos de apertura (*gating*) y de regulación (clases III y IV).

VX-770 (Ivacaftor)

Dentro del grupo de las moléculas potenciadoras, se seleccionó VX-770 por su selectividad *in vitro* y su perfil farmacocinético en células bronquiales primarias en cultivo [58]. La molécula VX-770 (Ivacaftor) actúa sobre los TMDs de CFTR (ver sección 1) para ayudar a estabilizar la configuración de la proteína durante su apertura [58-60]. A pesar de que se desconocen los detalles del mecanismo de actuación de esta molécula, se ha descrito que actúa modulando las transiciones entre la conformación abierta y cerrada, e induce la apertura del canal CFTR de manera independiente de ATP [59, 61].

Después de su éxito en los ensayos clínicos-fase III (NCT01117012) [62], dónde se observaron mejoras en la función respiratoria, en los valores de la prueba del sudor y en el peso corporal en pacientes respecto al grupo placebo, Ivacaftor se aprobó por la FDA y la EMA (KALYDECO®) en 2012 para pacientes con al menos una mutación G155D (clase III) (2 – 5% del total) [63, 64].

Años después, se describió que otras variantes de clase III también podrían beneficiarse del tratamiento con KALYDECO® [65, 66]. Actualmente, la EMA aprueba el uso de este fármaco para pacientes a partir de los 4 meses de edad y que presenten una de las siguientes variantes de clase III: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N o S549R. También está aprobado su uso en pacientes mayores de 18 años que presentan la variante patogénica de clase IV, R117H [67] (**Tabla 2**).

8.2.2 Correctores

El segundo grupo de moduladores, son las moléculas correctoras, capaces de restablecer parcialmente el procesamiento y transporte de la proteína CFTR hacia la membrana apical de las células epiteliales. Van dirigidas a reparar los defectos de plegamiento de CFTR (clase II).

VX-809 (Lumacaftor)

La molécula correctora VX-809 (Lumacaftor), descrita en el año 2011, restaura los defectos de CFTR producidos por variantes como F508del (clase II), que representa el 50 – 78% alelos de FQ, según las poblaciones [68]. Algunos estudios sugieren que VX-809 actuaría como una chaperona, uniéndose a la proteína F508del-CFTR para promover su correcto plegamiento y procesamiento en el RE y posterior tráfico hacia la superficie celular. A pesar de los prometedores resultados *in vitro*, los beneficios observados en ensayo clínico-fase II (NCT00865904) de Lumacaftor para tratar a pacientes F508del/F508del, fueron mínimos [69].

Para complementar el efecto de VX-809, se probó la terapia combinada con VX-770. La sinergia de ambos moduladores hizo incrementar tanto la cantidad como la funcionalidad de la proteína F508del-CFTR en la membrana plasmática [70, 71]. Con la terapia combinada se obtuvieron mejores valores en la función respiratoria evidenciado por el aumento del flujo espiratorio forzado en un segundo (*forced expiratory volume per 1 second*, FEV₁), menor número de exacerbaciones

pulmonares y disminución de los valores de concentración de Cl^- en la prueba del sudor respecto al grupo placebo (ensayos clínicos-fase III, NCT01807923 y NCT01807949) [72, 73].

La terapia de VX-809 + VX-770 fue aprobada en el 2015 por la FDA [74] y la EMA [75] con el nombre de ORKAMBI®, para pacientes con genotipo F508del/F508del. Actualmente, la EMA aprueba el uso de ORKAMBI® para pacientes ≥ 2 años (**Tabla 2**).

VX-661 (Tezacaftor)

Posteriormente, se observó la efectividad de otra molécula correctora, VX-661 (Tezacaftor) que presentaba mayor eficacia y menores efectos adversos que VX-809. Se comprobó que la combinación de esta molécula correctora, VX-661, con el potenciador VX-770, mejoraba la función pulmonar, la calidad de vida y reducía las exacerbaciones pulmonares y los valores de la prueba del sudor de los pacientes tratados respecto al grupo placebo en ensayo clínico-fase III [76]. A partir de los resultados observados, la terapia combinada de VX-661 y VX-770 se aprobó en el año 2018, con el nombre de SYMDEKO®, por la FDA [77] y, SYMKEVI®, por la EMA [78], para pacientes F508del/F508del y heterocigotos para F508del y una variante con función residual [76]. Actualmente, la EMA tiene aprobado SYMKEVI® para pacientes ≥ 6 años. (**Tabla 2**).

VX-445 (Elexacaftor) y VX-659 (Bamocafort)

Progresando en la identificación de correctores más potentes, se evaluaron los llamados correctores de “siguiente generación”: VX-445 (Elexacaftor) y VX-659 (Bamocafort). Éstos presentan un mecanismo de acción y sitio de unión a CFTR distintos a los correctores de primera generación VX-809 y VX-661. Un estudio *in vitro* [79] demostró que la combinación de correctores de primera y segunda generación aumentaba el procesamiento, tráfico y expresión de proteína F508del-CFTR en comparación a la administración de un solo corrector [80].

Para potenciar aún más el efecto de la combinación de correctores, se añadió también el potenciador VX-770. Así pues, se realizaron distintos ensayos clínicos con la triple terapia, VX-770 + VX-661 + corrector de segunda generación (VX-445 o VX-659) en pacientes F508del/F508del y F508del/función mínima [80-82]. En ambos estudios con la triple terapia hubo un aumento significativo del FEV_1 respecto al grupo placebo (+10%), una mejora significativa en el cuestionario de síntomas respiratorios, un aumento en el índice de masa corporal y menos exacerbaciones respiratorias (- 40%). Además, se observó una disminución de la concentración de Cl^- en sudor hasta alcanzar valores intermedios [81]. Finalmente, se escogió VX-445 Elexacaftor, por presentar menos interacciones con otros fármacos. Estos resultados, fueron confirmados en el posterior ensayo clínico-fase III, con pacientes F508del/función mínima [83]. Actualmente, la triple terapia está aprobada por la FDA, con nombre TRIKAFTA® [84], para pacientes ≥ 6 años con al menos una variante F508del independientemente de cuál sea la otra

variante. La triple combinación de moduladores también fue aprobada por la EMA, con nombre KAFTRIO®, para tratar a pacientes ≥ 12 años que presenten al menos una variante F508del, independientemente de cuál sea la otra variante [85] (**Tabla 2**). Actualmente, KAFTRIO® no tiene precio de reembolso en España.

Terapia aprobada (compuesto)	Clase a tratar y edades	Año aprobación
KALYDECO® (VX-770)	<u>Clase III</u> ; G155D en combinación con G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N o S549R // ≥ 4 meses <u>Clase IV</u> ; mínimo la variante R117H // ≥ 18 años	2012
ORKAMBI® (VX-809+VX-770)	<u>Clase II</u> ; homocigotos para F508del // ≥ 2 años	2015
SYMKEVI® (VX-661+VX-770)	<u>Clase II combinada</u> ; F508del homocigotas o en combinación con variante de función residual (P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711+3A→G, S945L, S977F, R1070W, D1152 H, 2789+5G→A, 3272 26A→G, o 3849+10kbC→T) // ≥ 6 años	2018
KAFTRIO® (VX-445+VX-661+VX-770)	<u>Clase II combinada</u> ; F508del homocigotas o en combinación con otra variante // ≥ 12 años	2020

Tabla 2. Resumen de los moduladores aprobados por la EMA para uso clínico en pacientes FQ con determinados genotipos de CFTR. Tabla de elaboración propia.

A pesar de la investigación de otros compuestos farmacológicos, las únicas moléculas aprobadas por la FDA y EMA para su uso clínico han sido los moduladores descritos en el apartado anterior. Cabe destacar que, con la aparición de los compuestos moduladores y su aplicación como tratamiento farmacológico para reparar los defectos de la proteína CFTR, se estima un aumento muy significativo de la esperanza y calidad de vida para los próximos años en los países desarrollados.

A pesar de estos avances en el tratamiento para la FQ, aún hay grupos de pacientes sin posibilidades terapéuticas disponibles. Éstos, son los pacientes que presentan variantes de clase I (o clase Ib) y clase VII (o clase Ia), clase V y clase VI.

8.2.3 Agentes *read-through*

Los agentes *read-through* son compuestos moduladores que van dirigidos a tratar las variantes patogénicas de clase I (5 – 10% de los pacientes). Estas variantes producen una proteína truncada, que muchas veces es degradada por el mecanismo de regulación *nonsense mediated decay* (NMD)

[86]. Estos compuestos permiten la incorporación de un aminoácido en el sitio donde existe un codón stop prematuro y permiten continuar con la síntesis de la proteína. Inicialmente, este efecto se observó con los antibióticos aminoglucósidos y actualmente existen distintos compuestos sintéticos con efecto más específico.

PTC-124

Entre los agentes *read-through* encontramos el agente ribosomal peptidil transferasa 124, más conocido como PTC-124. Este fármaco se presenta como opción terapéutica para distintas enfermedades genéticas con variantes con codones de terminación prematuros [87] como la fibrosis quística, mucopolisacaridosis I [88], distrofia muscular de Duchenne [89, 90] o enfermedad de Miyoshi [91].

Si nos fijamos en el PTC-124 como tratamiento terapéutico para la FQ, inicialmente se comunicaron buenos resultados en modelos experimentales (en ratón [92] y en células nasales obtenidas de pacientes [93]) para la mutación de clase I más común, G542X. Sin embargo, PTC-124 mostró beneficios menos claros en ensayos clínicos en fase III: no todos los pacientes presentaron mejoras significativas de los valores FEV₁% ni en la prueba del sudor [93-95]. Debido a la heterogeneidad en los resultados presentados de los ensayos clínicos de fase III, el uso terapéutico de PTC-124 ATALUREN®, no está aprobado para la FQ [94]. Sin embargo, la EMA sí aprobó su uso en pacientes con distrofia muscular de Duchenne (TRANSLARNA®) [96-98].

ELX-02

ELX-02 es un nuevo compuesto con efecto *read-through* que, al igual que PTC-124, interactúa con el ribosoma para poder producir proteína CFTR completa en los casos donde se presenten variantes de clase I [99]. Un estudio reciente muestra la capacidad de ELX-02 en aumentar la síntesis de ARNm-CFTR y restablecer la funcionalidad de CFTR en células G542X-CFTR derivadas de pacientes [100]. Actualmente, este compuesto se encuentra en ensayo clínico-fase II (NCT04126473, NCT04135495).

8.2.4 Amplificadores

Estos compuestos moduladores son capaces de estabilizar el ARNm-CFTR, incrementando así la eficiencia de translación de proteína. Como resultado, se obtiene un aumento en la producción de CFTR [101, 102]. Los amplificadores van dirigidos al tratamiento de las variantes patogénicas de clase V pero podrían combinarse con otros moduladores para tratar otras clases de variantes. Se ha mostrado que el compuesto PTI-428 (Nesolicaftor) aumenta la producción de proteína CFTR *in vitro* [101] y potencia el efecto de los otros moduladores, VX-809 y VX-770, en mutaciones de clase II [103].

8.2.5 Estabilizadores

Los fármacos estabilizadores se unen a la proteína CFTR para estabilizar su conformación, y evitar su endocitosis, proceso que ocurre cuando las proteínas presentan una conformación inestable. Van dirigidos a tratar las variantes de clase VI. Entre los estabilizadores, N91115 (Cavosonstat) demostró aumentar la maduración de CFTR y mejorar su estabilidad en la membrana en diversos estudios *in vitro* [104]. Ninguna de las terapias con estabilizadores ha progresado por el momento hacia ensayos clínicos.

8.3 Terapias avanzadas en desarrollo

8.3.1 Terapia génica

Para el grupo de pacientes que presentan ausencia total de ARNm-*CFTR* (clase VII), varios estudios se han centrado en la introducción de ADN, para suplir al gen defectuoso. Para la introducción génica, se han probado distintos sistemas de vectores [105-107], siendo la terapia con vectores antivirales la única que ha llegado a ensayo clínico (fase IIb, NCT01621867) [108, 109]. A pesar de las grandes expectativas generadas por los resultados obtenidos *in vitro*, los beneficios observados en la función respiratoria en los ensayos clínicos hasta el momento, han sido modestos [110]. Los mayores obstáculos de la terapia génica son, primero, la liberación del producto génico en las células epiteliales del sistema respiratorio debido a que las secreciones mucosas, las respuestas inmunes pulmonares y el aclaramiento mucociliar se presentan como barreras difíciles de superar. Segundo, los vectores antivirales utilizados en los ensayos clínicos no presentan tropismo pulmonar, por lo que requieren de una envoltura de proteínas para facilitar la transferencia génica al pulmón [109]. Y aunque, de liposomas y nanopartículas, que han demostrado una administración segura pero poco eficiente en la liberación de ácidos nucleicos.

8.3.2 Edición génica

Otra opción que se está investigando para tratar a pacientes con FQ es la edición génica de *CFTR*; mientras que la terapia génica consiste en la incorporación de un gen normal para sustituir la función del gen defectuoso, la edición génica implica la reparación del gen endógeno defectuoso, a nivel de ADN. La técnica de CRISPR/Cas9 se ha mostrado eficaz en producir proteína CFTR funcional, en un modelo celular derivado de células de pacientes [111, 112] y en células pluripotenciales inducidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) [113-115]. A pesar de los resultados obtenidos *in vitro*, esta terapia es aún experimental y no está exenta de riesgos que deben tenerse en cuenta al transferir dicha experimentación a los pacientes.

9. MODELOS CELULARES *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE CFTR

El rango de respuesta farmacológica a los moduladores observado entre pacientes, incluso entre aquellos que comparten variantes de la misma clase funcional, puede ser diferente [62, 116-119]; la eficacia farmacológica puede variar según factores genéticos y ambientales. Los perfiles farmacocinéticos/farmacodinámicos que dependen de la edad, la dieta y el peso en cada paciente también parecen influir en las respuestas farmacológicas [120]. Para poder estudiar las respuestas funcionales de CFTR a los distintos fármacos moduladores, actuales o en desarrollo, es conveniente establecer pruebas *in vitro* para valorar la eficacia farmacológica en cada paciente. También estos estudios son de especial relevancia en pacientes sin opción terapéutica actual disponible. Se espera, en los próximos años, la aparición de nuevas propuestas terapéuticas que se deberán validar en modelos experimentales. Dado el alto coste que suponen las terapias con moduladores, es necesario establecer pruebas *in vitro* previas que avalen la terapia en aquellos pacientes sin indicación de acuerdo a su genotipo. Todos estos contextos, conllevan la necesidad de aplicar modelos celulares para evaluar la función de CFTR de manera más personalizada.

Para ello, en los últimos años se han desarrollado varios ensayos funcionales de CFTR utilizando células derivadas de pacientes. Entre ellos, cabe destacar el cultivo de “mini” órganos intestinales, organoides, y los distintos modelos con células del sistema respiratorio.

9.1 Organoides intestinales

En el año 2009, se estableció por primera vez el cultivo primario de organoides intestinales a partir de biopsias rectales humanas. Los organoides son estructuras tridimensionales que crecen en cultivo a partir de células pluripotenciales y que mimetizan la misma estructura y función que un órgano vivo. Para desarrollar organoides intestinales *in vitro*, se deben aislar las células pluripotenciales Lgr5+ encontradas en las llamadas criptas intestinales o de Lieberkhun. Una vez se aíslan y se siembran en cultivo, se autoorganizan y producen las células proliferativas indiferenciadas que, a su vez, se desarrollan en tres tipos celulares intestinales diferenciadas: enterocitos, células caliciformes y enteroendocrinas [121] (**Figura 7**). Las células caliciformes, productoras de moco, protegen e hidratan el epitelio. Las células enteroendocrinas producen hormonas intestinales encargadas de la digestión y la absorción de alimentos. Los enterocitos participan en la absorción de nutrientes y en el transporte de agua y electrolitos hacia la luz intestinal.

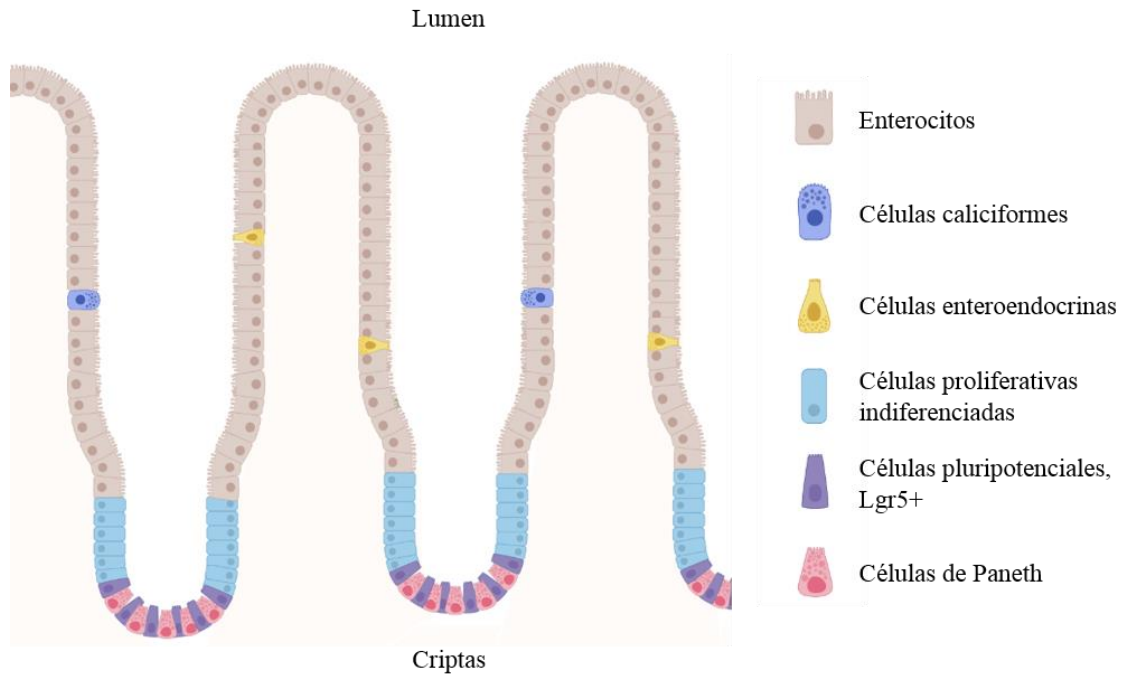


Figura 7. Estructura y composición del tejido epitelial intestinal. El epitelio intestinal presenta capacidad de auto-renovación gracias a las células pluripotenciales Lgr5+. Estas células, se encuentran en las criptas intestinales, entre células de Paneth, secretoras de sustancias antimicrobianas. Las células pluripotenciales Lgr5+ dan lugar a células proliferativas indiferenciadas. Éstas, se dividen y se diferencian en células intestinales completamente diferenciadas: células caliciformes, células enteroendocrinas y enterocitos [122]. Figura de elaboración propia.

Una vez se ha establecido el cultivo de organoides intestinales, se debe mantener con medios condicionados, necesarios para el continuo desarrollo y crecimiento de las criptas. Los medios condicionados son necesarios en los cultivos de células madre y son aquellos que presentan metabolitos, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular secretados por el cultivo de líneas celulares enriquecidas. Para el cultivo de los organoides intestinales, son necesarios medios condicionados producidos con señales Wnt+, R-spondin 1 y Noggin. Wnt+ es imprescindible para la proliferación de las criptas intestinales. R-spondin 1, agonista de Wnt+, induce hiperplasia de las criptas *in vivo* y Noggin induce la expansión del número de criptas. Se ha demostrado que estos cultivos pueden mantenerse durante 1 año y medio sin perder las características de pluripotencialidad. Adicionalmente, se necesita el uso de una matriz rica en laminina (Matrigel), como soporte del crecimiento de los organoides.

En el año 2013, se observó que los organoides intestinales pueden utilizarse para estudiar la funcionalidad de la proteína CFTR [123]. Al incubar los organoides con el compuesto forskolina, que aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), se activa el transporte de Cl⁻ por la proteína WT-CFTR. Al presentar la membrana apical hacia la zona interior de los organoides, cuando el canal CFTR se estimula con forskolina, el transporte de Cl⁻ se realiza hacia

el interior, hinchando los organoides. Por ello, este ensayo se conoce en inglés como *forskolin induced swelling* (FIS).

Se observó que los organoides intestinales derivados de pacientes FQ presentan un FIS mucho menor que los WT-CFTR después de 60 minutos de incubación con forskolina. Y más importante, cuando los organoides de pacientes con FQ son incubados con distintos compuestos moduladores, la función de la proteína CFTR mutada se ve restaurada [123, 124].

Posteriormente, otros artículos científicos validaron el ensayo FIS en organoides intestinales para estudiar la funcionalidad de la proteína CFTR. Entre ellos, un artículo demuestra la correlación entre el ensayo FIS y la concentración de Cl⁻ en sudor [125]. En el mismo artículo, se observa que los organoides de pacientes que presentan valores bajos en el ensayo FIS, presentan mayor afectación de la enfermedad (insuficiencia pancreática frecuente y menor capacidad pulmonar). Así pues, este estudio postula que los valores FIS pueden servir como un factor adicional para clasificar a los pacientes según su gravedad clínica.

También se ha podido correlacionar la respuesta clínica a moduladores con los valores del ensayo FIS [126]. Estos resultados demuestran que el ensayo FIS puede predecir la respuesta a moduladores en pacientes con FQ y valorar la eficacia de nuevos fármacos en fase preclínica.

A pesar de las dificultades que conlleva su cultivo (ya sea larga duración, coste elevado y gran especialización técnica entre otros), el ensayo FIS en organoides intestinales primarios es el estudio funcional de CFTR más validado y aceptado hasta la fecha [127].

9.2 Modelos respiratorios

Con el fin de estudiar la función de CFTR específicamente en el epitelio respiratorio, se han estudiado modelos *in vitro* a partir de células pulmonares, traqueo-bronquiales y nasales [128] (**Tabla 3**). Sachs y colaboradores establecieron organoides del sistema respiratorio a partir de células pluripotenciales del tejido pulmonar [129]. Éstos, pueden utilizarse para el estudio de CFTR mediante el ensayo FIS [130]. Debido a la dificultad en la obtención de la muestra, es una técnica poco utilizada. Por otro lado, el cultivo en *air liquid interface* (ALI) de células bronquiales induce la polaridad epitelial y permite estudios de funcionalidad de CFTR mediante análisis electrofisiológico; las técnicas de *patch clamp* y *Ussing chamber* permiten analizar el intercambio iónico entre membranas epiteliales de células cultivadas en ALI [131, 132]. Las células bronquiales pueden obtenerse mediante técnicas invasivas: biopsias, raspados bronquiales o lavados bronquio alveolares (*bronchoalveolar lavage*, BAL). Por último, encontramos los modelos con células nasales. Éstas, son las de más fácil procesamiento dado que se obtienen mediante un raspado o curetaje nasal, realizado sin anestesia ni preparación previa del paciente. A partir de células epiteliales nasales, se ha establecido el cultivo en ALI para realizar estudios

electrofisiológicos [133, 134] y la formación de esferas, llamadas nasoesferas, las cuales son estimuladas con forskolina para activar el canal de CFTR. Las nasoesferas son células epiteliales nasales que se unen entre sí *in vitro*, de manera esporádica o inducida, y presentan fluidos en su interior. Para la formación inducida de esferas, primero se expanden las células primarias nasales mediante co-cultivo con fibroblastos irradiados, hasta su confluencia. Se recogen las células nasales y se cultivan en Matrigel para inducir la agregación de forma esférica, con la membrana apical orientada hacia el interior. Este protocolo, requiere de un proceso de ~ 20 días antes de realizar el ensayo funcional de CFTR con forskolina [135, 136]. Por otro lado, la formación esférica esporádica se produce al cultivar células nasales primarias sin disrumpir la lámina epitelial. Estas nasoesferas, al contrario que las anteriores, presentan su zona apical orientada hacia el exterior. Este modelo *in vitro*, publicado por primera vez en el 2017 [137] presenta la ventaja que en tan solo siete días se puede realizar el estudio funcional de CFTR con forskolina.

Célula primaria (obtención)	Cultivo <i>in vitro</i>	Particularidades	Ensayo funcional	Ref.
Pulmonar (biopsia)	Organoides respiratorios	<ul style="list-style-type: none"> Reproducción de estructura y función pulmonar 	Activación de CFTR mediante forskolina	[130]
Traqueo-bronquial (biopsias/cepillado/BAL)	ALI	<ul style="list-style-type: none"> Expansión previa en co-cultivo con fibroblastos <ul style="list-style-type: none"> Inducción polarización epitelial 	Electrofisiológico (Ussing chamber)	[138] [139] [131]
Nasal (cepillado/curetaje)	ALI	<ul style="list-style-type: none"> Expansión previa en co-cultivo con fibroblastos <ul style="list-style-type: none"> Inducción polarización epitelial 	Electrofisiológico (Ussing chamber/Patch clamp)	[140] [133]
	Nasoesferas “apical-out”	<ul style="list-style-type: none"> Formación de esferas de manera esporádica <ul style="list-style-type: none"> CFTR transporta hacia el exterior 	Activación de CFTR mediante forskolina	[137] [141] [‡]
	Nasoesferas “apical-in”	<ul style="list-style-type: none"> Expansión previa mediante co-cultivo con fibroblastos <ul style="list-style-type: none"> Inducción formación esferas CFTR transporta hacia el interior 	Activación de CFTR mediante forskolina	[135, 136]

Tabla 3. Resumen de los modelos *in vitro* con células primarias humanas para el estudio de la función de CFTR en el epitelio respiratorio. [‡]Artículo propio. Tabla de elaboración propia.

III – Hipótesis y Objetivo

HIPÓTESIS

El estudio funcional en nasoesferas de pacientes con FQ puede resultar válido para evaluar la funcionalidad de CFTR a nivel respiratorio. Este ensayo, permitiría analizar la respuesta farmacológica de moduladores de CFTR de manera personalizada, obteniendo resultados similares a otro método previamente validado, los organoides intestinales. Los biomarcadores celulares obtenidos del estudio funcional en nasoesferas, podrían ser utilizados como herramienta inicial y/o complementaria a otros estudios funcionales de CFTR más complejos e invasivos.

OBJETIVOS

Objetivo 1. Validar el estudio funcional en nasoesferas como método biomarcador de la funcionalidad de CFTR y de la respuesta a fármacos moduladores en pacientes con FQ.

Objetivo 2. Determinar la expresión de la proteína CFTR en nasoesferas.

Objetivo 3. Comparar los resultados obtenidos en los ensayos funcionales en nasoesferas y en organoides intestinales, en muestras de los mismos pacientes con FQ.

Objetivo 4. Analizar la respuesta a distintos moduladores en el estudio funcional de nasoesferas de pacientes con FQ con diversos genotipos.

IV – Material y Métodos

1. PACIENTES E INDIVIDUOS CONTROLES INCLUIDOS EN LOS ESTUDIOS Y ASPECTOS ÉTICOS

Todo el material biológico se obtuvo en la Unitat de Fibrosis Quística (UFQ) del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) y fueron procesadas en el Vall Hebron Institut de Recerca (VHIR), en el caso de células nasales, o en el Vall Hebron Institut d' Oncologia (VHIO), en el caso de biopsias rectales, en colaboración con el grupo de *Stem Cells*. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron (PR(AMI)291/2017). Todos los pacientes o representantes legales de los pacientes, en caso de ser menores de 18 años, firmaron consentimientos informados.

Los genotipos y características clínicas principales de los pacientes incluidos en el apartado de Resultados, se describen en la **Tabla 4** (al final de **Material y Métodos**). En total se han estudiado 7 individuos controles y 18 pacientes con FQ.

2. NASOESFERAS

El protocolo de obtención, cultivo y tinción de células nasales, originalmente descrito por Guimbellot *et al* 2017 [137] fue modificado y expandido en el trabajo de tesis y publicado en Calucho M *et al* 2021 [141] (adjuntado en **Anexos**).

2.1 Extracción células epiteliales nasales humanas

Se realizan dos raspados por orificio nasal con curetas ASL, Arlington Probe. Las muestras se recogen en tubos Falcon de 15 ml en medio completo: *Bronchial Epithelial Complete Medium* (BEpiCM, ScienceCell Research Laboratories) + 5 μ M Y-27632 inhibidor ROCK (StemCell 72304) + 1 μ M A83-01 (Sigma-Aldrich SML0788) + 1 μ M DMH-1 (Selleckchem S7146).

2.2 Cultivo de nasoesferas a partir de células epiteliales nasales humanas

Para que se desprendan las células epiteliales nasales recogidas, las curetas se agitan dentro del tubo de recogida y se centrifuga (400 x g, 4° C, 5 minutos). A partir de aquí, las nasoesferas son cultivadas en dos condiciones distintas, a las que llamaremos condición 1 (C1) y condición 2 (C2).

Para la C1, después de centrifugar, se descarta el sobrenadante y se siembra el pellet (~ 60 μ l – 120 μ l) en placas estándar de 24 pocillos. La placa se incuba a 37° C sin añadir más medio. Pasadas dos horas, se añade el medio de cultivo con volumen final de 750 μ l/pocillo de placa de 24 pocillos. Para la C2, el pellet obtenido se resuspende en Matrigel (Matrigel Corning® Growth Factor-Reduced) (1:1) y se siembra en pequeñas gotas en una placa de 24 pocillos estándar calentada previamente (37° C; \geq 24 horas). Se añade medio (750 μ l/pocillo). Las nasoesferas en

ambas condiciones C1 y C2, se cultivan durante 7 – 10 días antes de proceder a la realización de cualquier estudio: tinción (sin fijar), inmunofluorescencia (IF) (fijadas) o ensayo funcional de CFTR.

El medio completo se deja los primeros tres días de cultivo. En el caso de nasoesferas FQ-CFTR, el medio de los tres primeros días se suplementa con antibióticos (1:1000 gentamicina, 1:1000 fungizone). Los cambios de medio se realizan con BEpiCM (volumen final 750 – 800 µl) cada tres días. Para realizar los cambios de medio, las células, en suspensión (C1), se recogen en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y centrifugan (400 x g, 5 minutos). El pellet se recoge y se siembra en pocillos de una placa de 24 pocillos. Para C2, se aspira el medio y se añade medio nuevo.

2.3 Tinción de nasoesferas para observar estructura y tipos celulares

Materiales

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Cell Mask Orange	ThermoFisher	C10045
DRAQ5	Biostatus	DR50200
Calcein green	BD Bioscience	564061
Live cell imaging solution	ThermoFisher	A14291DJ

Protocolo

Las nasoesferas en C1 y C2, sin fijar, se marcan con *Cell Mask Orange* para observar la membrana plasmática y los cilios; DRAQ5 marcador de núcleos; y *calcein green* para marcar las células vivas.

- *Cell Mask Orange plasma membrane*: modificación del protocolo de la casa comercial: se preparan 1x de *Cell Mask Orange* en *Live cell imaging solution* precalentado. Se incuba 5 – 10 minutos a 37° C.
- *DRAQ5*: se incuba 15 – 30 minutos a 37° C, dilución 1 µM.
- *Calcein green*: se incuba 15 minutos a 37° C, dilución 2 – 8 µM.

Se realiza la tinción *in vivo*, observación en microscopio confocal Zeiss LSM908. Las imágenes se capturan a distintos objetivos.

2.4 Inmunofluorescencia en nasoesferas para detectar proteína CFTR

Se ha adaptado el protocolo para la inmunofluorescencia (IF) de Dekkers *et al* 2019 [142]. Descrito en Calucho M *et al* 2021 [141] (adjuntado en el **Anexo**).

Para realizar tinción de inmunofluorescencia en nasoesferas, se recogen nasoesferas cultivadas en C1, a los 8 – 10 días posteriores al inicio del cultivo.

Materiales

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Bronchial Epithelial Cell Medium (BEpiCM) – kit	ScienCell Research	3211
Paraformaldehyde (PFA) en polvo	Sigma-Aldrich	P6148-500g
Sodium hydroxide (NaOH) pellets (10M)	Sigma-Aldrich	567530
Hydrochloric acid (HCl) (10M)	Ajax FineChem	256.2.5L-PL
BSA (10g)	Sigma-Aldrich	A3059
PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, 1×)	Gibco	14190144
Tween 20 (100ml)	Sigma-Aldrich	P7949
Triton X100	Sigma-Aldrich	T8532
Fructose (100g)	Sigma-Aldrich	F0127
UltraPure Glycerol	ThermoFisher	15514011
DAPI (10mg) (RT)	ThermoFisher	D1306

Anticuerpos	Casa Comercial	Referencia
Primario	Human CFTR R Domain Antibody	R&D Systems
Secundario	Alexa Fluor 488 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research
		MAB1660-SP
		115-545-003

Preparaciones

- PFA al 4%
- D-PBS-BSA (1% (wt/vol))
- PBT (0.1% (vol/vol) (PBS+Tween))
- OWB (*Organoid washing buffer*) → 1 ml de Tritón X-100 + 2 g de BSA + 1 L de D-PBS
- *Fructose-glycerol clearing solution* → 60% (vol/vol) glicerol y 2.5M fructosa.

Protocolo

>> DÍA 1: FIJACIÓN E INCUBACIÓN ANTICUERPO PRIMARIO:

- Las nasoesferas en suspensión se transfieren a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- Se centrifugan a 400 x g durante 5 minutos, 4° C.
- Para fijar las nasoesferas, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet con PFA y se incuba 45 minutos, 4° C.
- Se centrifuga a 400g durante 5 minutos, 4° C.
- Se descarta el sobrenadante y se añade 1 ml de PBT frío
- Se incuba durante 10 minutos, 4° C.
- Se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos, 4° C.
- Descartar el sobrenadante.
- El pellet se resuspende en 400 µl OWB frío y se incuba durante 15 minutos, 4° C.
- Se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos, 4° C.

- Se descarta el sobrenadante y se añade el anticuerpo primario 1:15 *Human CFTR R Domain* (MAB1660) (volumen final=60 µl). Se incuba toda la noche a 4° C en agitación continua en un pocillo de una placa de 96 pocillos.

>> DÍA 2: INCUBACIÓN ANTICUERPO SECUNDARIO Y MONTAJE:

- Se recoge el volumen del pocillo y se transfiere a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- Se realizan 3 lavados con OWB y se centrifuga 400 x g durante 5 minutos a 4° C.
- Tras centrifugar por tercera vez, las nasoesferas se incuban 3 horas 4° C y en agitación con el anticuerpo secundario *Alexa Fluor 488* a 1:500 en un pocillo de una placa de 96 pocillos.
- Se realizan 3 lavados con OWB
- Se incuba con DAPI 1:1000, 5 minutos a temperatura ambiente
- Se realizan 3 lavados con OWB
- Se procede al montaje con el medio fructosa-glicerol y utilizando una placa de 8 pocillos (*µ-slide 8 Well*, ibidi)

Captación de imágenes por microscopía confocal para estudiar la expresión de CFTR en nasoesferas

Para poder analizar de manera detallada la estructura tridimensional de las nasoesferas, se captaron varios cortes en el eje Z (“z-stacks”) de cada nasoesfera, dependiendo del tamaño. De esta manera, se intentó obtener una imagen lo más completa posible de cada una de ellas. En total, se captan de 145 a 371 z-stacks.

2.5 Ensayo funcional en nasoesferas mediante microscopía *in vivo*

Descripción en Calucho M *et al* 2021 [141] (adjuntado en **Anexo**).

Materiales

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Bronchial Epithelial Cell Medium (BEpiCM) – Complete kit	ScienCell Research	3211
VX-809	SelleckChem	S1565
VX-770	SelleckChem	S1144
VX-661	SelleckChem	S7059
VX-445	SelleckChem	S8851
PTC-124	SelleckChem	S6003
DMSO	ThermoFisher	D12345
Forskolina	Sigma-Aldrich	F3917
Amiloride	Sigma-Aldrich	A7410
IBMX	Sigma-Aldrich	I5879
CFTR <i>inhibitor</i> -172	Sigma-Aldrich	219670

Protocolo

Las nasoesferas se mantienen en cultivo durante 8 – 10 días, cuando están completamente formadas, se procede al estudio de funcionalidad CFTR mediante microscopía *in vivo*. El día anterior del estudio de imagen, se siembran las esferas en una placa de 24 pocillos apta para microscopía (μ -Plate 24 Well Black, ibidi): se recogen las células en C1 y C2, se centrifugan ($400 \times g$, 5 minutos) y el pellet se resuspende 1:1 en Matrigel (Corning® Growth Factor-Reduced). Cuando el Matrigel se ha solidificado ($37^\circ C$, 10 minutos), se añade el medio BEpiCM (volumen final=550 μ l). Los fármacos correctores (VX-809, VX-661 y VX-445; 5 μ M) y el compuesto read-through PTC-124 (10 μ M), se incuban 24 horas antes del estudio, en medio BEpiCM.

El día del experimento *in vivo*, se preparan los demás compuestos que serán utilizados: DMSO (~ 0.1% del volumen total) como control negativo, forskolina 10 μ M, amiloride 100 μ M, IBMX 10 μ M para activar el canal CFTR (condición que llamaremos “FSK”), el fármaco potenciador VX-770 5 μ M, inhibidor de CFTR-172 10 μ M (3 horas incubación antes del experimento funcional). Siempre se realizan dos réplicas por cada condición. Por separado, se prepara una dilución de 2 - 8 μ M de *calcein green* (volumen final=50 μ l), que se incubará con las nasoesferas 15 – 30 minutos antes del experimento, $37^\circ C$.

El volumen final en cada pocillo será 800 μ l=550 μ l añadidos el día anterior + 100 μ l dilución *calcein green* + 150 μ l fármacos incubados el mismo día.

El incubador del microscopio que controla la temperatura, humedad y CO_2 , debe precalentarse una hora antes del experimento. Las condiciones para el estudio funcional *in vivo* son: $37^\circ C$, 55% humedad y 5% CO_2 .

La placa se inserta en la platina del microscopio confocal, y se seleccionan manualmente los campos que se quieren fotografiar. Se capturaron imágenes de cinco z-stacks consecutivos (a 6 μ m distancia entre ellos). Se realiza un primer ciclo de captura de imágenes de las nasoesferas en estado basal ($t=0$) y a continuación, se añade DMSO, forskolina, y VX-770 sin sacar ni mover la placa del microscopio. Se captan imágenes de los campos previamente seleccionados cada 10 minutos hasta llegar a 1 – 2 horas. Se utilizó un objetivo de 10 x 0,4. Las imágenes se capturaron en campo claro y emisión fluorescente / *calcein green* (excitación de 488 nm y emisión de 500-530 nm) (**Figura 8**). Se captaron imágenes cada 10 minutos hasta 1 o 2 horas. Las imágenes se obtuvieron a 512 x 512, 8 bits. La apertura del diafragma o *pinhole* se fijó en 33,4.

Para la captación de imágenes *in vivo* de nasoesferas derivadas de pacientes, se han utilizado varios microscopios durante el transcurso de esta tesis doctoral. Actualmente, se utiliza el microscopio confocal Zeiss LSM980. Las características necesarias para poder realizar este experimento son que el microscopio posea un incubador con control de temperatura, CO_2 y humedad, una platina motorizada, soporte para placas de 24 pocillos, poder seleccionar y guardar distintos campos y captación de campos automática y programada.

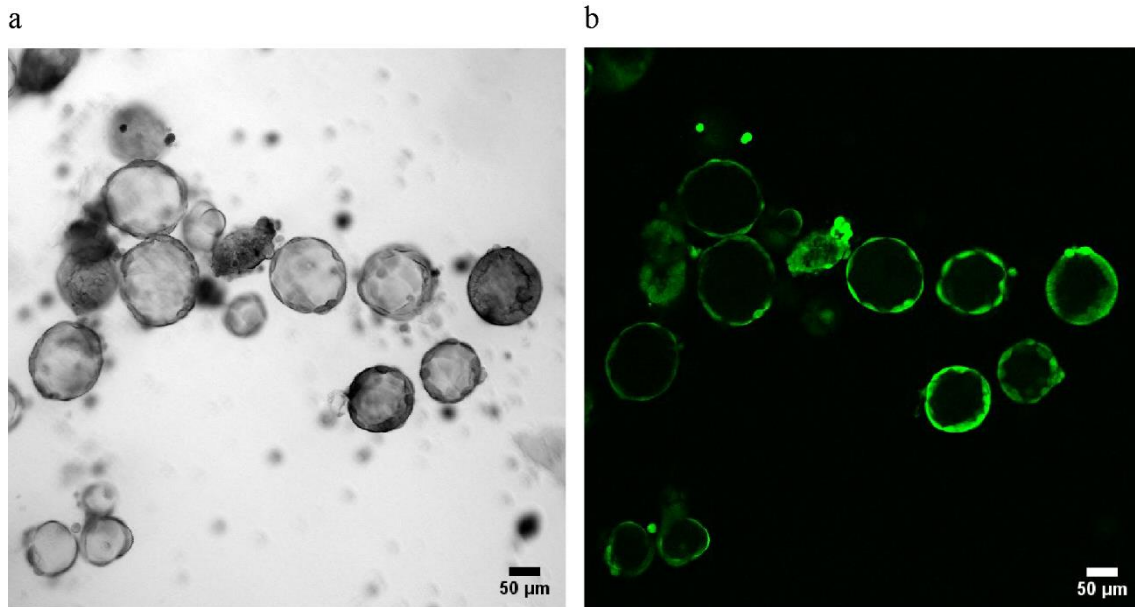


Figura 8. Captación de imágenes de nasoesferas mediante microscopía confocal durante el ensayo funcional de CFTR. Se captan imágenes del cultivo de nasoesferas mediante microscopía confocal durante el ensayo funcional. Las nasoesferas son incubadas 15 minutos antes del experimento con *calcein green*, para marcar células vivas. Una vez en el microscopio, la misma imagen de nasoesferas se capta en campo claro o *brighfield* (a) y en emisión fluorescente (b). Las imágenes captadas se utilizarán, posteriormente, para realizar el análisis de imagen.

Análisis de las imágenes

Para el análisis de las imágenes, se utiliza el software ImageJ/FIJI-64 [143]. Primero, se realiza una proyección de los cinco z-stacks capturados. Las áreas externas e internas de las nasoesferas se calculan de manera manual mediante la herramienta *Hand tool*. Se toman las medidas de las áreas en todas las imágenes captadas (cada 10 minutos) a lo largo de las horas de estudio. Con todas las áreas calculadas (μm^2), las áreas a $t=0$ se normalizaron a 1 y los valores siguientes, se calcularon respecto a su valor basal ($t=0$ minutos) [141] (Figura 9).

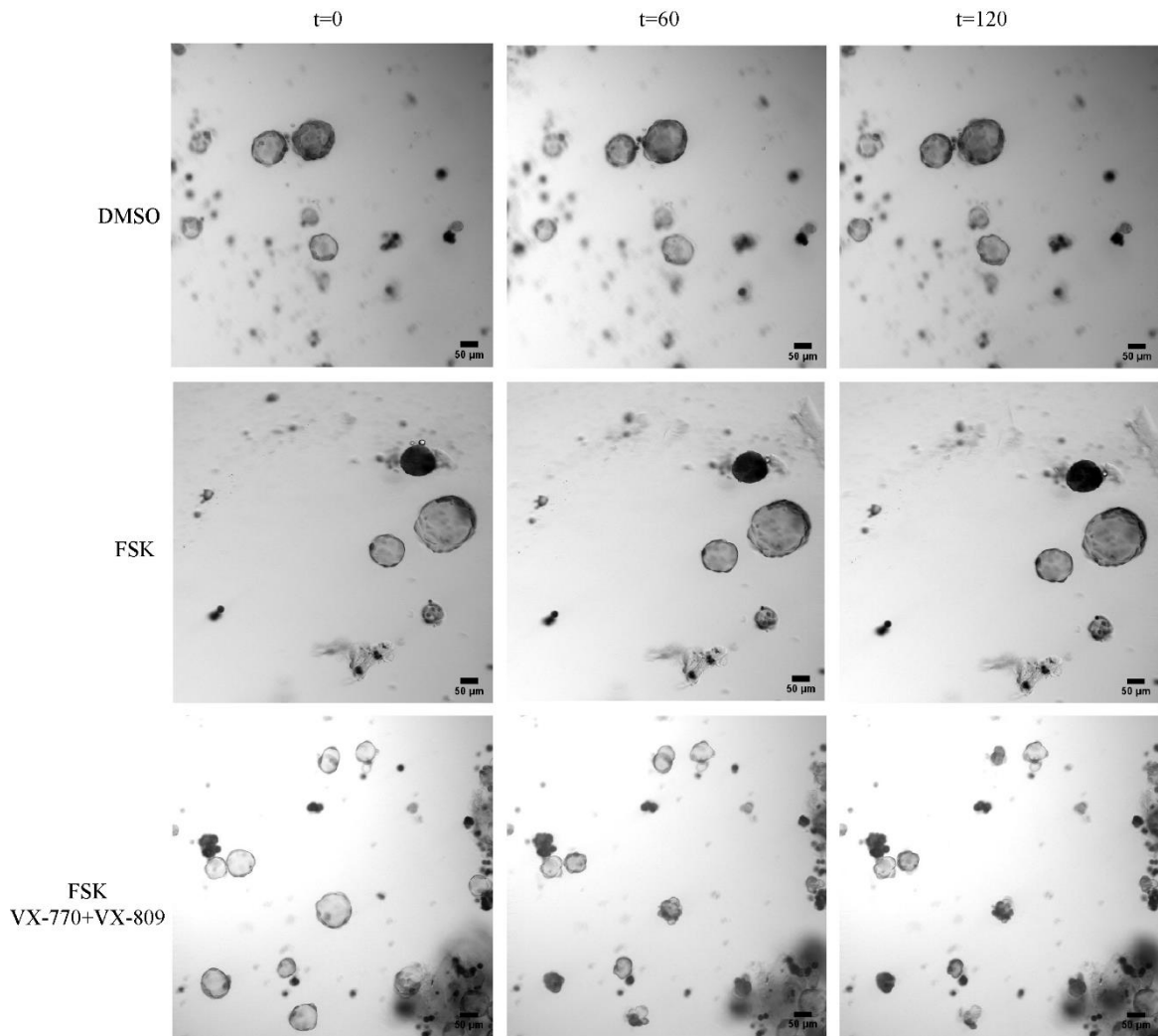


Figura 9. Análisis de imágenes del ensayo funcional de CFTR en nasoesferas de paciente F508del/F508del. Posteriormente a la captación de imágenes, se procede al análisis de los tamaños de las nasoesferas mediante el software ImageJ/FIJI. Se muestran imágenes en campo claro o *brightfield* a $t=0$ (condición basal), $t=60$ minutos y $t=120$ minutos. Las nasoesferas F508del/F508del se incubaron con el control negativo, DMSO, con forskolina, amiloride e IBMX (“FSK”) para activar los canales CFTR, y FSK más moduladores VX-770+VX-809, para restablecer la función CFTR. Se puede observar la reducción de tamaño de las nasoesferas F508del/F508del tratadas con la combinación de moduladores VX-770+VX-809, a $t=60$ y a $t=120$ min.

3. ORGANOIDES INTESTINALES

3.1 Obtención de biopsias rectales

Previo a la obtención, se aplica un micro enema para limpiar la zona. Las biopsias rectales se realizaron por personal médico del Departamento de Cirugía Pediátrica, Hospital Universitari Vall d’Hebron (HUVH), Barcelona. El tejido se obtiene a partir de biopsias rectales obtenidas

mediante succión, en un procedimiento indoloro y sin anestesia que dura aproximadamente 10 minutos.

Los pacientes deben esperar 30 – 60 minutos después de la obtención de la muestra para observar si hay algún efecto secundario a la extracción de la biopsia (ej. pequeño sangrado rectal). Los pacientes sometidos a esta técnica no presentaron ningún efecto adverso.

Se obtienen 4 – 5 biopsias por paciente de unos \approx 3 mm de diámetro y se guardan en un tubo Falcon de 50 ml con D-PBS sin Ca^+ Mg^+ y 1% Penicilina-estreptomicina, a 4° C.

3.2 Cultivo de organoides intestinales

Este protocolo se realizó en colaboración con el grupo *Stem Cells* del VHIO. Para realizar el cultivo primario de organoides intestinales, se siguen protocolos publicados anteriormente [121, 142, 144] con algunas modificaciones. Si bien las muestras son de biopsia rectal, el cultivo celular se llama comúnmente organoides intestinales.

Materiales

Reactivos	Casa Comercial	Referencia
Advanced DMEM/F-12	ThermoFisher	12634010
Penicilina-estreptomicina	ThermoFisher	15140122
Amphotericin B (Fungizone)	ThermoFisher	15290018
Kanamycin Sulfate	Gibco	15160-047
Gentamicina	ThermoFisher	15750037
Nystatin	Sigma-Aldrich	N4014
Na_2HPO_4	Fluka	71644
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich	P0662
NaCl	Sigma-Aldrich	S9888
KCl	Sigma-Aldrich	P3911
Sucrosa	Sigma-Aldrich	84100
D-Sorbitol	Sigma-Aldrich	240850
NaOH	Sigma-Aldrich	S2770
DL-dithiothreitol (DTT)	Fisher Scientific	10699530
EDTA	ThermoFisher	AM9260G
D-PBS (1X) w/o Ca^+ Mg^+	ThermoFisher	14190144
Primocin	Invivogen	ant-pm-2
Matrigel Basement Membrane Matrix LDEV-free	Corning	354234
Normocin	Invivogen	ant-rp-1
Y-27632, inhibidor ROCK	Stem Cell	72304
CHIR9902, inhibidor GSK-3	Merck	SML1046
<i>Cell recovery solution</i>	Corning	354253

Preparaciones

- Desmed (en DMEM/F-12): Penicilina-estreptomicina 40X, fungizona 25X, kanamycin 100X, gentamicina 1000X y nystatin 1000X. Guardar a 4° C.

- *Chelation solution* (en agua destilada): 5.6 mM Na₂HPO₄, 8.0 mM KH₂PO₄, 96.2 mM NaCl, 1.6 mM KCl, 43.4 mM sucrosa, 54.9 mM D-Sorbitol. Ajustamos el pH a 7 con NaOH. Guardar a 4° C. DTT 0.5 mM y EDTA 2mM se añaden justo antes del uso de *Chelation buffer*.
- Medio Basal (en *Advanced* DMEM/F-12): Penicilina-estreptomicina, HEPES 10mM, Glutamax.
- Medio completo de cultivo de organoides de colon, HISC (en *Advanced* DMEM/F-12)^a: 30% medio condicionado Wnt+ (realizado con línea celular L1Wnt3A, ATCC), 15 % medio condicionado R-spondin 1 (realizado con la línea celular 293Trspo1mCh, ATCC), 7.5% medio condicionado Noggin (realizado con la línea celular 293tnogginmCh, ATCC), suplementado con B27, N2, b-acetilcisteína, nicotinamida, EGF humano, [Leu15]-Gastrina I, prostaglandina E2, A83-01, SB202190 y Primocin. El medio completo HISC fue cedido por el grupo *Stem Cells* del VHIO, con los que se realizó una colaboración para realizar los cultivos de organoides intestinales y se realizó siguiendo protocolos previamente publicados [121, 123].

Protocolo

Las biopsias rectales se recogen en un tubo Falcon de 50 ml con 4 ml de D-PBS + 1% penicilina-estreptomicina. Se lavan varias veces en D-PBS + 1% Primocin y se dejan O/N 4° C en medio Desmed para evitar contaminaciones. Al día siguiente, se procede a la extracción de las criptas intestinales. La biopsia se trocea y se incuban los pequeños fragmentos en *chelation buffer* suplementado con DTT y EDTA (30 minutos, 4° C). El tejido se centrifuga (800 rpm, 3 minutos) y se descarta el sobrenadante. Se rellena el tubo con nuevo *chelation buffer* suplementado con EDTA y se agita el tubo para poder extraer las criptas de las biopsias. El sobrenadante se recoge en un tubo previamente humedecido con medio Medio Basal. El proceso de extracción de criptas se repite (x 2). Los sobrenadantes se centrifugan 1400 rpm 4 minutos 4° C (x 2). Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende con Matrigel (1:1) antes de sembrar pequeñas gotas (7 – 10 µl) en una placa de 24 pocillos calentada a 37° C durante mínimo 24 horas antes. Se incuba 10 minutos 37° C para dejar solidificar el Matrigel y se añade medio HISC. Los primeros días se suplementa el medio con 1:250 primocin o normocin. Se cambia el medio cada 2 – 3 días.

Aproximadamente cada 7 – 10 días, el Matrigel se debe renovar así que se realizan los pases. Para el pase de organoides, añadimos *Cell recovery solution* hasta recubrir el pocillo y dejamos 30 minutos 4° C para que se disocie el Matrigel. Pasado el tiempo de incubación, se recogen los organoides con el Matrigel en un tubo de 15 ml previamente humedecido con Basal Media y se centrifuga 1400 4 minutos 4° C. Es importante que estos pasos se realicen a temperatura de 4° C para evitar la solidificación del Matrigel. Después de la centrifugación, el sobrenadante se descarta y los organoides son disrumpidos manualmente. Se vuelve a centrifugar y el pellet es resuspendido con Matrigel (1:1) previo a su siembra en pequeñas gotas (7 – 10 µl) en una placa

de 6 pocillos previamente calentada. Se incuba 10 minutos 37° C para dejar solidificar el Matrigel y se añade medio HISC.

Cuando se establecen los organoides a partir de biopsias o se realiza un pase, el medio HISC debe suplementarse con 10 μ M Y-127 Y-27632 inhibidor ROCK y 10 μ l CHIR9902 inhibidor GSK-3 los 2 – 3 primeros días.

3.3 Experimento de imagen *in vivo* de organoides intestinales para probar diversos fármacos

Protocolo

Para realizar el experimento de análisis *in vivo*, los organoides deben estar en cultivo mínimo 3 semanas, y haberse realizado entre dos y cuatro pases Antes del experimento (24 – 48 h), se siembran los organoides en una placa de 96 pocillos apta para microscopía (5X o 10X aumentos). Para ello, se sigue el protocolo de pases. En cada pocillo, se siembran organoides disrumpidos y resuspendidos con Matrigel 1:1 en gotas de 4 μ l. Los fármacos correctores (VX-809, VX-661 y VX-445; 3 μ M) se incuban 24 h antes del experimento de microscopía en HISC (volumen final=50 μ l). Los compuestos *read-through* para mutaciones de clase I sin sentido (PTC-124 10 μ M), se incuban 48 o 24 horas antes en HISC (volumen final=50 μ l).

El día del experimento *in vivo*, se preparan los demás compuestos: DMSO (~ 0.1% del volumen total), forskolina (0.002, 0.128, 0.8, 2, 5 μ M) y el fármaco potenciador VX-770 3 μ M. Siempre se realizan dos réplicas por cada condición. 15 minutos antes del experimento, los organoides se incuban a 37° C con 2 μ M de *calcein green*.

El volumen final por cada pocillo será 105 μ l (50 μ l añadidos el día anterior + 5 μ l dilución *calcein green* + 50 μ l fármacos incubados el mismo día).

El incubador del microscopio que controla la temperatura, humedad y CO₂, debe precalentarse una hora antes del experimento *in vivo*. Las condiciones para el estudio funcional *in vivo* son: 37° C, 55% humedad y 5% CO₂.

La placa se inserta en la platina del microscopio confocal, y se seleccionan los campos que se quieren fotografiar. Se suelen captar dos imágenes por pocillo, a dos z-stacks distintos. Se realiza un primer ciclo de captura de imágenes de los organoides en estado basal (t=0) y a continuación añaden los fármacos que se incuban el mismo día (DMSO, forskolina y VX-770) sin sacar ni mover la placa del microscopio. Se utilizó un objetivo de 2.5X. Las imágenes se capturaron en campo claro y emisión fluorescente / *calcein green* (excitación de 488 nm y emisión de 500-530 nm) (**Figura 10**). Se captan imágenes de los campos previamente seleccionados cada 10 minutos hasta las 2 o 3 horas.

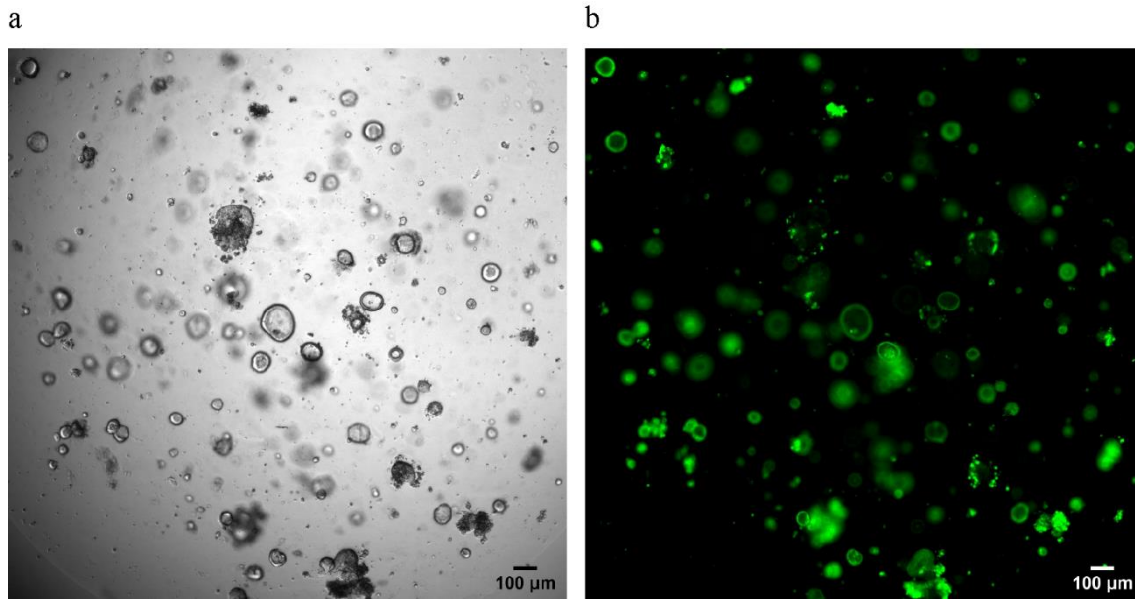


Figura 10. Captación de imágenes de organoides intestinales mediante microscopía multidimensional *widefield* durante el ensayo funcional de CFTR. La misma imagen de los organoides intestinales se capta en campo claro o *brighfield* (a) y en emisión fluorescente. Las imágenes captadas se utilizarán, posteriormente, para realizar el análisis de imagen.

Para la captación de imágenes *in vivo* de organoides de colon derivados de pacientes, se han utilizado varios microscopios durante el transcurso de esta tesis. Actualmente, se utiliza el microscopio multidimensional *widefield Thunder Imager 3D cell culture* de Leica. Las características necesarias para poder realizar este experimento son que el microscopio posea un incubador con control de temperatura, CO₂ y humedad, una platina motorizada, soporte para placas de 96 pocillos, poder seleccionar y guardar distintos campos y captación de campos automática y programada. Adicionalmente, es muy recomendable poseer de un objetivo pequeño (4X o 5X).

Análisis de las imágenes

Para el análisis de las imágenes, se utiliza el software ImageJ/FIJI-64 [143]. Las áreas de los organoides se calculan de manera manual con la herramienta *Freehand* del programa o con la ayuda de la macro en formato abierto [145]. Se toman las medidas de las áreas en todas las imágenes captadas (cada 10 minutos) a lo largo del tiempo hasta 1 – 3 horas. Con las áreas calculadas (μm^2), las áreas a $t=0$ se normalizaron a 100 y los valores siguientes, se calcularon respecto a su valor basal ($t=0$ minutos) [123] (**Figura 11**).

Concentraciones de forskolina

La forskolina es un compuesto que aumenta *in vitro* los niveles de AMPc. Se utiliza para activar los canales de CFTR en cultivo celular. En el estudio funcional con organoides intestinales, se utilizan varias concentraciones de forskolina; 0,002; 0,128; 0,8; 2; y 5 μM . La concentración de

0,128 μM se utiliza para analizar la activación de CFTR después de la incubación con fármacos que restauran la funcionalidad de CFTR [124]. La concentración de 0,8 μM sirve para observar si hay función residual de CFTR [125]. Se suele observar en los genotipos con al menos una variante que producen una enfermedad FQ más moderada, llamadas variantes de función residual. La concentración de 5 μM se utiliza para probar fármacos de restauración de la actividad del CFTR que sean experimentales, es decir, que no se hayan probado previamente *in vitro* o que se desconozca qué acción producirá [100, 146]. Las concentraciones pueden utilizarse para realizar una curva de funcionalidad de CFTR dosis-dependiente.

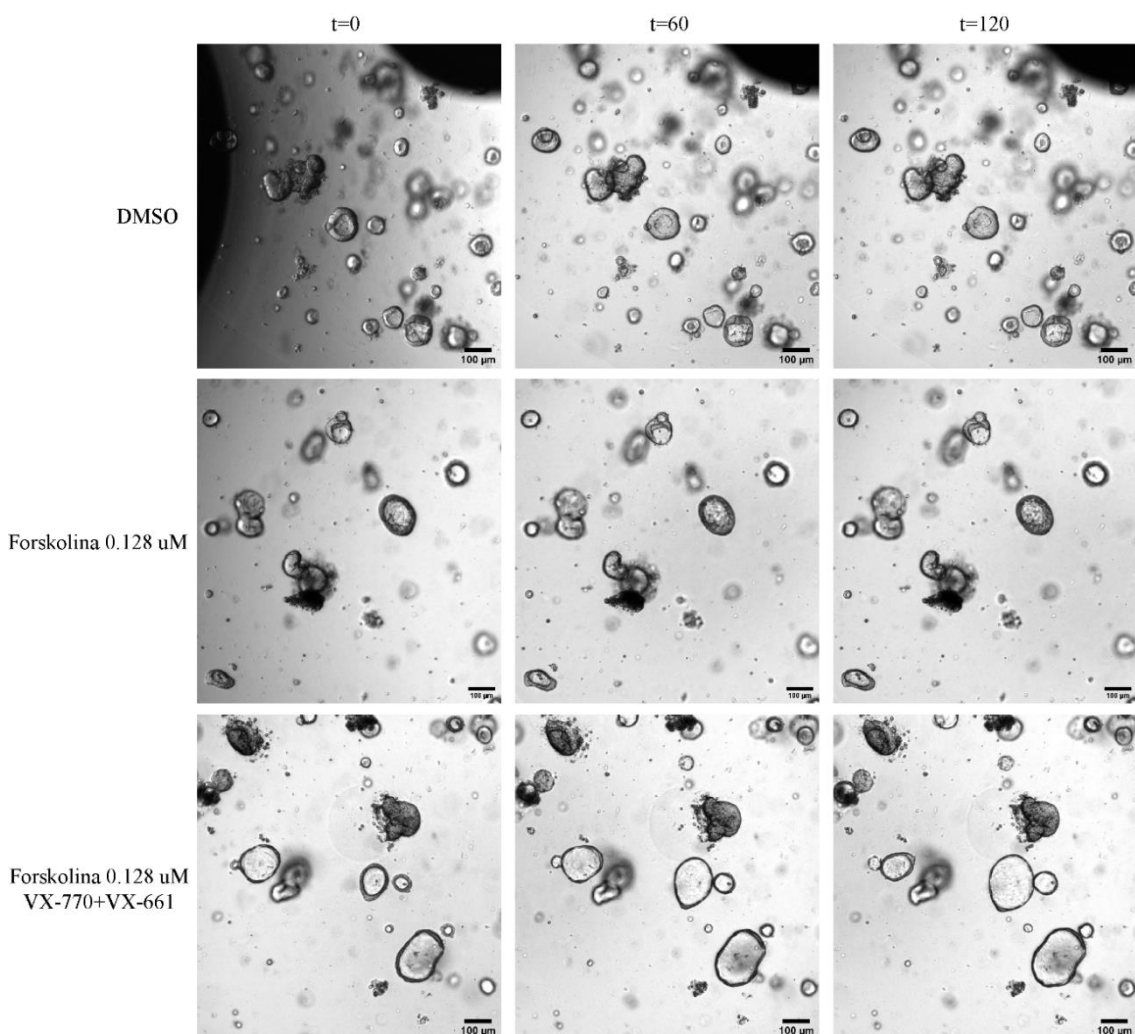


Figura 11. Análisis de imágenes del ensayo funcional de CFTR en organoides intestinales de paciente F508del/L206W. Posteriormente a la captación de imágenes, se procede al análisis de los tamaños de los organoides intestinales mediante el software ImageJ/FIJI-64. Se muestran imágenes captadas en campo claro o *brightfield* a $t=0$ (condición basal), $t=60$ minutos y $t=120$ minutos. Los organoides intestinales F508del/L206W se incubaron con el control negativo, DMSO, con forskolina a distintas concentraciones (aquí, se muestra a 0.128 μM) para activar los canales CFTR, y con forskolina más moduladores, VX-770+VX-661, para restablecer la función de CFTR. Se puede observar el incremento de tamaño de los organoides intestinales F508del/L206W tratados con la combinación de moduladores, a $t=60$ y a $t=120$ min.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para valorar los resultados de los ensayos funcionales en nasoesferas y organoides intestinales se realiza mediante el software GraphPad Prism 6 [147]. Todos los análisis se calculan de manera automática mediante este programa. Las áreas bajo la curva (*area under the curve*, AUC) se realizan con base Y=0 en nasoesferas. En el análisis de organoides, se aplica una base Y=100, y se incluyen los “picos” que se encuentran por debajo del valor basal, 100. De las AUC calculadas, se escogen las “*total area*” de las nasoesferas y las “*net area*” de los organoides intestinales.

Para la validación del ensayo estadístico de las nasoesferas, se diseñó un modelo con los datos obtenidos después del análisis de imagen. Este modelo se realizó con los datos logarítmicamente transformados. El análisis estadístico se realizó mediante los softwares SAS v.9.4 y R v3.1.2. Este estudio se realizó en colaboración del Servicio de Estadística Aplicada de la Universitat Autònoma de Barcelona, UAB. Los detalles del modelo logarítmico y los resultados estadísticos pueden consultarse en el artículo Calucho M *et al* 2021 [141] (adjuntado en **Anexo**). Al obtener las mismas conclusiones estadísticas que con el programa GraphPad, se optó por utilizar esta segunda metodología, ampliamente utilizada por la comunidad científica para el análisis estadístico de resultados.

Todos los ensayos estadísticos de comparación entre una condición y otra se realizan mediante t-test (pareado y no pareado), excepto cuando se especifica otro al largo de la sección de **Resultados**. Un *p*-valor < 0.05 se considera significativo. En la sección de **Resultados**, el rango de significancia se muestra mediante asteriscos:

*	p=0.01 – 0.05
**	p=0.001 – 0.01
***	p=0.0001 – 0.001
****	p<0.0001

Paciente (género)	Genotipo CFTR	Clase	In vitro	Ttm in vivo	Edad	SP	FEV ₁	BQ	ColC
FQ1 (H)	F508del/2183AA>G	II / I	N	KAFTRIO® ^β	15	No	45	Sí	Sí
FQ2 (M)	F508del/2183AA>G	II / I	N	-	17	No	85	Sí (moderado)	No
FQ3 (H)	F508del/3849+10KbC>T	II / V	N	-	6	Sí	110	No	No
FQ4 (H)	L227R/L227R	s.c.	N	-	19	No	80	Sí	Sí
FQ5 (M)	G542X/R117H-7H	I / IV	N	-	12	Sí	116	No	No
FQ6 (H)	F508del/F508del	II	N	-	18	No	57	Sí	Sí
FQ7 (H)	F508del/1812-1G>A	II / I*	N	-	18	No	86	Sí	Sí
FQ8 (H)	F508del/F508del	II/II	N, IF,	SYMKEVI®	15	Sí	112	No	No
FQ9 (M)	F508del/F508del	II/II	N, IF,	-	14	Sí	98	Sí	No
FQ10 (H)	F508del/F508del	II/II	N	ORKAMBI®	11	Sí	110	Sí	No
FQ11 (M)	F508del/L206W	II/IV	N, IF,	SYMKEVI®	12	No	112	No	No
FQ12 (M)	F508del/L206W	II/IV	N	SYMKEVI®	18	No	107	No	No
FQ13 (H)	F508del/1677delTA	II/	N	-	14	Sí	112	Sí	No
FQ14 (H)	F508del/s.d.	II/s.d.	N	-	10	Sí	121	Sí	Sí
FQ15 (H)	F508del/G542X	II/I	N, IF,	-	16	Sí	104	Sí	No
FQ16 (H)	G542X/K688X	I/I	N	-	15	Sí	70	Sí	Sí
FQ17 (M)	W1282X/W1282X	I/I	N	-	15	Sí	90	Sí	No
FQ18 (H)	L227R/L227R	s.c.	N	-	13	Sí	98	Sí	No

Tabla 4. Información y características clínicas de todos pacientes incluidos a lo largo del apartado de Resultados. Las variantes se describen con la nomenclatura tradicional, *legacy*. Los sujetos FQ1 y FQ2 comparten el mismo genotipo, pero no están emparentados. Los sujetos FQ4 y FQ18 comparten el mismo genotipo y están emparentados. H = Hombre, M = Mujer. s.d. = sin determinar, después de análisis realizados por secuenciación masiva. s.c. = sin clasificar. La columna “*in vitro*” muestra las técnicas realizadas con las células de los pacientes; N = ensayo funcional en nasoesferas, IF = inmunofluorescencia en nasoesferas, O = ensayo funcional en organoides. Ttm = tratamiento farmacológico *in vivo*. Edad = edad del paciente en el momento de la extracción de la muestra. SP = Suficiencia pancreática. FEV₁ = fuerza expiración por segundo. TS = test del sudor. BQ = bronquiectasias. ColC = colonización crónica. * = *canonical splicing*. ^β = terapia de uso compasivo.

V – Resultados

1. VALIDACIÓN DE LAS NASOESFERAS PARA EL ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DE CFTR Y LA RESPUESTA A MODULADORES EN FQ

1.1. Formación e inmovilización de las nasoesferas para el estudio de imagen *in vivo*

Primero, se validó la formación de las nasoesferas WT-CFTR a partir de células epiteliales nasales obtenidas mediante curetaje nasal. Se sembraron un total de $5 - 7 \times 10^4$ células, sin resuspenderlas, y al cabo de unas horas se observó la formación de agregados celulares. Tres días después de cultivar en medio sin suero, estos *clusters* de células desarrollaron de manera espontánea cientos de nasoesferas con la parte apical orientada hacia el exterior y expresando proteína CFTR (Figuras 12, 13).

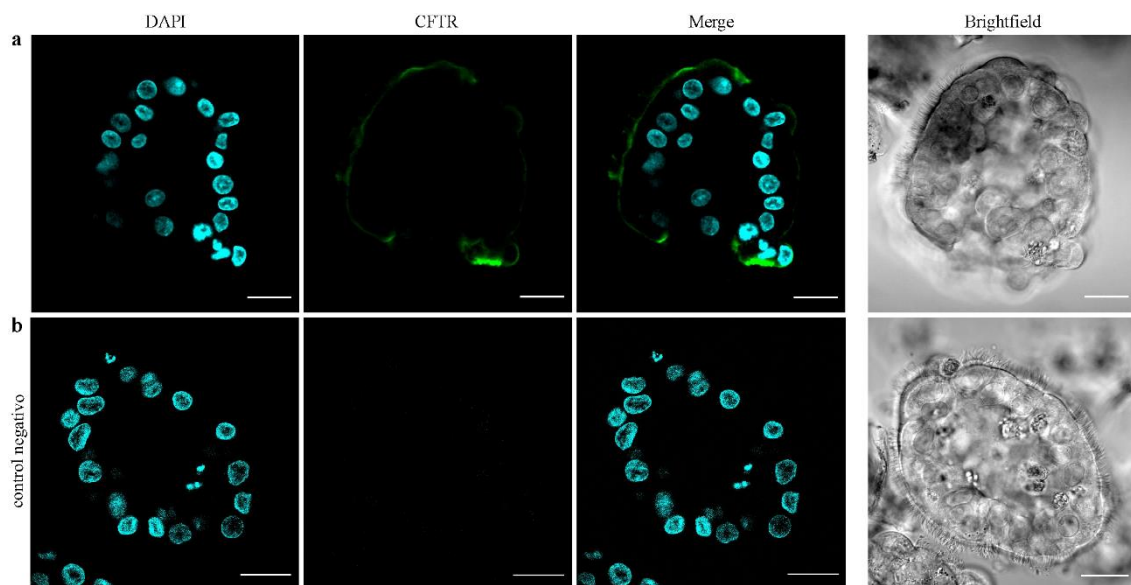


Figura 12. Detección de CFTR en nasoesferas en suspensión mediante inmunofluorescencia. Después de 7 – 8 días de cultivo celular, las nasoesferas WT-CFTR se fijaron mediante paraformaldehído para realizar la inmunofluorescencia, siguiendo el protocolo de **Material y Métodos**. En la Figura (a) se utilizó DAPI para la detección de núcleos (en azul) y el anticuerpo primario anti-CFTR (MAB1660-SP; R&D Systems) para la detección de la proteína CFTR, en verde. (b) El mismo protocolo se utilizó para el control negativo, pero sin la incubación del anticuerpo primario anti-CFTR. Los paneles de la derecha muestran las imágenes de las mismas nasoesferas pero capturadas en campo claro o *brightfield*. Todas las imágenes muestran un solo z-stack y se capturaron mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 980). Barras de escala: 20 µm.

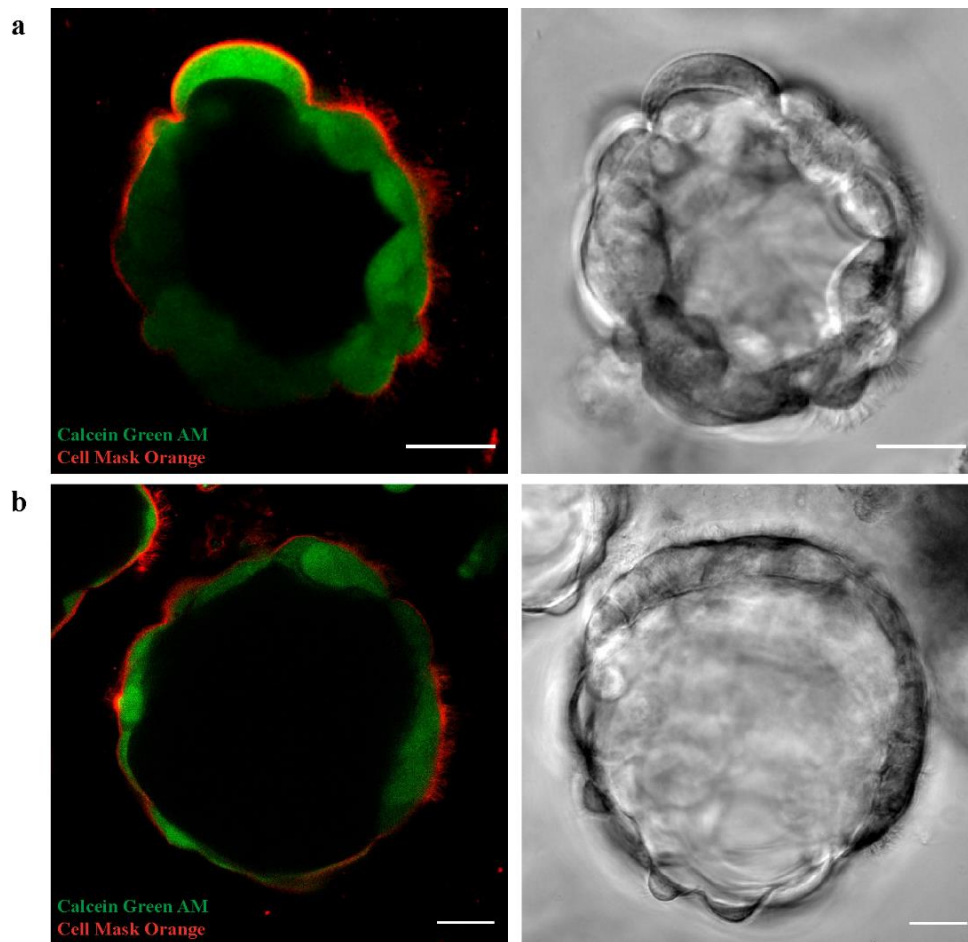


Figura 13. Nasoesferas WT-CFTR resuspendidas en Matrigel bajo las condiciones C1 y C2 presentan cilios hacia el exterior. El panel de la izquierda presenta imágenes de nasoesferas WT-CFTR no fijadas, en la C1 (**a**) y en C2 (**b**) y teñidas con Cell Mask Orange (rojo; cilios y membrana plasmática) y *calcein green* (verde; células vivas). El panel de la derecha presenta imágenes captadas en campo claro en la C1 (**a**) y en C2 (**b**). Todas las imágenes muestran un solo z-stack y se captaron mediante microscopia confocal (Zeiss LSM 980). Escala: 20 μm .

Debido a que las nasoesferas crecen en suspensión, se inmovilizaron en Matrigel antes de realizar el estudio funcional *in vivo*. El Matrigel es un compuesto líquido a 4° C pero que se solidifica a 37° C. Así, se evitaban los movimientos de las células durante los estudios de microscopia *in vivo* y se establece un seguimiento más riguroso. Para determinar la influencia del Matrigel en el estudio funcional de CFTR, se utilizaron dos tiempos de exposición al Matrigel distintos: en la condición 1 (C1), las nasoesferas se resuspenden en Matrigel el día antes del experimento *in vivo* y en la condición 2, C2, las esferas crecen inmersas en Matrigel desde el inicio del cultivo (detalles en **Material y Métodos**).

Para determinar la influencia del Matrigel en el estudio funcional de CFTR, se estimuló la activación del canal mediante forskolina e IBMX. También se añadió amiloride para inhibir el transporte mediante los canales de Na^+ , ENaC (detalles en **Material y Métodos**). Esta condición

(forskolina, IBMX y amiloride) la denominamos “FSK”. Después de la activación de CFTR mediante FSK, se analizaron las áreas de las nasoesferas por imagen *in vivo*. El CFTR en las nasoesferas, se encuentra orientado hacia el exterior, de manera que al activar el canal WT-CFTR mediante FSK, el transporte de Cl^- ocurre desde el interior de la esfera hacia el exterior, produciendo una disminución del área de las nasoesferas.

Las nasoesferas C1 y C2 presentan los siguientes tamaños: (media \pm desviación estándar, SD): $7,911.351 \pm 6,774.84 \mu\text{m}^2$ (n=162 para C1) y $5,956.277 \pm 5,432.514 \mu\text{m}^2$ (n=125 para C2) (**p=0.0003 t-test). El número máximo de esferas estudiadas por muestra fue 55 (media por experimento \pm SD=21.310 \pm 16.112). Los cambios en las áreas externas (*cross-sectional areas*, CRA) de las nasoesferas se calcularon relativas a t=0 (reducción fraccional o *fraction reduction*, FR) (detalles en **Material y Métodos**). Después de 60 minutos de administración del compuesto FSK, se analizó la FR de 80 nasoesferas en C1 y 98 en C2, sin observarse diferencias significativas entre ambas condiciones (p=0.1563; t-test pareado) (**Figura 14a**). Las pendientes o *slopes* obtenidas de ambas condiciones, tampoco mostraron diferencias significativas (p=0.1297 t-test; t=60 minutos). También se calculó el área bajo la curva (*area under the curve*, AUC) para cada nasoesfera a partir de los valores normalizados (FR=1 en t=0) (detalles en **Material y Métodos**) y se confirmó que no existen diferencias significativas entre las condiciones C1 y C2 después de la administración de FSK (p=0.5205; t=60 minutos; t-test). Para confirmar que el Matrigel no interfiere en el transporte de CFTR, se estimularon con FSK nasoesferas en suspensión sin Matrigel y se compararon sus respuestas con las obtenidas de las condiciones C1 y C2. No se observaron diferencias significativas entre las respuestas estudiadas (suspensión vs C1 p=0.9839, suspensión vs C2 p=0.5138; t-test).

A partir de aquí, se combinaron los resultados de las nasoesferas en C1 y C2. Se analizaron las diferencias entre la condición control, DMSO, y la incubación con FSK. Un total de 288 nasoesferas de siete pacientes WT-CFTR fueron analizadas: 110 con DMSO y 178 en presencia de FSK. Se observaron diferencias significativas entre la administración de vehículo y FSK a partir del minuto 10 (después de la administración de los compuestos). Esta diferencia continuó hasta el minuto 60 (FR, AUC y *slopes* ****p< 0.0001 t-test) (**Figura 14b**). También se observó que la disminución de CRA se revierte cuando se incubaba el inhibidor de CFTR (**Figura 14c**), demostrando que el transporte observado después de la incubación con FSK es dependiente de CFTR.

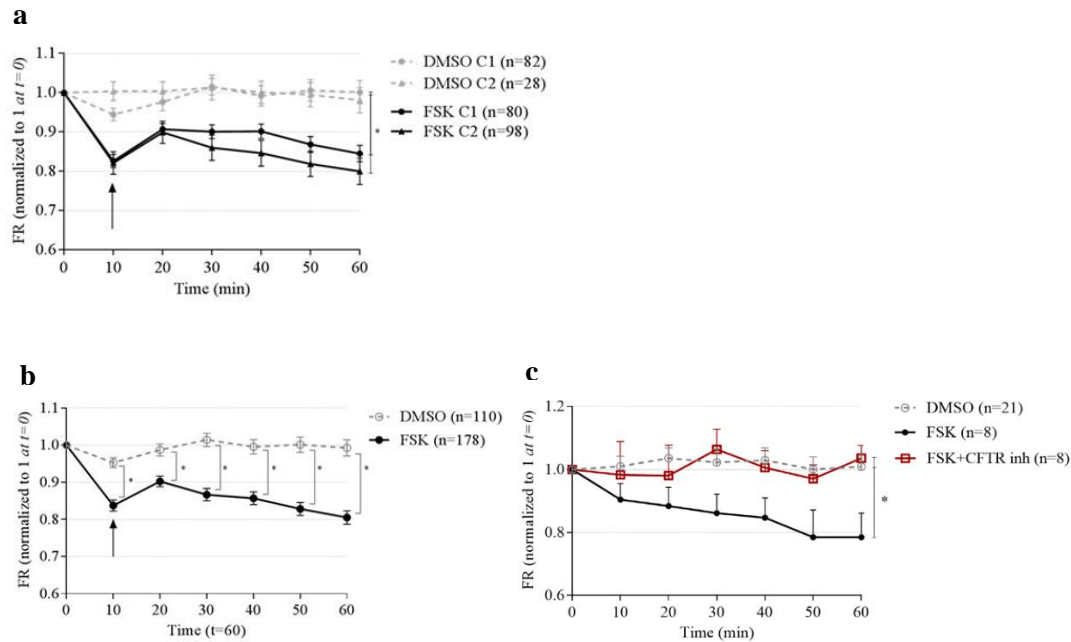


Figura 14. Respuesta de las nasoesferas WT-CFTR después de la incubación con FSK, DMSO o inhibidor de CFTR utilizando condiciones diferentes de cultivo. (a) Las nasoesferas de siete pacientes WT-CFTR fueron cultivadas en las condiciones C1 o C2. Después del estudio funcional, primero se calcularon las áreas de las nasoesferas en condiciones basales, $t=0$. La reducción de las nasoesferas respecto al tamaño en condiciones basales se calculó a lo largo del tiempo hasta 60 minutos (detalles en **Materiales y Métodos**). No se observaron diferencias significativas entre las C1 y C2 (incubadas con FSK o con DMSO) ($p=0.1563$; t-test). Las barras representan el error estándar de la media (SEM). **(b)** Al no encontrar diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre las C1 y C2, los resultados de ambas condiciones, se combinaron. Las diferencias entre los estímulos FSK y DMSO se detectaron desde el minuto 10 y fueron observándose a lo largo del tiempo hasta $t=60$ min. Las barras representan SEM. **(c)** Las nasoesferas WT-CFTR de C1 fueron incubadas con el inhibidor de CFTR y se siguieron durante 60 minutos mediante microscopía *in vivo*. Se observaron diferencias significativas entre la condición FSK y la inhibición de CFTR ($*p=0.0313$ t-test). Las barras representan SEM.

1.2. Tiempo y variabilidad en la respuesta de activación del CFTR en nasoesferas WT

Se observó que las nasoesferas WT-CFTR presentaban respuestas a FSK variables: para clasificarlas entre respondedoras y no respondedoras a FSK se utilizaron los valores FR ($t=60$ minutos). Así pues, las nasoesferas que presentaban $FR > 1$ fueron consideradas no respondedoras mientras que las esferas que presentaban valores $FR \leq 1$ se definieron como respondedoras. Se determinó que $\approx 80\%$ de las esferas estudiadas (135/173) eran respondedoras a FSK (**Figura 15**).

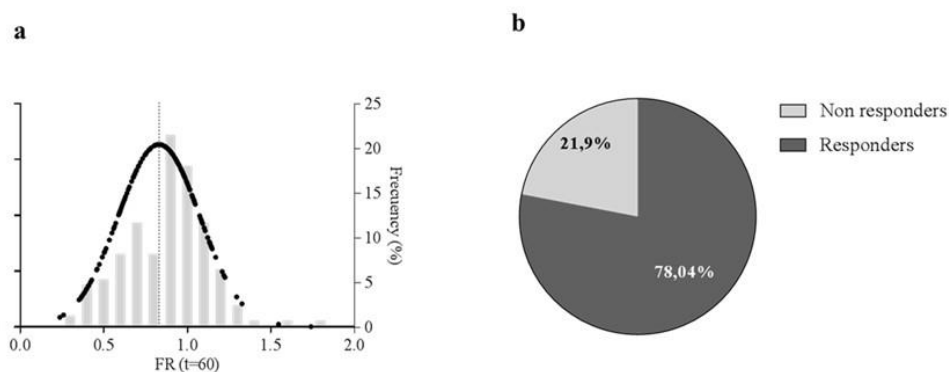


Figura 15. Distribución de la respuesta de FSK en las nasoesferas WT-CFTR. (a) Las nasoesferas WT-CFTR presentaron variabilidad en los valores FR después de la activación de CFTR mediante FSK. Los puntos negros muestran la distribución gaussiana de los valores FR. El eje Y de la derecha muestra la frecuencia (%) de los rangos FR. Cada columna representa un intervalo de 0.1 de las FR obtenidas. La línea discontinua representa la media de respuesta a FSK de las nasoesferas WT-CFTR (FR=0.803). (b) Distribución de nasoesferas en respondedoras y no respondedoras a FSK en función de su FR en t=60 minutos. Se estableció $FR \leq 1$ para respondedores y $FR > 1$ para no respondedores.

Las nasoesferas respondedoras, se subclasificaron en muy respondedoras o poco respondedoras según los valores FR. Así pues, después la activación de CFTR mediante FSK (t=60 min), las esferas que presentaban un área por debajo de la media de WT-CFTR ($FR < 0.803$), se consideraron muy respondedoras (67/135; 49,63%). Las esferas que se redujeron $< 20\%$ de su área inicial, se clasificaron como poco respondedoras (68/135; 50,37%). Cuando se estudiaron las nasoesferas de las condiciones C1 y C2 por separado, las esferas de C2 presentaban un porcentaje algo superior de no respondedoras ($\sim 30\%$) frente a las esferas en C1 ($\sim 20\%$).

1.3. Potencialmente todas las esferas son adecuadas para el estudio funcional independientemente de su área basal y condición de cultivo

Se quiso determinar si el grado de respuesta de esferas WT-CFTR a FSK podía verse influenciado por el tamaño basal de las nasoesferas. Las áreas iniciales que se observaron en las nasoesferas fueron muy variables con un rango desde los 350 a 53807 μm^2 (media \pm SD=7076.762 \pm 6304.907). La base de datos se *windsorizó* para obtener un test de correlación más ajustado. Esto es, los valores extremos de los tamaños iniciales de las nasoesferas se ajustaron de la siguiente manera: 5% de los valores en la parte superior y 5% de la parte inferior fueron remplazados por el máximo o mínimo de los valores del extremo más próximo. Después, se realizó la prueba de correlación Spearman. Para este análisis, se excluyeron las esferas no respondedoras. Después de estudiar 138 nasoesferas, no se encontró correlación significativa entre los valores FR (t=60 minutos) y los valores de las áreas iniciales ($r=-0.1216$, $p=0.1537$). Se calcularon también las AUC de cada nasoesfera (t=60 minutos) y tampoco se observó correlación entre estos los valores y las áreas basales ($r=-0.1632$, $p=0.0550$) (Figura 16).

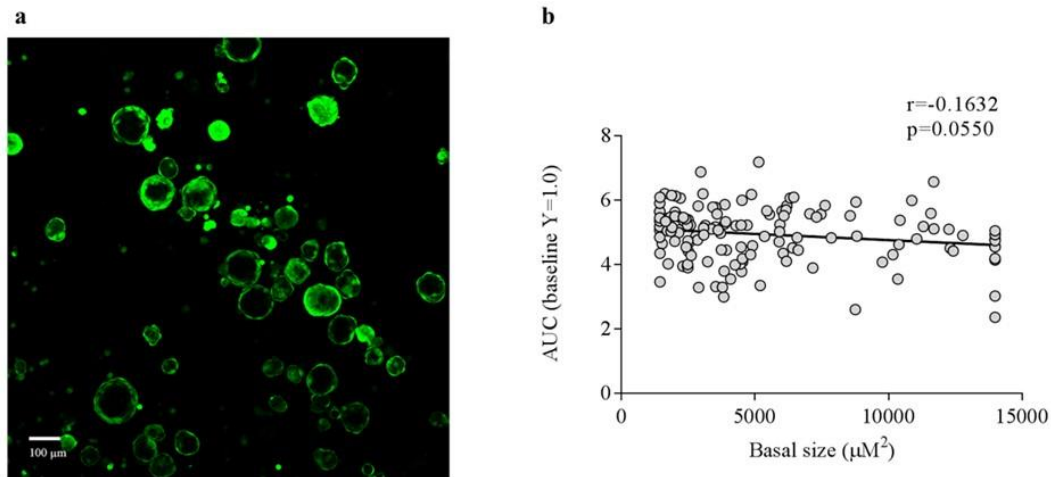


Figura 16. Análisis de correlación entre el tamaño de las nasoesferas y el grado de respuesta después de 60 minutos de incubación con FSK. (a) Las nasoesferas presentaban variabilidad de sus tamaños basales. **(b)** Para analizar si el tamaño basal influía en la respuesta a FSK, se compararon las áreas basales con las respuestas a FSK (valores AUC a $t=60$ min). Se excluyeron las nasoesferas catalogadas como no respondedoras ($FR > 1$ a $t=60$ min). No se observó correlación entre ambos parámetros (tamaño inicial y respuesta a FSK). El mismo resultado se obtuvo después de comparar las áreas basales con los valores obtenidos de FR $t=60$ min ($r=-0.1216$, $p=0.1537$) y con las pendientes o *slopes* ($r=0.04124$, $p=0.6298$). Se combinaron los valores de nasoesferas cultivadas en C1 y C2.

1.4. Análisis de áreas internas como nuevo indicador eficaz para estudiar la funcionalidad de CFTR

Se exploraron análisis alternativos al estudio de las CRA para una mejor evaluación de la funcionalidad de CFTR. Se observó que las nasoesferas respondedoras transportaban el fluido interno hacia el exterior, dejando el área interna de reservorio de fluidos (*inner fluid reservoir areas*, IFRA) totalmente vacía en algunos casos. Así pues, se cuantificaron las IFRA después de la estimulación de FSK ($t=60$ minutos). Las nasoesferas respondedoras de IFRA ($FR \leq 1$ a $t=60$ min), representan casi el 90% de las analizadas ($n=114/128$). Comparando CRA y IFRA, se observa una mayor reducción de las áreas IFRA: CRA ($t=60$ minutos)=0.805; IFRA ($t=60$ minutos)=0.473 (FR t-test pareado $*p=0.0313$; AUC $***p < 0.0001$ t-test no pareado) (**Figura 17a**). Después, se estudió si las IFRA eran más sensibles que las CRA para el análisis de la funcionalidad de CFTR y poder diferenciar entre sujetos FQ-CFTR y WT-CFTR. Primero, no se encontraron diferencias significativas en las áreas basales IFRA entre sujetos WT-CFTR y FQ-CFTR (**Figura 17b**) ($p=0.6459$; t-test). Después del tratamiento con FSK, las áreas IFRA facilitaron el reconocimiento de las diferencias entre el grupo WT-CFTR y FQ-CFTR ($*p=0.0313$; t-test pareado) (pendientes o *slopes*: $p < 0.0001$ t-test; $t=60$ minutos) (**Figura 17c**).

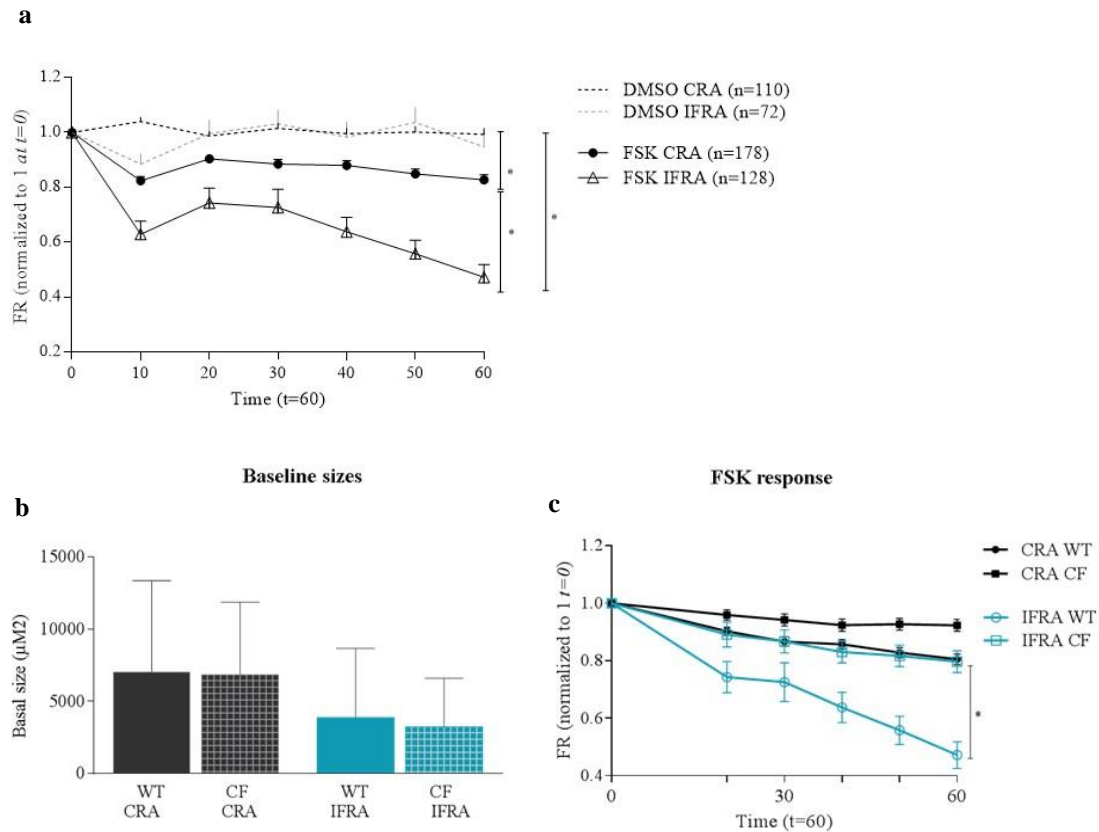


Figura 17. Análisis de las áreas externas (CRA) e internas (IFRA) en los grupos WT-CFTR y FQ-CFTR. (a) Se incubaron las nasoesferas WT-CFTR con FSK o DMSO y posteriormente, se analizaron las áreas externas, CRA, e internas, IFRA. Los valores obtenidos de CRA e IFRA difieren estadísticamente entre sí (FSK CRA vs FSK IFRA $*p=0.0313$; t-test). Las barras representan SEM. (b) No se observaron diferencias de tamaño basal entre las nasoesferas del grupo WT-CFTR y el grupo FQ (CRA $p=0.2443$, IFRA $p=0,6459$; t-test). Las barras representan la SD. (c) Después del tratamiento con FSK, se observa que el análisis IFRA es más sensible para diferenciar entre el grupo WT-CFTR y el grupo FQ-CFTR (CRA $p=0.0625$, IFRA $*p=0.0313$; t-test). Las barras representan SEM. Las nasoesferas WT-CFTR en C1 y C2 se combinaron. Todas las nasoesferas de FQ se cultivaron en la condición 1.

Dentro del grupo de pacientes FQ ($n=7$), se observaron diferentes respuestas a la FSK (**Tabla 4**). Por ejemplo, dos pacientes no emparentados (FQ1 y FQ2) que comparten genotipo (F508del/2183AA>G) mostraron diferencias en la funcionalidad de CFTR después de la estimulación con FSK; el paciente FQ1 presenta una enfermedad pulmonar grave en la evaluación clínica (**Tabla 4**, en **Material y Métodos**) y mostró muy poca reducción de sus nasoesferas en comparación a las muestras del paciente FQ2, quien presenta una enfermedad pulmonar moderada (**Figura 18**, **Tabla 4**).

Paciente (género)	Genotipo	Clasificación funcional	Respuesta a moduladores <i>in vitro</i>
FQ1 (M)	F508del/2183AA>G	II / I	++
FQ2 (F)	F508del/2183AA>G	II / I	+
FQ3 (M)	F508del/3849+10KbC>T	II / V	++ *
FQ4 (M)	L227R/L227R	s.d.	-
FQ5 (F)	G542X/R117H-7H	I / IV	-
FQ6 (M)	F508del/F508del	II	++
FQ7 (M)	F508del/1812-1G>A	II / I [‡]	-

Tabla 5. Resumen de la respuesta *in vitro* a moduladores de los pacientes FQ. La última columna resume la respuesta funcional *in vitro* a los moduladores (VX-770+VX-809 y VX-770+VX-661) después de los análisis FR y AUC en IFRA t=60 min. Las respuestas se categorizaron de acuerdo con las diferencias estadísticas encontradas entre el tratamiento con FSK vs VX: ++ respuesta notable = observada en ambos valores de FR y AUC; + respuesta moderada = diferencias significativas en los valores de FR o AUC; - sin respuesta = sin diferencias significativas. * Solo respondedor a VX-770+VX-661. [‡] *Splicing* canónico

1.5. Respuestas diferenciales de nasoesferas de pacientes FQ después de tratamientos combinados de moduladores

Por último, para evaluar la restauración farmacológica de CFTR en los siete pacientes con FQ, se probaron distintas combinaciones farmacológicas de moduladores: VX-770+VX-809 y/o VX-770+VX-661. Todas las nasoesferas de pacientes con FQ se cultivaron en la condición C1. Se analizaron las FR y las AUC de las CRA e IFRA. Algunos pacientes respondieron *in vitro* a los moduladores. Otros, presentaron valores similares entre las condiciones de FSK y los tratamientos con moduladores (**Figura 18, Tabla 5**).

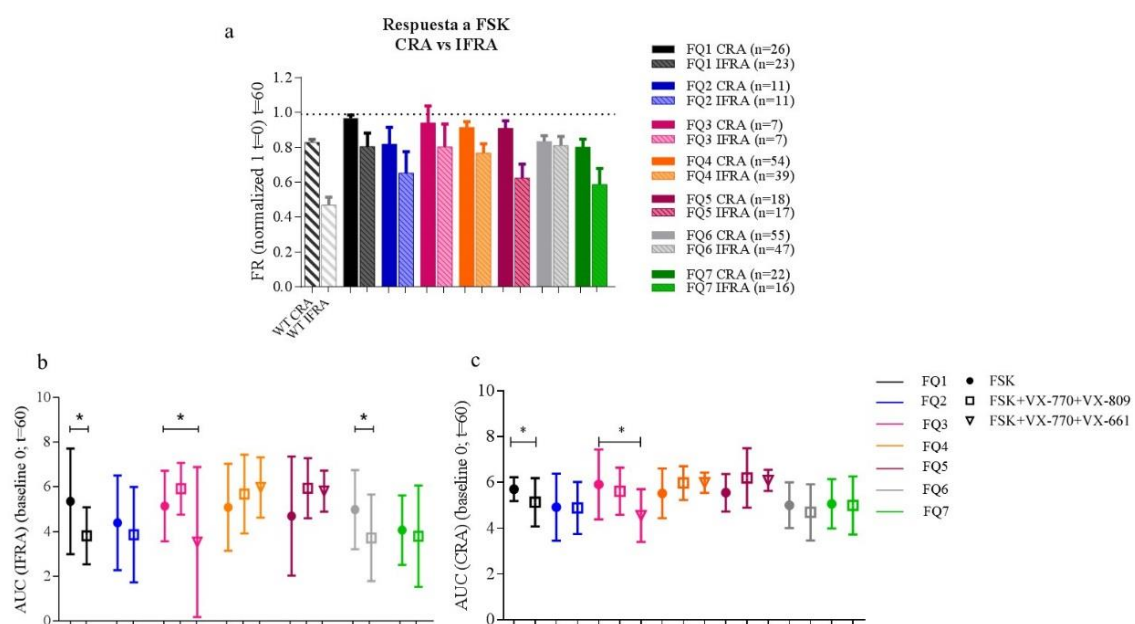


Figura 18. Las áreas internas de reservorio de líquidos, IFRA, son más sensibles para categorizar entre respuestas WT-CFTR y FQ después de la incubación con FSK. Las áreas CRA e IFRA se estudiaron en sujetos WT-CFTR y FQ-CFTR después de 60 minutos de incubación con FSK. Cada sujeto FQ está representado por un color diferente. Todos las nasoesferas FQ se cultivaron en la C1. **(a)** El valor medio obtenido de la condición DMSO en nasoesferas FQ-CFTR (CRA e IFRA) ($t=60$) está representado por la línea de puntos discontinua. Los pacientes no relacionados FQ1 y FQ2, comparten el mismo genotipo (F508del/2183AA>G) y mostraron respuestas a FSK significativamente distintas (**** $p<0,0001$) en el análisis IFRA. Cada columna representa el valor medio obtenido de FR. Las barras representan SEM. Los valores obtenidos del análisis AUC después de la evaluación de IFRA **(b)** y CRA **(c)** se determinaron mediante GraphPad Prism ($Y=0$) en $t = 60$ minutos. **(b, c)** Los puntos representan los valores medios de AUC de nasoesferas incubadas con FSK. Los cuadrados vacíos representan los valores medios de AUC de nasoesferas tratadas con VX-770+VX-809. Los triángulos invertidos muestran valores medios de AUC nasoesferas tratadas con VX-770+VX-661. Las barras representan la desviación estándar (SD). Se muestran diferencias significativas ($p<0,05$) entre nasoesferas tratadas con los moduladores y tratados con FSK.

2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CFTR EN NASOESFERAS

2.1. Detección mediante inmunofluorescencia de la expresión de proteína CFTR en la zona apical de las células epiteliales que forman nasoesferas de distintos tamaños

Para analizar la distribución de la proteína CFTR en distintas nasoesferas de un mismo individuo, se obtuvieron células epiteliales WT-CFTR ($n=1$) y FQ-CFTR ($n=5$). Del grupo FQ, se seleccionaron dos pacientes F508del/F508del (FQ8, FQ10), dos pacientes que presentan la variante F508del combinada con una de función residual (L206W) (FQ11, FQ12) y un último paciente que presenta dos variantes de clase I (G542X/K688X) (FQ16). La información y las características clínicas de los pacientes se encuentran en la **Tabla 4**, en **Material y Métodos**. Se recogieron las células epiteliales nasales de estos seis individuos y se cultivaron las nasoesferas en suspensión. Al cabo de 7 – 10 días, se recogieron las esferas para proceder al protocolo de inmunofluorescencia (IF) (detalles en **Material y Métodos**). En resumen, se detectaron los núcleos mediante tinción con DAPI y la expresión de CFTR mediante un anticuerpo *anti-human CFTR*. La captación de imágenes por microscopía confocal se realizó como se detalla en la sección de **Material y Métodos**.

Primero, se analizaron el número de células que conforman las distintas nasoesferas. El conteo de células por nasoesfera se realizó gracias a la tinción de los núcleos por DAPI. De los seis individuos estudiados, se observó un rango muy amplio de núcleos que conforman una nasoesfera: entre 6 y 113. El promedio de células es de $29,24 \pm 20,96$ (media \pm SD). Al comparar los números de núcleos de las nasoesferas WT-CFTR con los pacientes FQ-CFTR, sólo se encontraron diferencias significativas entre el individuo WT-CFTR y FQ8 (F508del/F508del) (test ANOVA, * $p<0,05$; t-test) (**Figura 19a**).

Posteriormente, se procedió a la detección de proteína CFTR mediante IF con un anticuerpo primario contra el dominio R, específico de CFTR. Mediante el análisis de los distintos z-stacks, se pudo observar la expresión de CFTR en la zona apical de las células epiteliales nasales que forman una nasoesfera. Primero, se estudió la expresión apical de CFTR en distintas nasoesferas (n=9) del mismo paciente WT-CFTR (**Figura 19d**). Se cuantificó el número de células CFTR positivas en la zona apical respecto el número total de células que forman una nasoesfera. Se determinó que la expresión apical de CFTR por cada nasoesfera WT-CFTR era variable, presentando un rango entre 25 y 100 %. La expresión media de CFTR en la zona apical por nasoesfera fue del 64.9% (**Figura 19b**).

2.2. Expresión diferenciada de proteína CFTR en la zona apical de nasoesferas FQ vs WT

Seguidamente, se realizaron IF en las nasoesferas de los cinco pacientes con FQ para detectar expresión de CFTR en la zona apical (**Figura 19e**).

Se analizó el número de células que fueron positivas por el marcaje de CFTR en la parte apical. Las nasoesferas del paciente FQ16 (G542X/K668X) son las que presentaron menor porcentaje de CFTR, siendo este prácticamente nulo (**Figura 19b**). La expresión de CFTR en estas nasoesferas fue un 56% menor que lo observado en WT-CFTR. Los pacientes F508del/F508del presentaron una expresión del 15.95% (FQ8) y 24.78% (FQ10) (**Figura 19b**). Los dos pacientes con genotipo F508del/L206W, presentaron una expresión de CFTR del 27.52% (FQ11) y 19,68% (FQ12) (**Figura 19b**). La diferencia observada entre la expresión media del grupo F508del/F508del (20.36%; n=14 nasoesferas) y el grupo F508del/L206W (24,61%; n=35 nasoesferas), no fue significativa ($p=0.6574$; t-test) (**Figura 19c**). La expresión de CFTR en nasoesferas WT-CFTR se determinó significativamente distinta a todos los grupos FQ-CFTR (F508del/F508del, F508del/L206W y G542X/K668X) (test ANOVA) (**Figura 19c**).

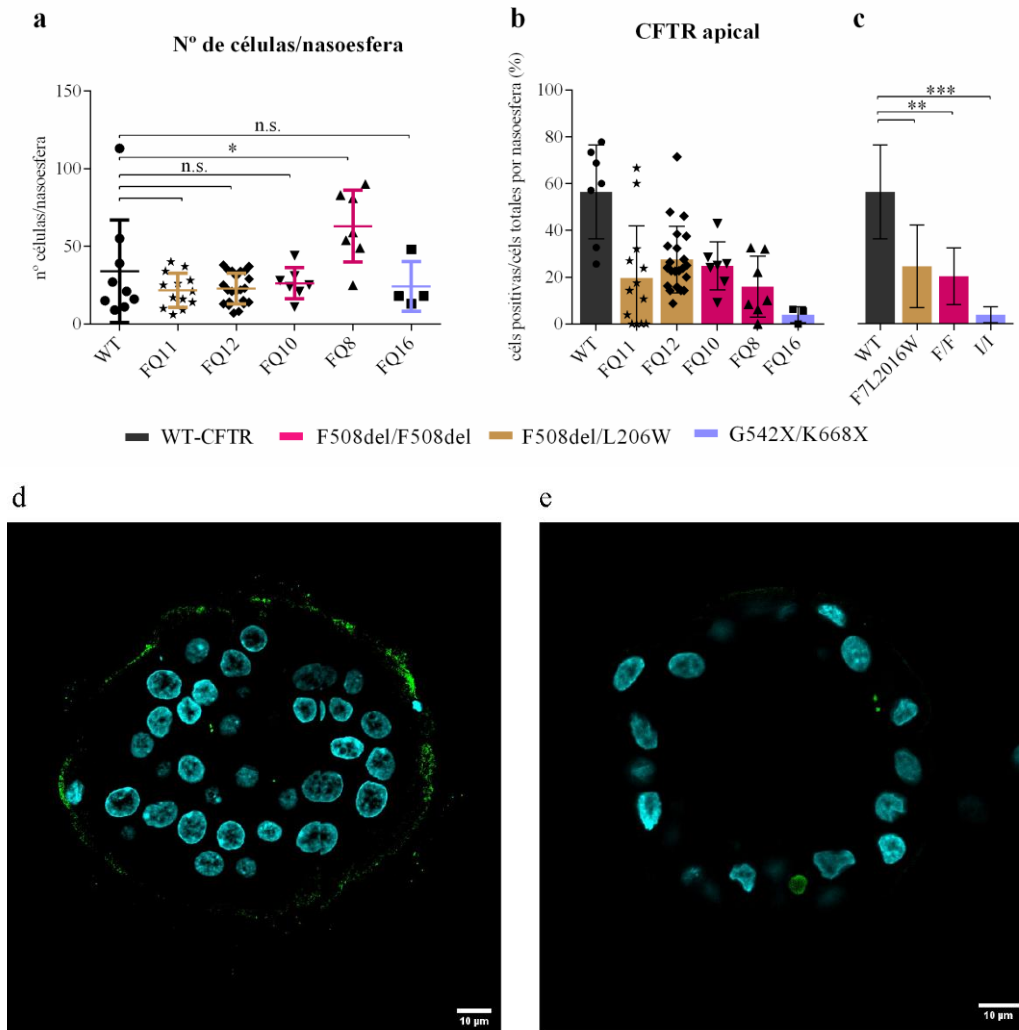


Figura 19. Expresión de la proteína CFTR en la zona apical de nasoesferas WT y FQ. Para estudiar la expresión de la proteína CFTR en la zona apical de nasoesferas mediante inmunofluorescencia (IF), se estudian seis individuos: WT-CFTR (n=1), F505del/F508del (n=2), F508del/L206W (n=2) y G542X/K668X (n=1). **(a)** Se analizó el número de células que conformaban las distintas nasoesferas estudiadas de estos seis pacientes. Cada símbolo representa una nasoesfera. Las barras verticales presentan la desviación estándar (SD) y las barras horizontales, muestran la media por paciente. Se analizó la expresión de CFTR en la zona apical de las nasoesferas analizando cada z-stack. **(c)** Los resultados del gráfico **(b)**, se agrupan en WT, F508del/F508del (n=2) (“F/F”), F508del/L206W (n=2) (“F/L206W”) y G542X/K668X (“I/I”). El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y Métodos**). n.s.: no significativo. Las imágenes **(d, e)** son una representación de las IF de WT-CFTR **(d)** y de FQ11 (F508del/F508del) **(e)**. Ambas, muestran imágenes de un z-stack, captadas después de IF para detección de CFTR (verde) y núcleos (azul) y se captaron mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 980.

En resumen, de los tres grupos de pacientes (F508del/F508del, F508del/L206W y G542X/K668X), los que más expresaban CFTR apical fue el grupo que combina la variante F508del, con una variante de función residual (L206W). Los de expresión intermedia eran los pacientes F508del/F508del, mientras que el paciente homocigoto para clase I, G542X/K668X,

fue el que presentaba menor expresión de CFTR en la zona apical de las células epiteliales del sistema respiratorio.

3. CORRELACIÓN ENTRE LOS ENSAYOS FUNCIONALES EN NASOESFERAS Y ORGANOIDES INTESTINALES DE PACIENTES CON FQ CON DISTINTOS GENOTIPOS

NOTA: los valores *p* exactos se pueden consultar en **Anexo resultados**.

3.1. Comparación de la función basal de CFTR en nasoesferas y organoides intestinales de pacientes con FQ

Para determinar la efectividad del estudio funcional de nasoesferas, se compararon los resultados con el estudio funcional en organoides intestinales, dado que éste último es un ensayo ampliamente aceptado y validado como biomarcador para estudiar la función de CFTR [124, 127, 148]. Se escogieron tres pacientes diagnosticados de FQ, de los que se obtuvo muestra de epitelio nasal y biopsia rectal para el cultivo de nasoesferas y organoides intestinales respectivamente. Los pacientes FQ8 (F508del/F508del) y FQ16 (G542X/K688X) presentan genotipos de función mínima y el paciente FQ11, de función residual (F508del/L206W). La información y las características clínicas de los pacientes se encuentran en la **Tabla 4**, en **Material y Métodos**. Se decidió realizar en ambos estudios funcionales hasta los 120 minutos, y observar posibles diferencias entre las respuestas a $t=60$ min vs a $t=120$ min.

Primero, se analizó si los pacientes presentaban función residual del CFTR *in vitro*. En las nasoesferas, se realizó el estudio funcional con forskolina siguiendo el protocolo publicado [141]. Las imágenes de microscopía fueron analizadas y se estudiaron los cambios en las áreas externas (CRA) e internas (IFRA) de las nasoesferas. A partir de estos valores, se calcularon las áreas bajo la curva (*area under the curve*, AUC) de CRA e IFRA (detalles en **Material y Métodos**).

Para observar la función basal de CFTR, se compararon las áreas de la condición FSK con las del control negativo, DMSO, a $t=60$ minutos y $t=120$ minutos. Los análisis de las CRA mostraron que no había función residual de CFTR en las nasoesferas de los pacientes F508del/F508del y G542X/K668X (**Figura 20a,b**). En cambio, las nasoesferas del paciente FQ11 (F508del/L206W), mostraron funcionalidad de CFTR al ser estimuladas con FSK. Estos cambios, se observaron después del análisis de las IFRA ($t=60$ y $t=120$ min) (**Figura 20c,d**), confirmando que el estudio de las IFRA puede ser más sensible que el de las CRA.

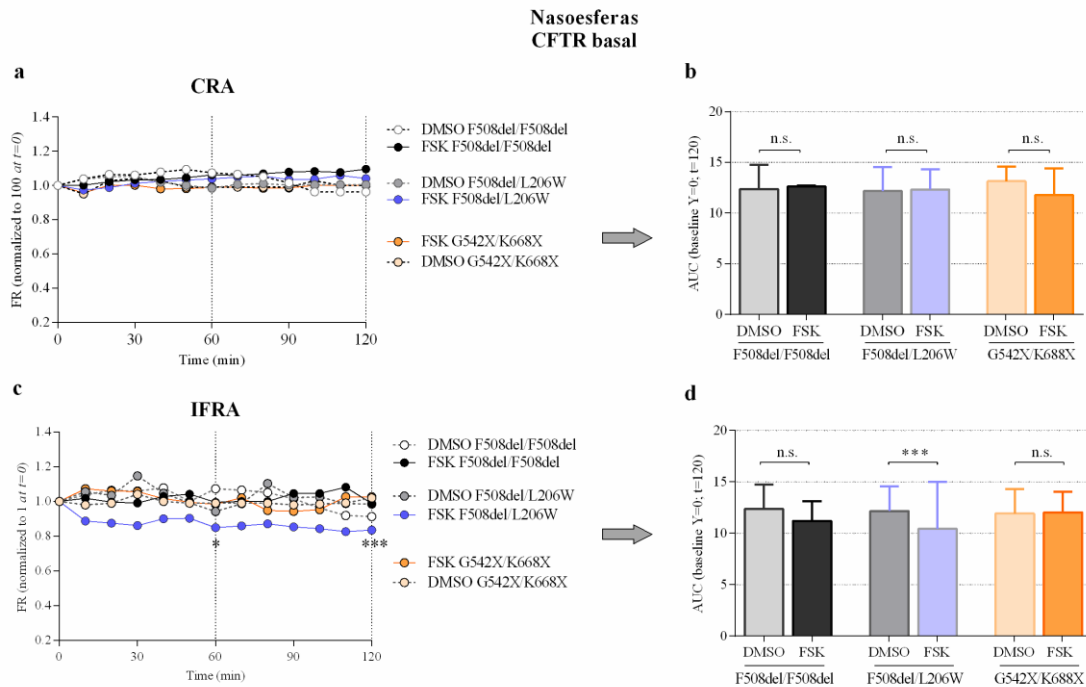


Figura 20. Estudio de la funcionalidad basal de CFTR en las nasoesferas de tres pacientes con FQ. Se estudió la funcionalidad basal de CFTR en las nasoesferas de tres pacientes (FQ8, FQ11 y FQ16) que presentan genotipos distintos (F508del/F508del, F508del/L206W y G542X/K668X respectivamente). Cada paciente se representa con un color diferente. Como control negativo se utilizó DMSO. Se realizó el análisis de las áreas externas CRA (**a**) y las áreas internas IFRA (**c**). Los valores p significativos mostrados se han comparado con el control negativo correspondiente. Sólo se muestran los valores con p significativa. (**b**, **d**) A partir de las CRA e IFRA, se muestran las AUC calculadas a $t=120$. El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y Métodos**). Las barras de los gráficos de columnas muestran las SD. n.s.: no significativo. Los p -valor exactos a $t=60$ y a $t=120$ se pueden consultar en **Anexo resultados**.

En paralelo, se establecieron los organoides intestinales de estos tres mismos pacientes a partir de biopsias rectales, siguiendo protocolos previamente descritos. Después de un mínimo de tres semanas de cultivo, se procedió al ensayo funcional FIS (detalles en **Material y Métodos**). Debido a la disposición de la membrana apical, el transporte de Cl^- en los organoides se realiza desde el exterior hacia el interior, al contrario que en las nasoesferas. Este fenómeno se conoce en inglés como *forskolin induced swelling*, FIS. Para el ensayo funcional no se añadió amiloride, como se hace en las nasoesferas, ya que en el epitelio intestinal no hay canales de Na^+ . Como control negativo se utilizó DMSO. Igual que en las nasoesferas, el ensayo funcional se realizó durante 120 minutos y se capturaron imágenes de los organoides cada 10 minutos.

Los organoides intestinales de los tres pacientes, FQ8, FQ11 y FQ16, se incubaron con forskolina a distintas concentraciones (0.020, 0.128, 0.8, 2 y 5 μM) (**Figura 21a,b**). La concentración de 0.128 μM marca la funcionalidad del canal CFTR y 0.8 μM se utilizó para discernir entre función CFTR residual y mínima (detalles en **Materiales y Métodos**).

Se confirmaron los resultados observados previamente en las nasoesferas. Los pacientes FQ8 y FQ16 no presentaron funcionalidad de CFTR después de la incubación con forskolina, comparado con DMSO (**Figura 21c**). En cambio, los organoides del paciente FQ11 (F508del/L206W) presentaron diferencias significativas entre las condiciones DMSO y forskolina (0.128 μM y 0.8 μM), indicando función residual del CFTR (**Figura 21c**). Esta diferencia no se observó a $t=60$ min (ver **Anexos Resultados**), indicando que las dos horas de estudio pueden dar una información más detallada sobre la funcionalidad de CFTR, igual que las IFRA en nasoesferas.

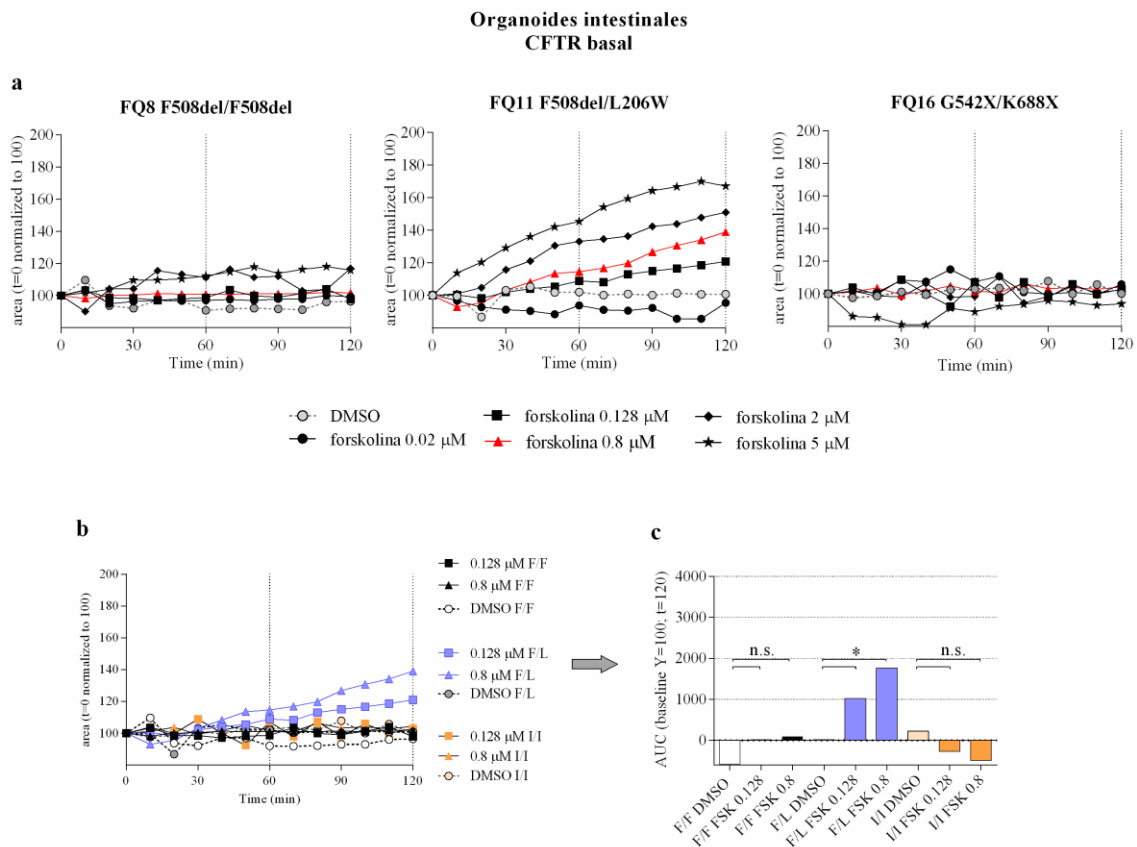


Figura 21. Estudio de la funcionalidad de CFTR basal en los organoides intestinales de tres pacientes con FQ. Se estudió la funcionalidad basal de CFTR en los organoides de los pacientes FQ8, FQ11 y FQ16 que presentan genotipos distintos: F508del/F508del (“F/F”), F508del/L206W (“F/L”) y G542X/K668X (“I/I”) respectivamente. **(a)** Los organoides de los tres pacientes se incubaron con forskolina a distintas concentraciones (0.020, 0.128, 0.8, 2 y 5 μM) para estimular la apertura del canal CFTR *in vitro*. Como control negativo se utilizó DMSO. Cada gráfico del bloque **(a)** presenta los resultados de los organoides de un paciente. El $t=0$ representa la condición basal de las áreas de los organoides. Seguidamente, los fármacos se incuban y se captan imágenes, a partir de $t=10$ min hasta $t=120$ min. La funcionalidad residual de CFTR en el ensayo FIS viene definida por la concentración de 0.8 μM de forskolina (triángulo rojo, **a**). **(b)** Se muestran los resultados de los organoides de los tres pacientes (cada uno con un color diferente; FQ8 color negro, FQ11 azul y FQ16 naranja) con las condiciones de DMSO, forskolina 0.128 μM y forskolina 0.8 μM . **(c)** A partir de estos resultados, se obtienen las AUC, representadas a $t=120$. Las barras de los gráficos de columnas muestran las SD. El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y**

Métodos). n.s.: no significativo. Los *p*-valor exactos a t=60 y a t=120 se pueden consultar en **Anexo resultados**.

3.2. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en nasoesferas y organoides intestinales

Después de observar la funcionalidad basal de CFTR, se incubaron las nasoesferas y los organoides intestinales de los tres pacientes con las siguientes combinaciones de fármacos moduladores:

Paciente	Genotipo <i>CFTR</i>	Tratamientos probados <i>in vitro</i>
FQ8	F508del/F508del	VX-770+VX-809,
FQ11	F508del/L206W	VX-770+VX-661, VX-770+VX-661+VX-445 (“TRI”)
FQ16	G542X/K688X	PTC-124 (“PTC”), VX-770, TRI, PTC+VX-770, PTC+TRI

Primero, se analizaron las respuestas de los genotipos F508del/F508del y F508del/L206W. Las nasoesferas de ambos pacientes, reestablecieron significativamente la funcionalidad de CFTR después de la incubación con los tres tratamientos investigados (t-test significativo en t=60 min y t=120 min, en todos los análisis realizados) (**Figura 22**). Cabe destacar la respuesta significativa (en FR-CRA, FR-IFRA y AUC-IFRA) del genotipo F508del/L206W a VX-770+VX-809, un fármaco (ORKAMBI®) no aprobado para pacientes heterocigotos para F508del (**Figura 22c,d**). Las respuestas obtenidas después de la incubación con VX-770+VX-809 y VX-770+VX-661, fármaco (SYMKEVI®) sí aprobado para este genotipo, fueron similares (ver **Anexo Resultados**). Posteriormente, se estudió si la incubación de las nasoesferas FQ8 y FQ11 con la triple terapia, TRI, producía más funcionalidad de CFTR *in vitro* respecto a las otras dos condiciones de moduladores. Ambos pacientes, no presentaron diferencias significativas entre las respuestas a TRI y las otras dos condiciones de moduladores (ver **Anexo Resultados**).

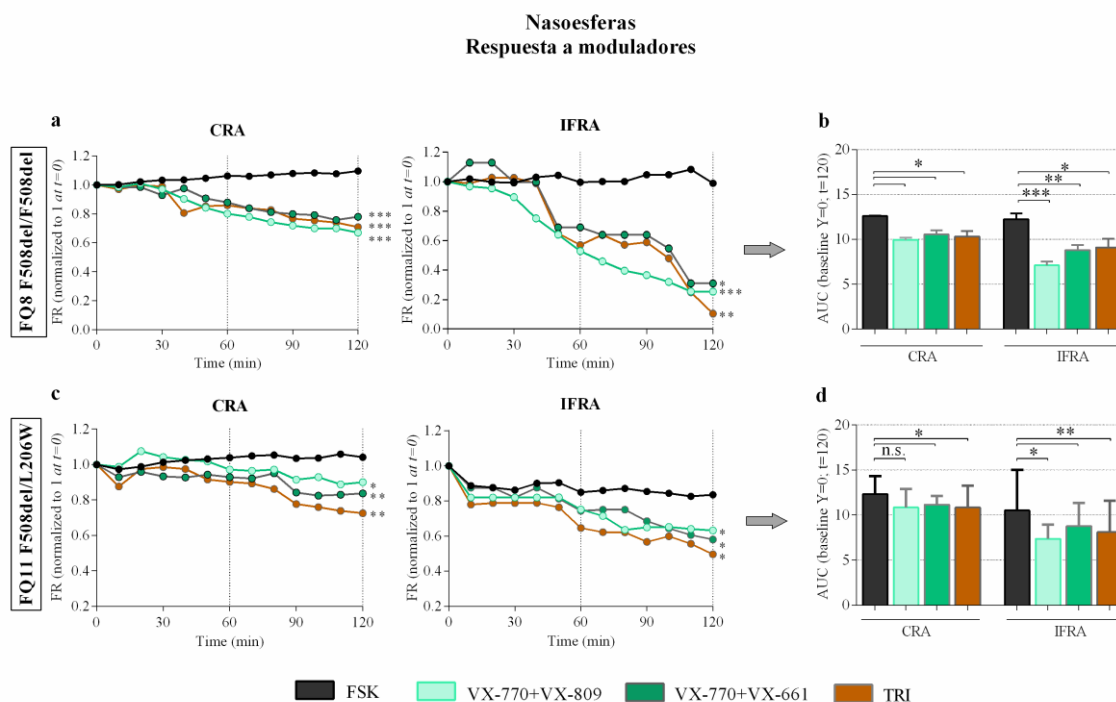


Figura 22. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en nasoesferas de pacientes que presentan al menos una variante F508del. Se estudió la funcionalidad del CFTR en las nasoesferas de los pacientes FQ8 F508del/F508del y F11 F508del/L206W después de la incubación con las siguientes combinaciones farmacológicas: VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y VX-770+VX-661+VX-445 (“TRI”). Como control negativo se utilizó DMSO. **(a, c)** Se estudiaron las áreas normalizadas externas CRA e internas IFRA de las nasoesferas de los pacientes FQ8 F508del/F508del y FQ11 F508del/L206W. Los valores p significativos mostrados se han comparado con condición basal FSK. **(b, d)** A partir de las áreas normalizadas, se calcularon las AUC, representadas a $t=120$. Las barras de los gráficos en columna representan las SD. El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y Métodos**). n.s.: no significativo. Los p -valor exactos a $t=60$ y $t=120$ se pueden consultar en **Anexo resultados**.

Los ensayos funcionales en los organoides FQ8 y FQ11, confirmaron los resultados observados en las nasoesferas; todos los análisis de ambos pacientes (a $t=60$ min y a $t=120$ min) muestran una respuesta significativa a los tres tratamientos con los fármacos VX (**Figura 23**). Sin embargo, los análisis de las CRA en los organoides FQ8 F508del/F508del incubados con VX-770+VX-809 y VX-770+VX-661, mostraron diferencias significativas a $t=120$ pero no a $t=60$ (ver **Anexo Resultados**), indicando que, en casos donde no se observa respuesta a los 60 minutos, prolongar el ensayo a dos horas podría ser útil para caracterizar mejor las respuestas. Finalmente, se estudiaron las respuestas de ambos pacientes a TRI, respecto a las otras combinaciones probadas y ninguno de los genotipos presentó diferencias significativas (AUC, $t=120$ min) (ver **Anexo Resultados**).

Organoides intestinales Respuesta a moduladores

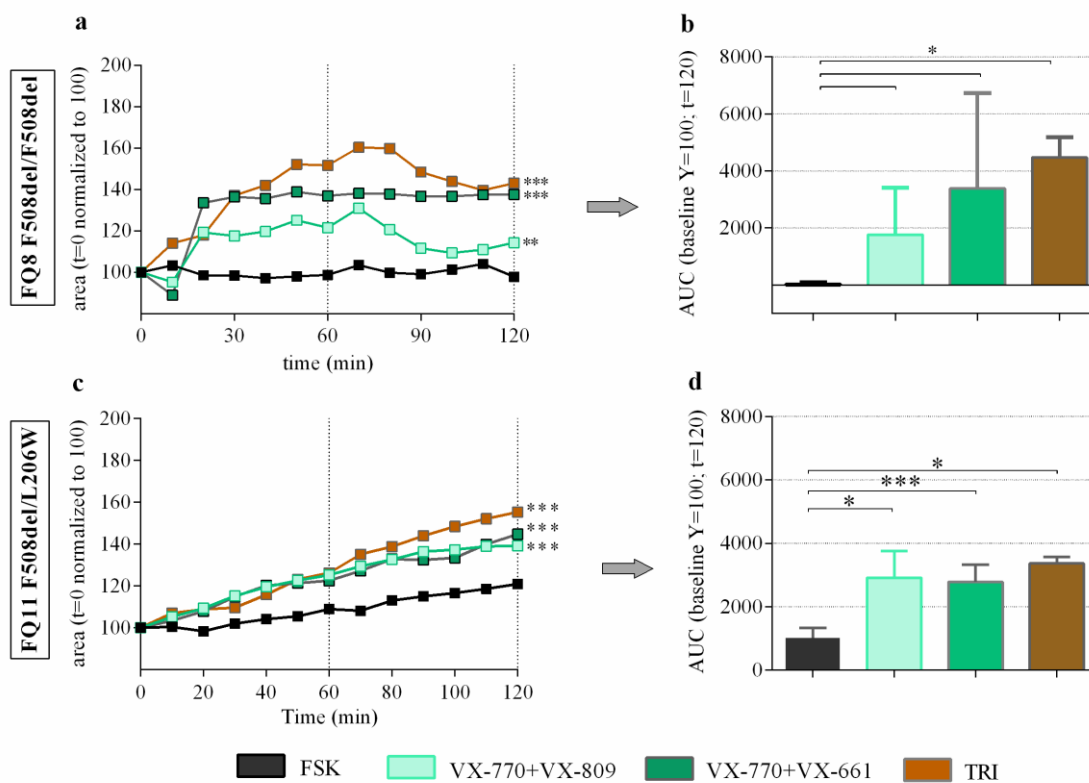


Figura 23. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en organoides intestinales de pacientes que presentan al menos una variante F508del. Se estudió la funcionalidad del CFTR en los organoides intestinales de los pacientes FQ8 F508del/F508del y FQ11 F508del/L206W después de la incubación con las siguientes combinaciones farmacológicas: VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y VX-770+VX-661+VX-445 (“TRI”). Como control negativo se utilizó DMSO. **(a, c)** Se estudiaron las áreas normalizadas de los organoides intestinales de los pacientes F508del/F508del y F508del/L206W. Los valores *p* significativos mostrados se han comparado con condición basal FSK. **(b, d)** A partir de las áreas, se calcularon las AUC, representadas a t=120. Las barras de los gráficos en columna representan las SD. El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y Métodos**). Los *p*-valor exactos a t=60 y a t=120 se pueden consultar en **Anexo resultados**.

El tercer paciente estudiado, FQ16, tenía genotipo clase I/clase I. En las nasoesferas del paciente FQ16, solo se observaron diferencias después de la incubación con la combinación PTC+TRI, después del análisis de las IFRA (t=60 min y t=120 min) (**Figura 24c, d**).

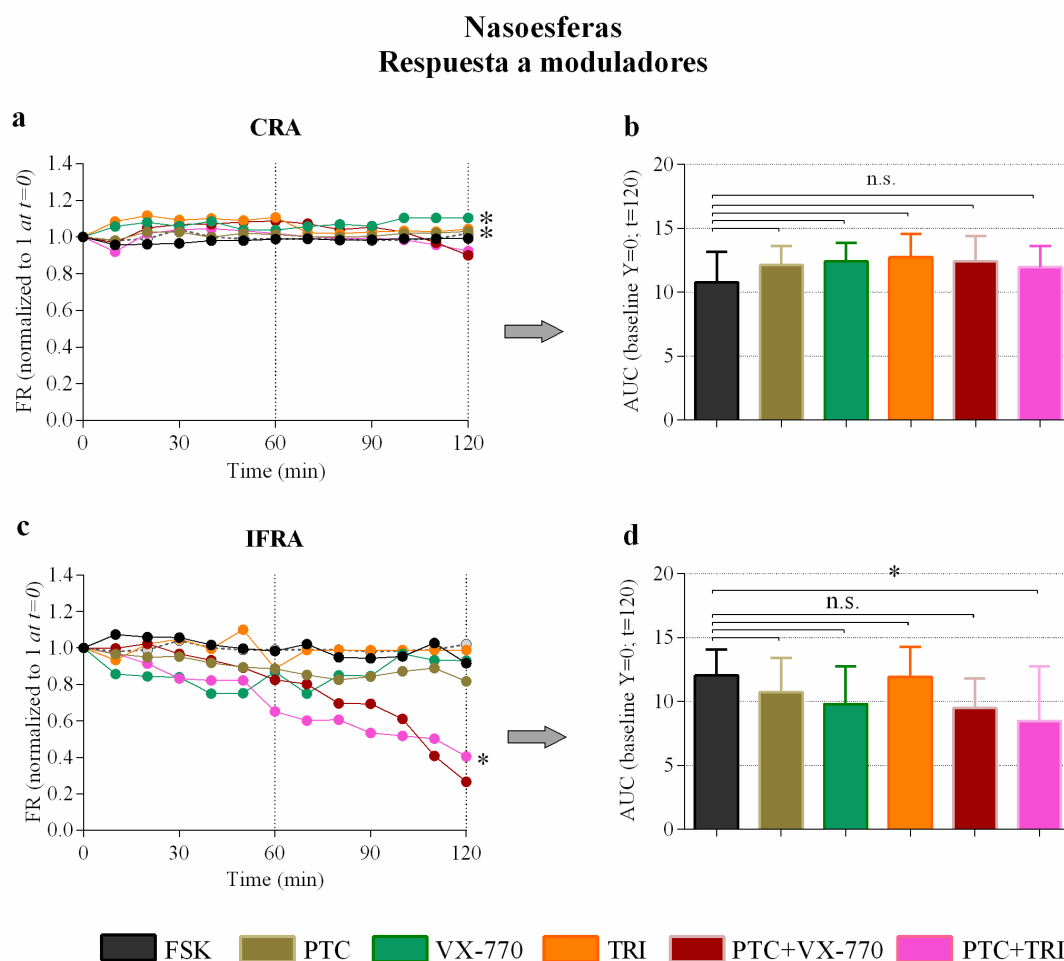


Figura 24. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en las nasoesferas del paciente FQ16 G542X/K668X. Se estudió la funcionalidad del CFTR en las nasoesferas del paciente FQ16 G542X/K668X después de la incubación con las siguientes combinaciones farmacológicas: PTC, VX-770, TRI, PTC+VX-770 y PTC+TRI. Como control negativo se utilizó DMSO. Se calcularon las áreas normalizadas externas CRA (**a**) e internas, IFRA (**c**). (**a**, **c**) Los valores p significativos mostrados se han comparado con condición basal FSK. Sólo se muestran los valores con p significativa. (**b**, **d**) A partir de las áreas normalizadas, se calcularon las AUC, representadas a $t=120$, de las áreas CRA (**b**) e IFRA (**d**). Las barras de los gráficos en columna representan las SD. El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y Métodos**). n.s.: no significativo. Los p -valor exactos $t=60$ y $t=120$ se pueden consultar en **Anexo resultados**.

Para el ensayo FIS en los organoides de FQ16 G542X/K668X con moduladores, se utilizó la concentración de forskolina de $5\mu\text{M}$ (detalles en **Material y Métodos**). Los organoides FQ16 no presentaron diferencias significativas con ninguno de los moduladores probados (**Figura 25a,b**). La condición PTC+TRI también se probó en los organoides con PTC-124 incubado 48 horas antes del estudio FIS, para estimular más la acción de este agente. Tampoco se observaron diferencias significativas entre esta condición y forskolina (**Figura 25c, d**).

Organoides intestinales Respuesta a moduladores

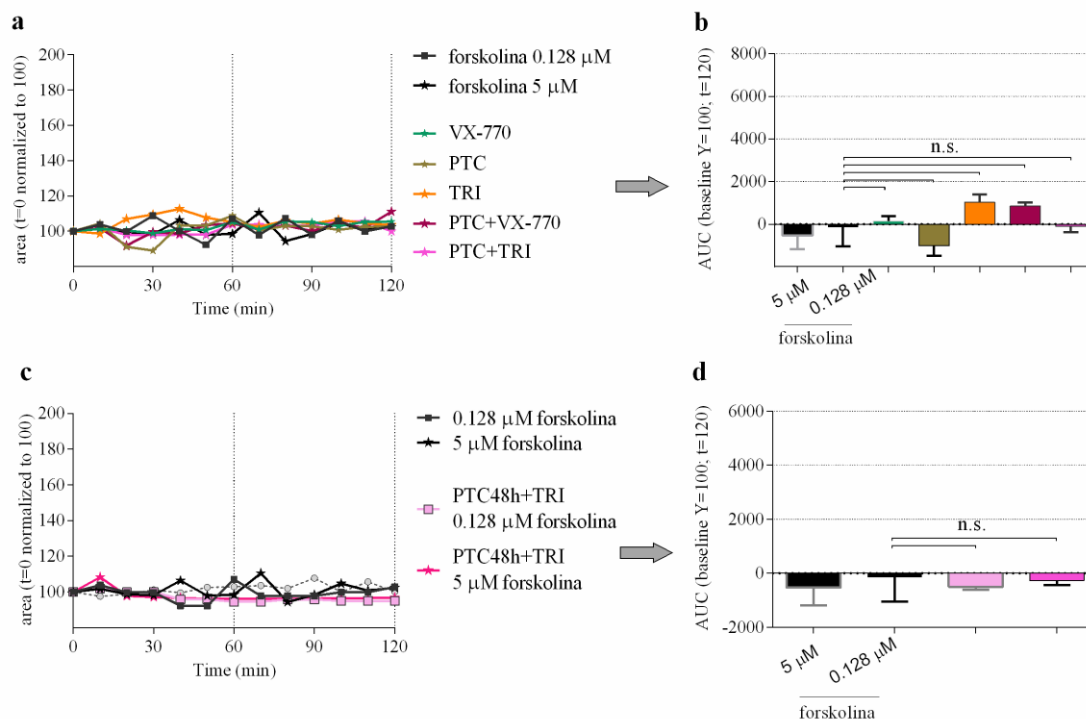


Figura 25. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en los organoides intestinales del paciente FQ16 G542X/K668X. Se estudió la funcionalidad del CFTR en los organoides intestinales del paciente FQ16 G542X/K668X después de la incubación con las siguientes combinaciones farmacológicas: PTC, VX-770, TRI, PTC+VX-770 y PTC+TRI. Como control negativo se utilizó DMSO. **(a)** Primero, se calcularon las áreas normalizadas. Los moduladores se incubaron con 5 μM de forskolina (estrella). Los valores p significativos mostrados se han comparado con condición basal forskolina. Sólo se muestran los valores con p significativa. En el gráfico se muestran las condiciones de moduladores incubadas con 0.128 μM de forskolina. **(b)** A partir de las áreas normalizadas, se calcularon las AUC, representadas a $t=120$. **(c)** Se probó la condición con PTC(48h)+TRI y se estudiaron las áreas normalizadas. **(d)** A partir de las áreas normalizadas, se calcularon las AUC, representadas a $t=120$ min. Las barras de los gráficos en columna representan las SD. **(b, d)** Se muestran los resultados estadísticos después de análisis ANOVA. n.s.: no significativo. Los p -valor exactos a $t=60$ y a $t=120$ se pueden consultar en **Anexo resultados**.

En resumen, las nasoesferas y los organoides intestinales de los pacientes con variantes de función mínima, F508del/F508del (FQ8) y G542X/K668X (FQ16), no mostraron función basal de CFTR al ser estimulados con forskolina. En cambio, las nasoesferas y los organoides intestinales del paciente FQ11, con la variante de función residual L206W, sí mostraron función de CFTR *in vitro* después de la incubación con forskolina. Las combinaciones de moduladores probadas en las nasoesferas y organoides intestinales de los pacientes FQ8 F508del/F508del y FQ11 F508del/L206W (VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI) aumentaron la funcionalidad de CFTR *in vitro*. Por otro lado, los tratamientos con PTC, VX-770, TRI y PTC+VX-770 no

consiguieron corregir la funcionalidad de CFTR *in vitro* ni en las nasoesferas ni en los organoides intestinales del paciente con genotipo G542X/K668X (FQ16). Sin embargo, el estudio de las IFRA en nasoesferas de este paciente, mostró respuesta significativa después de la incubación con PTC+TRI al compararla con FSK. Este resultado no se observó en los organoides intestinales del mismo paciente.

3.3. Correlación de los resultados del estudio funcional en nasoesferas con el estudio FIS en organoides intestinales

Para confirmar que los resultados obtenidos a partir del estudio funcional en nasoesferas podrían ser equivalentes con los del experimento FIS en organoides intestinales, se realizaron varias correlaciones mediante el test de Spearman (t=120 minutos). Cabe recordar que las nasoesferas presentan la membrana apical hacia el exterior, mientras que, en los organoides, se encuentra orientada hacia el interior. Al activar el transporte mediante CFTR, las nasoesferas transportan el flujo hacia fuera y reducen su perímetro. En cambio, los organoides intestinales, realizan el transporte hacia la luz interna, aumentando su tamaño.

Primero, se contrastaron las áreas externas e internas obtenidas de nasoesferas (FR-CRA y FR-IFRA) con las áreas CRA del estudio FIS en organoides (**Figura 26a,b**). A continuación, se enfrentaron las AUC obtenidas de CRA e IFRA de nasoesferas con las AUC-CRA de organoides (**Figura 26c,d**). Los estudios funcionales de nasoesferas y organoides intestinales utilizando las muestras de los tres pacientes mostraron correlación inversa significativa ($r=-0.6659$ * $p=0.0113$, $r=-0.7261$ *** $p=0.0042$, $r=-0.5604$ *** $p=0.00401$) (**Figura 26a,c,d**). El análisis de IFRA de nasoesferas *versus* las áreas CRA de organoides (**Figura 26b**), mostró una correlación inversa significativa ($r=-0.6264$, ** $p=0.0251$) después de excluir los valores de nasoesferas y organoides discordantes entre ellos, PTC+TRI en FQ16.

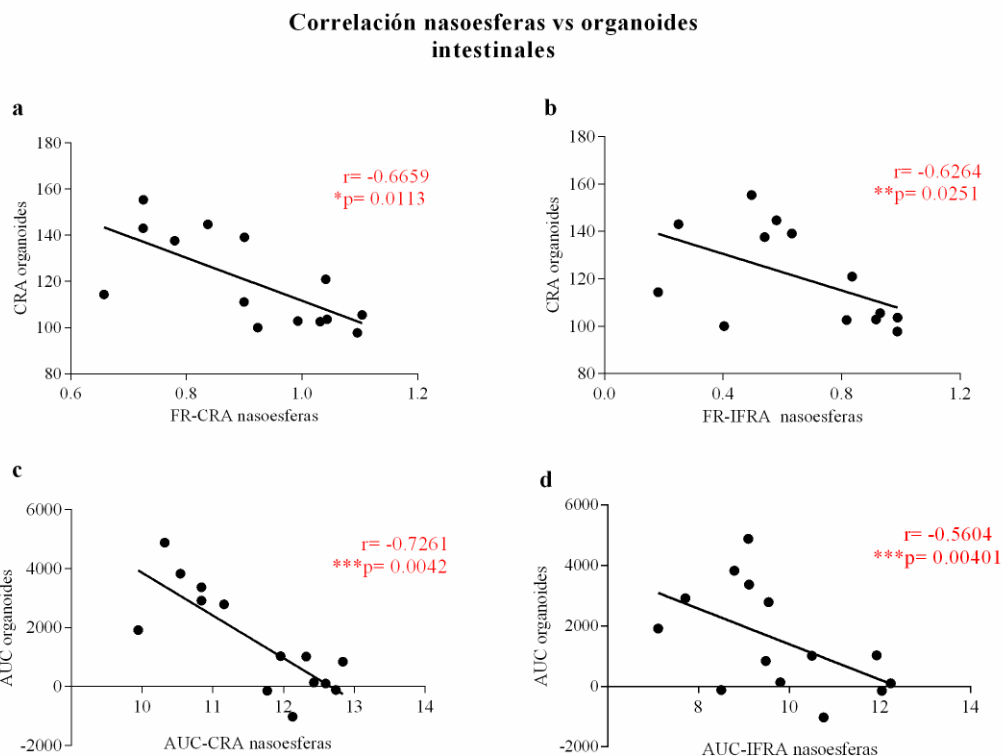


Figura 26. Estudio de correlación entre los valores obtenidos en los estudios funcionales de las nasoesferas y FIS en organoides intestinales de tres pacientes FQ. Se compararon los diferentes resultados obtenidos en los estudios funcionales en nasoesferas y FIS de organoides intestinales de los pacientes FQ8 F508del/F508del, FQ11 F508del/L206W y FQ16 G542X/K668. Como se ha observado que algunas respuestas significativas se observan mejor a $t=120$, se realizan las correlaciones a $t=120$. El análisis de correlación se realizó mediante el test de Spearman. **(a)** Primero, se compararon los valores obtenidos del estudio de las áreas normalizadas nasoesferas (FR-CRA, eje X) y organoides (eje Y) a $t=120$. **(b)** Se realizó la misma correlación, pero con las FR-IFRA de nasoesferas (eje X). Cuando se extrajo del análisis de correlación los valores discordantes obtenidos en nasoesferas y organoides en la condición PTC+TRI G542X/K668, la correlación fue significativa. **(c, d)** Para correlacionar las trayectorias de las áreas, se enfrentaron los valores de AUC de nasoesferas y organoides ($t=120$ min) **(c, d)**.

4. ANÁLISIS DE LA RESTABLECIMIENTO FUNCIONAL DE CFTR DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON MODULADORES EN NASOESFERAS DE PACIENTES FQ CON DIFERENTES GENOTIPOS

NOTA: los valores p exactos se pueden consultar en **Anexo resultados**.

4.1. Restauración de la funcionalidad de CFTR en nasoesferas de pacientes FQ con genotipo F508del/F508del mediante moduladores

Se estudió la funcionalidad de CFTR y su corrección mediante moduladores en las nasoesferas de tres pacientes homocigotos para la variante F508del, FQ8, FQ9 y FQ10. La información y las características clínicas de los pacientes se encuentran en la **Tabla 4**, en **Material y Métodos**.

Después de 7 – 8 días de cultivo de nasoesferas, se siguieron durante 120 minutos en microscopía confocal, después de observar en el apartado 3 de **Resultados** que a t=120 minutos de estudio pueden verse algunas diferencias de manera más concisa que a t=60 minutos. Se captaron imágenes cada 10 minutos siguiendo el protocolo ya publicado [141]. Se estudiaron las siguientes condiciones: control negativo (“DMSO”), activación del canal CFTR (“FSK”) y activación del CFTR en presencia de las siguientes combinaciones de moduladores:

Paciente	Genotipo <i>CFTR</i>	Tratamientos probados <i>in vitro</i>
FQ8	F508del/F508del	VX-770+VX-809, VX-770+VX-661, VX-770+VX-661+VX-445 (“TRI”)
FQ9	F508del/F508del	
FQ10	F508del/F508del	

A partir de los datos extraídos, se calculó FR y AUC en las CRA e IFRA. Como era esperado, las nasoesferas F508del/F508del no presentaron diferencias significativas entre las condiciones FSK vs DMSO (**Figura 27**). Después de la incubación con las combinaciones farmacológicas probadas, se restauró la funcionalidad de CFTR *in vitro*. Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con TRI vs VX-770+VX-809 pero no vs VX-770+VX-661 (AUC, ver en **Anexo Resultados**).

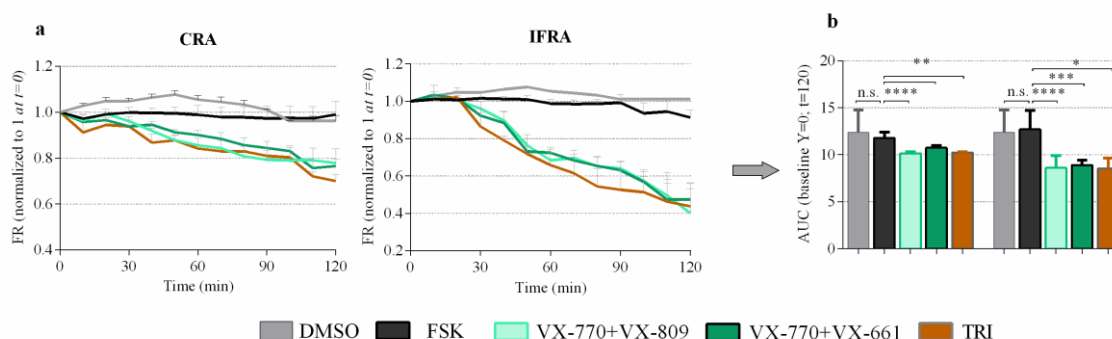


Figura 27. Restauración de la funcionalidad de CFTR en nasoesferas de pacientes FQ con genotipo F508del/F508del mediante moduladores. Se estudió la funcionalidad del CFTR en las nasoesferas de tres pacientes con genotipo F508del/F508del (FQ8, FQ9 y FQ10) con y sin fármacos moduladores (VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y VX-770+VX-661+VX-445 “TRI”). Como control negativo se utilizó DMSO. En los gráficos, se muestra la media de las respuestas de los tres pacientes. Las barras verticales enseñan las SD. (a, b) Se analizaron las áreas externas e internas F508del/F508del. Los valores *p* significativos mostrados se han comparado con la condición basal FSK. Test ANOVA TRI vs VX-770+809 dio significativo en las AUC-CRA** (no mostrado en el gráfico). (c) A partir de las áreas normalizadas CRA e IFRA, se calcularon las AUC a t=120 min. Las barras de los gráficos en columna representan las SD. El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y Métodos**). n.s.: no significativo. Los *p*-valor exactos se pueden consultar en **Anexo resultados**.

4.2. Estudio de la respuesta de la funcionalidad de CFTR en nasoesferas de pacientes FQ heterocigotos para F508del

Se estudiaron las nasoesferas de cinco pacientes heterocigotos para la variante F508del. La segunda variante presentada era: L206W (n=2), 1677delTA (n=1), variante patogénica sin determinar “s.d.” (n=1) o G542X clase I (n=1). La información y las características clínicas de los pacientes se encuentra en la **Tabla 4**, en **Material y Métodos**.

Primero, se estudió la funcionalidad basal del CFTR en los cinco pacientes, incubando las nasoesferas con FSK. Después, se probaron distintas combinaciones de moduladores *in vitro*, dependiendo de la segunda variante presentada:

Paciente	Genotipo CFTR	Tratamientos testados <i>in vitro</i>
FQ11	F508del/L206W	VX-770+VX-809, VX-770+VX-661, VX-770+VX-661+VX-445 (“TRI”)
FQ12	F508del/L206W	
FQ13	F508del/1667delTA	
FQ14	F508del/s.d.	
FQ15	F508del/G542X	PTC-124 (“PTC”), VX-770, PTC+TRI

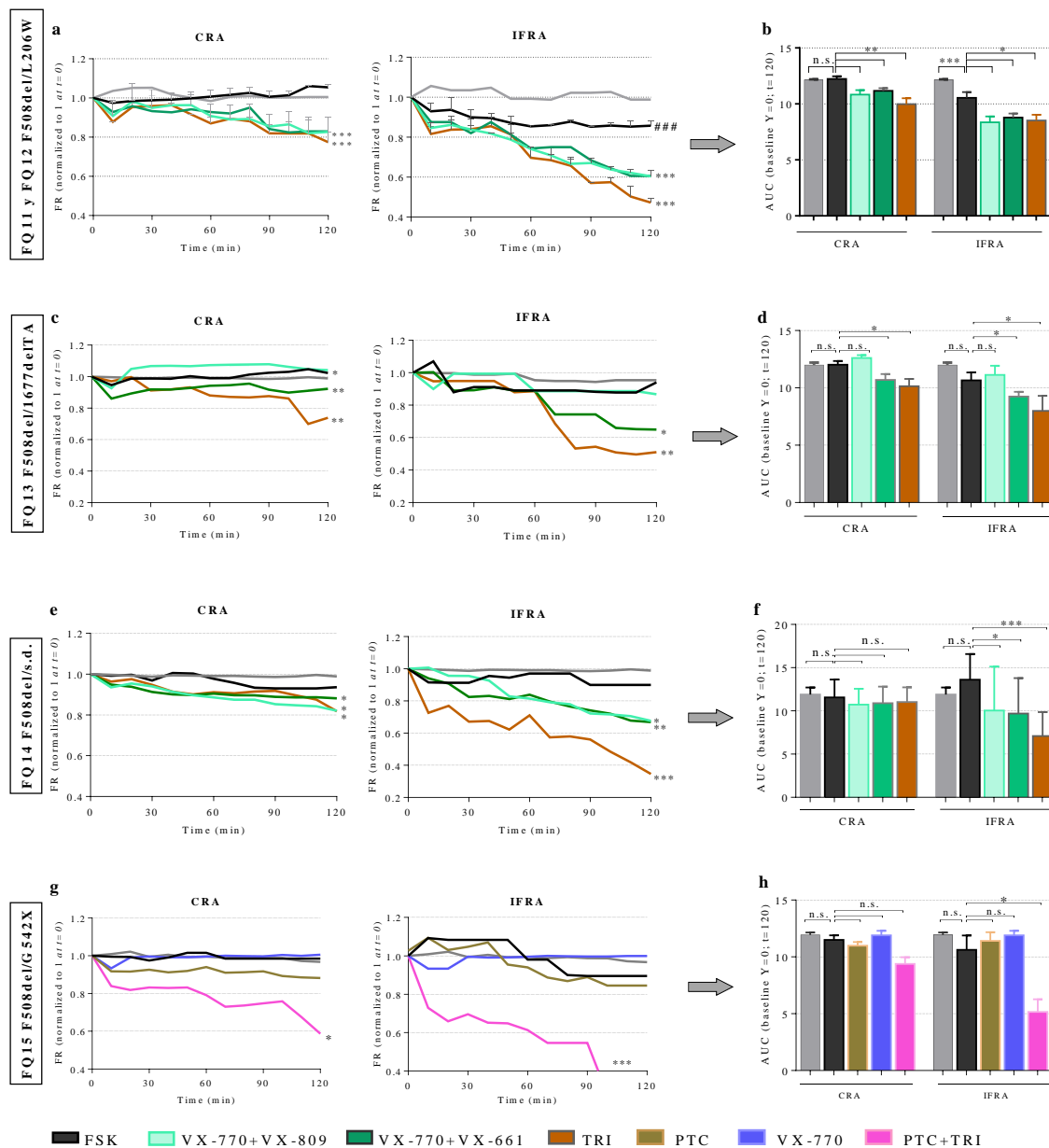
Las nasoesferas con el genotipo F508del/L206W (n=2), mostraron función residual del CFTR cuando se compararon las condiciones FSK vs DMSO (IFRA) (**Figura 28a,b**). La incubación con las tres combinaciones farmacológicas probadas resultó en una reducción del área de las nasoesferas significativa respecto a FSK (**Figura 28a,b**). No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con TRI respecto a VX-770+VX-809 y VX-770+VX-661 (AUC, ver en **Anexo Resultados**).

El paciente FQ13, con la variante patogénica 1677delTA, no presentó diferencias significativas entre DMSO y FSK (**Figura 28c,d**). Las nasoesferas FQ13 recuperaron la funcionalidad de CFTR *in vitro* después de la incubación con VX-770+VX-661 y TRI pero no con VX-770+VX-809 (**Figura 28c,d**).

El paciente FQ14, que presenta una variante no determinada, no mostró funcionalidad después de la incubación con FSK comparado con el control negativo DMSO. Si mostró funcionalidad de CFTR *in vitro* después de la incubación con los fármacos moduladores (**Figura 28e,f**). Las nasoesferas de este paciente incubadas con TRI, no presentaron reducción significativa respecto con las otras opciones terapéuticas con moduladores (AUC, ver en **Anexo Resultados**).

Por último, el paciente con la variante patogénica de clase I, G542X (FQ15), no presentaba funcionalidad de CFTR al comparar FSK vs DMSO (**Figura 28**). Las nasoesferas F508del/G542X se redujeron de manera significativa sólo después de la incubación con

PTC+TRI, respecto a la condición FSK. No se mostraron diferencias significativas entre FSK y las otras terapias testadas (**Figura 28g,h**).



4.3. Análisis de la corrección de la función de CFTR mediante fármacos moduladores en pacientes que no presentan la variante F508del

Finalmente, se estudiaron dos pacientes con variantes patogénicas distintas a F508del. Dentro del grupo encontramos los siguientes genotipos: W128X/W128X (n=1) y L227R/L227R (n=1). La información y las características clínicas de los pacientes se encuentran en la **Tabla 4**, en **Material y Métodos**. Para este grupo de pacientes se probaron las siguientes combinaciones de moduladores:

Paciente	Genotipo <i>CFTR</i>	Tratamientos testados <i>in vitro</i>
FQ17	W128X/W128X	PTC-124 (“PTC”), VX-770, VX-770+VX-661+VX-445 (“TRI”), PTC+VX-770, PTC+TRI
FQ18	L227R/L227R	VX-770+VX-809, VX-770+VX-661, VX-770+VX-661+VX-445 (“TRI”)

El paciente FQ17 con genotipo W128X/W128X, no presentaba funcionalidad de CFTR después de la incubación con FSK, comparado con el control negativo DMSO (**Figura 29a,b**). No se observó reducción significativa de las áreas de las nasoesferas después de los tratamientos con VX-770 y TRI (**Figura 29a,b**). Las nasoesferas del paciente FQ17, presentaron funcionalidad de CFTR después de la incubación con PTC, PTC+VX-770 y PTC+TRI (**Figura 29a,b**). La combinación de VX-770 y VX-770+VX-661+VX-809 con PTC-124, no potenció el efecto de la molécula PTC-124 (ver **Anexo Resultados**).

El paciente FQ18, con genotipo L227R/L227R, no presentó funcionalidad de CFTR después de la incubación con FSK, respecto a DMSO (**Figura 29c,d**). Ninguno de moduladores probados hizo restablecer la funcionalidad de CFTR *in vitro* (**Figura 29c,d**). Esto concuerda con la respuesta observada (t=60 min) del paciente con el que comparte genotipo, FQ4 (**Figura 18; Tabla 4**), y que es su hermano.

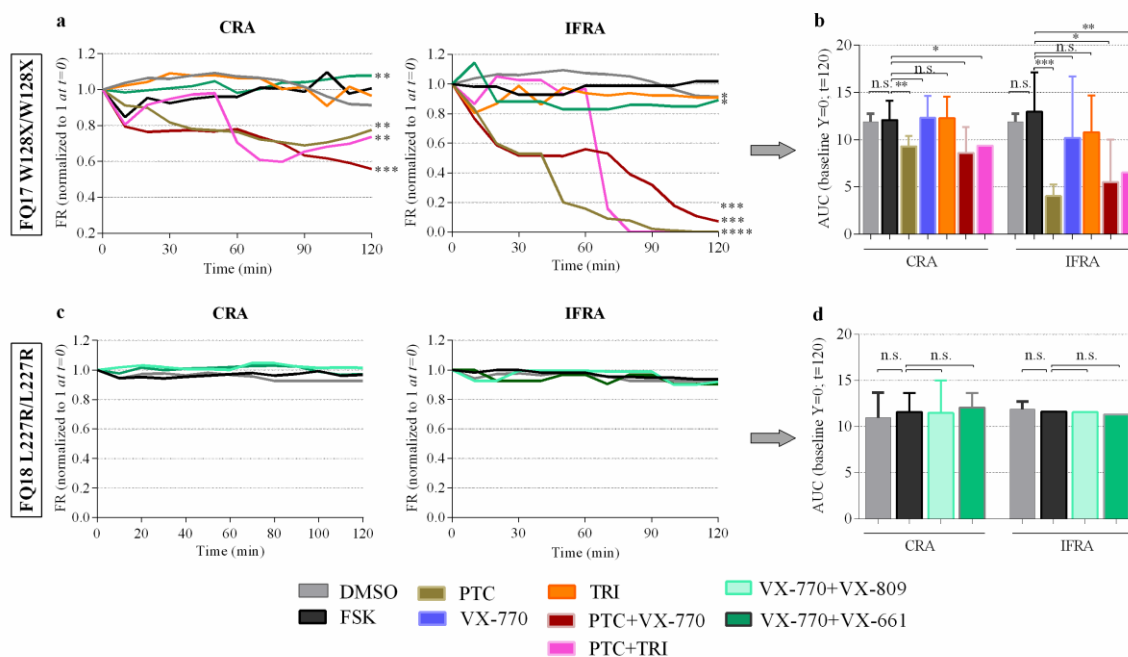


Figura 29. Análisis de la funcionalidad de CFTR en nasoesferas de pacientes que no presentan la variante F508del después de la incubación con moduladores. Se estudió la funcionalidad del CFTR en las nasoesferas de dos pacientes homocigotos para variante distinta a F508del: FQ17 W128X/W128X y FQ18 L227R/L227R. Como control negativo se utilizó DMSO. **(a, c)** Se analizaron las áreas externas CRA e internas IFRA de los pacientes. Los valores p significativos mostrados se han comparado con condición basal FSK. Sólo se muestran los valores con p significativa. **(b, d, f)** A partir de las áreas normalizadas CRA e IFRA, se calcularon las AUC a $t=120$ min. Las barras de los gráficos en columna representan las SD. El número de asteriscos muestra el nivel de significación (ver **Material y Métodos**). n.s.: no significativo. Los p valor exactos se pueden consultar en **Anexo resultados**.

5. ANEXOS RESULTADOS

5.1. Resultados estadísticos de las Figuras de la sección 3

Figura 20. Estudio de la funcionalidad basal de CFTR en las nasoesferas de tres pacientes con FQ.

- FQ8, DMSO vs FSK. **(a) CRA** $t=60$ min : $p=0.4375$, $t=120$ min : $p=0.6772$. **(b) CRA-AUC** $t=60$ min : $p=0.3915$, $t=120$ min : $p=0.6485$. **(c) IFRA** $t=60$ min : $p=0.0938$, $t=120$ min $p=0.9097$. **(d) AUC-IFRA** $t=60$ min : $p=0.2504$, $t=120$ min : $p=0.2504$.
- FQ11, DMSO vs FSK. **(a) CRA** $t=60$ min : $p=0.4697$, $t=120$ min : $p=0.5625$. **(b) CRA-AUC** $t=60$ min : $p=0.9275$, $t=120$ min : $p=0.2815$. **(c) IFRA** $t=60$ min : $*p=0.0313$, $t=120$ min : $***p=0.0005$. **(d) AUC-IFRA** $t=60$ min : $***p=0.0002$, $t=120$ min : $***p=0.0007$.

- FQ16, DMSO vs FSK. (a) CRA t=60 min : p=0.0938, t=120 min : p=0.0938. (b) CRA-AUC t=60 min : p=0.3958, t=120 min : p=0.3958. (c) IFRA t=60 min : p=0.0938, t=120 min : p=0.3804. (d) AUC-IFRA t=60 min : p=0.2500, t=120 min : p=0.7692.

Figura 21. Estudio de la funcionalidad de CFTR basal en los organoides intestinales de tres pacientes con FQ.

- FQ8, DMSO vs forskolina. (c) AUC-CRA t=60 min : forskolina 0.128 μ M p>0.999 y forskolina 0.8 μ M p=0.6667, t=120 min: forskolina 0.128 μ M p=0.444 y forskolina 0.8 μ M p=0.1250.
- FQ11, DMSO vs forskolina. (c) AUC-CRA t=60 min: forskolina 0.128 μ M p=0.3125, forskolina 0.8 μ M p=0.1563, t=120 min: forskolina 0.128 μ M *p=0.00286 y forskolina 0.8 μ M *p=0.00286.
- FQ16, DMSO vs forskolina. (c) AUC-CRA t=60 min: forskolina 0.128 μ M p<0.999 y forskolina 0.8 μ M p<0.999, t=120 min: forskolina 0.128 μ M p>0.999 y forskolina 0.8 μ M p>0.999.

Figura 22. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en las nasoesferas de los pacientes que presentan al menos una variante F508del.

- FQ8, FSK vs moduladores. (a) FR-CRA t=60 min : VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI vs FSK *p=0.0313, t=120 min : VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI vs FSK ***p=0.0005. FR-IFRA t=60 min : VX-770+VX-809 *p=0.0313, VX-770+VX-661 *p=0.0313, TRI *p=0.0313, t=120 min : VX-770+VX-809 ***p=0.0005, VX-770+VX-661 *p=0.0122, TRI **p=0.0034. (b) AUC-CRA t=60 min : VX-770+VX-809 p=0.2023, VX-770+VX-661 *p=0.0238, TRI p=0.1167, t=120 min : VX-770+VX-809 *p=0.0192, VX-770+VX-661 y TRI *p=0.0238. AUC-IFRA t=60 min : VX-770+VX-809 ***p=0.0004, VX-770+VX-661 ***p=0.0003, TRI ***p=0.0007, t=120 min : VX-770+VX-809 ***p<0.0001, VX-770+VX-661 **p=0.0012 y TRI *p=0.0480.
- FQ8, VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI, t=120 min (ANOVA). (b) AUC-CRA : p=0.6337, AUC-IFRA : p=0.1178.
- FQ11, FSK vs moduladores. (c) FR-CRA t=60 min : VX-770+VX-809 p=0.5625, VX-770+VX-661 y TRI *p=0.313, t=120 min : VX-770+VX-809 *p=0.0463, VX-770+VX-809 y TRI **p=0.0007. FR-IFRA t=60 min : VX-770+VX-809, VX-770+VX-809 y TRI *p=0.0313, t=120 min : VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI ***p=0.0005. (d) AUC-CRA t=60 min : *p=0.0179 VX-770+VX-809, *p=0.0448 VX-770+VX-661 y ***p=0.0078 TRI, t=120 min : VX-770+VX-809 p=0.6466, VX-770+VX-661 *p=0.0206, TRI *p=0.0314. (d) AUC-IFRA t=60 min : VX-770+VX-809 *p=0.0446, VX-770+VX-661 *p=0.0402 y TRI *p=0.0357, t=120 min : VX-770+VX-809 *p=0.0463, VX-770+VX-661 **p=0.0017, TRI **p=0.0070.

- FQ11, VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI, t=120 min (ANOVA). (d) AUC-CRA: p=0.8973, AUC-IFRA: p=0.3247.
- FQ11, VX-770+VX-809 vs VX-770+VX-661, t=120 min. (d) AUC-CRA: p=0.5421, AUC-IFRA: p=0.1193.

Figura 23. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en los organoides intestinales de los pacientes que presentan al menos una variante F508del.

- FQ8, forskolina vs moduladores. (a) CRA t=60 min: VX-770+VX-809 p=0.0625, VX-770+VX-661 p=0.0625, TRI *p=0.0313, t=120 min: VX-770+VX-809 **p=0.024, VX-770+VX-661 ***p=0.0010 y TRI ***p=0.0005. (b) AUC-CRA t=60 min: VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI *p=0.0286, t=120 min: VX-770+VX-809 *p=0.0357, VX-770+VX-809 *p=0.0313, TRI *p=0.0357.
- FQ8, VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI t=120 min (ANOVA). (b) AUC-CRA: p=0.2778.
- FQ11, FSK vs moduladores. (c) CRA t=60 min: VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI *p=0.0313, VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI ****p=0.0005. (d) AUC-CRA t=60 min: VX-770+VX-809 *p=0.0024, VX-770+VX-661 y TRI *p=0.0286, t=120 min: VX-770+VX-809 *p=0.0286, VX-770+VX-661 ***p=0.0005 y TRI *p=0.0286.
- FQ11, VX-770+VX-809, VX-770+VX-661, t=120 min (ANOVA). (d) AUC-CRA: t=120 min p=0.3217.
- FQ11, VX-770+VX-809 vs VX-770+VX-661, t=120 min. (d) AUC: p>0.999.

Figura 24. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en las nasoesferas del paciente FQ16 G542X/K668X.

- FQ16, FSK vs moduladores. (a) FR-CRA t=60 min: PTC p=0.0938, PTC+TRI p=0.0938, PTC+VX-770 p=0.0625, VX-770 p=0.0625 y TRI p=0.0625, t=120 min: PTC p=0.0938, VX-770 ***p=0.0005 (algunos valores > FSK) TRI ***p=0.0005 (algunos valores > FSK), PTC+VX-770 p= PTC+TRI P=0.3160). (b) AUC-CRA t=60 min: PTC p=0.8612, VX-770 p=0.2752, TRI p=0.0620, PTC+VX-770 p=0.1594, PTC+TRI p=0.6227, t=120 min: PTC p=0.1131, VX-770 p=0.140, TRI p=0.0861, PTC+VX-770 p=0.0661, PTC+TRI p=0.6227. (c) FR-IFRA t=60 min: PTC p=0.5625, VX-770 p=0.0625, TRI p=0.4375, PTC+VX-770 p=0.0938, PTC+TRI *p=0.0313, t=120 min: PTC p=0.3652, VX-770 p=0.5195, TRI p=0.2061, PTC+VX-770 p=0.6377, PTC+TRI **p=0.0010. (d) AUC-IFRA t=60 min: PTC p=0.1799, VX-770 p=0.1026, TRI p=0.9011, PTC+VX-770 p=0.5523, PTC+TRI *p=0.0454, t=120 min: PTC p=0.1729, VX-770 p=0.2308, TRI p=0.7692, PTC+VX p=0.0104, PTC+TRI *p=0.0039.

Figura 25. Estudio de la funcionalidad de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores en los organoides intestinales del paciente FQ16 G542X/K668X.

- FQ16, forskolina y todas las combinaciones de moduladores (ANOVA). (a) CRA t=60 min: p=0.2881, t=120 min: p=0.1233. (b) AUC-CRA t=60 min: p=0.1711, t=120 min: p=0.0614. (c) CRA t=60 min : p=0.8438, t=120 min : p=0.3799. (d) AUC-CRA t=60 min y 120 min: p>0.999.

5.2. Resultados estadísticos de las Figuras de la sección 4

Figura 27. Restauración de la funcionalidad de CFTR en nasoesferas de pacientes FQ con genotipo F508del/F508del mediante moduladores.

- F508del/F508del (n=3), FSK vs DMSO. (a) FR-CRA p=0.0640, (b) AUC-CRA p=0.0977, AUC-IFRA p=0.7289.
- F508del/F508del (n=3), FSK vs moduladores. (a) FR-CRA VX-770+VX-809 ***p=0.0010, VX-770+VX-661 ***p=0.0005, TRI ***p=0.0005. FR-IFRA VX-770+VX-809 *p=0.0137, VX-770+VX-661 **p=0.0004, TRI **p<0.0001. ANOVA TRI vs VX-770+VX-809+VX-661 **p=0.0062. (b) AUC-CRA VX-770+VX-809 ****p<0.0001, VX-770+VX-661 **p=0.0375, TRI **p=0.0022. AUC-IFRA: VX-770+VX-809 ****p<0.0001, VX-770+VX-661 ***p=0.0004 y TRI *p=0.0137.
- F508del/F508del (n=3), VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI (ANOVA). (b) AUC-CRA TRI vs VX-770+VX-809 **, TRI vs VX-770+VX-661 p=n.s.. AUC-IFRA p=0.9789.

Figura 28. Análisis de la funcionalidad de CFTR en nasoesferas de pacientes heterocigotos para F508del después de la incubación con moduladores.

- F508del/L206W (n=2), FSK vs DMSO. (a) FR-CRA p=0.3804, FR-IFRA ***p=0.0005. (b) AUC-CRA p=0.6457, AUC-IFRA p<0.0001.
- F508del/L206W (n=2), FSK vs moduladores. (a) FR-CRA VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI ****p=0.0005. (b) AUC-CRA: VX-770+VX-809 ****p<0.0001, VX-770+VX-661 **p=0.023 TRI **p=0.0016. AUC-IFRA: VX-770+VX-809 *p=0.0252, VX-770+VX-661 *p=0.0163, TRI *p=0.0170.
- F508del/L206W (n=2), VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI (ANOVA). (b) AUC-CRA p=0.1644, AUC-IFRA p=0.8514.
- FQ13, FSK vs DMSO: (c) FR-CRA p=, FR-IFRA p=0.0918. (d) AUC-CRA p=0.6014, AUC-IFRA p=0.4034.
- FQ13, FSK vs moduladores. (c) FR-CRA: VX-770+VX-809 *p=0.0029 (algunos valores por encima de FSK), VX-770+VX-661 ***p=0.0005 y TRI **p=0.0024. FR-IFRA VX-770+VX-809 p>0.999, VX-770+VX-661 *p=0.0311, TRI **p=0.0093. (d) AUC-CRA: VX-770+VX-

- 809 $p=0.3933$, VX-770+VX-661 $*p=0.0457$, TRI $*p=0.0267$. AUC-IFRA: VX-770+VX-809 $p=0.8349$, VX-770+VX-661 $*p=0.0319$, TRI $*p=0.0396$.
- FQ14, FSK vs DMSO. (e) FRA-CRA $p=0.1726$, FR-IFRA $p=$. (f) AUC-CRA $p=0.7694$. AUC-IFRA $p=0.0612$.
 - FQ14, FSK vs moduladores: (e) FR-CRA: VX-770+VX-809 y VX-770+VX-661 $***p=0.0005$, TRI $***p=0.0010$. FR-IFRA VX-770+VX-809 $*p=0.0161$, VX-770+VX-661 $**p=0.0015$, TRI $***p=0.0005$. (f) AUC-CRA VX-770+VX-809 $p=0.3842$, VX-770+VX-661 $p=0.4637$, TRI $p=0.5948$. AUC-IFRA VX-770+VX-809 $*p=0.0334$, VX-770+VX-661 $*p=0.0169$, TRI $***p=0.0002$.
 - FQ14, VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y TRI (ANOVA): (f) AUC-CRA $p=0.5948$. AUC-IFRA $p=0.1884$.
 - FQ15, FSK vs DMSO. (g) FR-CRA $p=0.7334$. FR-IFRA $p=0.8805$. (h) AUC-CRA $p=0.4531$. AUC-IFRA $p=0.2633$.
 - FQ15, FSK vs moduladores. (g) FR-CRA: PTC $**p=0.0024$, VX-770 $p=0.0640$, PTC+TRI $***p=0.0005$. FR-IFRA PTC $p=0.7773$, VX-770 $p=0.2625$, PTC+TRI $***p=0.0005$. (h) AUC-CRA PTC $p=0.3364$, VX-770 $p=0.2626$, PTC+TRI $*p=0.0168$, AUC-IFRA PTC $p=0.4762$, VX-770 $p=0.2530$, PTC+TRI $*p=0.0168$.

Figura 29. Análisis de la funcionalidad de CFTR en nasoesferas de pacientes que no presentan la variante F508del después de la incubación con moduladores.

- FQ17, FSK vs DMSO. (a) FR-CRA $p=0.1294$. FR-IFRA $p=0.1294$. (b) AUC-CRA: $p=0.200$. AUC-IFRA $p=0.5348$.
- FQ17, FSK vs moduladores. (a) FR-CRA: PTC $**p=0.0015$, VX-770 $*p=0.0044$ (algunos valores $>$ FSK), TRI $p=0.0923$, PTC+VX-770 $***p=0.0005$, PTC+TRI $**p=0.0068$. FR-IFRA: PTC $***p<0.0001$, VX-770 $*p=0.0026$ (algunos valores $>$ FSK), TRI $*p=0.0049$ (algunos valores $>$ FSK), PTC+VX-770 y PTC+TRI $***p=0.0005$. (b) AUC-CRA: PTC $**p=0.0012$, VX-770 $p=0.9582$, TRI $p=0.8094$, PTC+VX-770 $*p=0.0191$, PTC+TRI $*p=0.0141$. AUC-IFRA: PTC $***p<0.0001$, VX-770 $p=0.3983$, TRI $p=0.1381$, PTC+VX-770 $*p=0.0295$, PTC+TRI $**p=0.0016$.
- FQ17, PTC, PTC+VX-770 y PTC+VX-770+VX-661+VX-445 (ANOVA). (b) AUC-CRA $p=0.7701$. AUC-IFRA $p=0.1074$.
- FQ18, FSK vs DMSO. (c) FR-CRA: $p=0.1294$. FR-IFRA $p=0.1112$. (d) AUC-CRA: $p=0.8196$, AUC-IFRA: $p=0.6667$.

- FQ18, FSK vs moduladores (ANOVA). (c) FR-CRA: $p=0.7961$. FR-IFRA: $p=0.2731$. (d) CRA-AUC: $p=0.2636$. AUC-IFRA: $p=0.667$.

VI – Discusión

Antecedentes y justificación de este trabajo de tesis

La Fibrosis Quística es una enfermedad multiorgánica que presenta una extensa variedad de genotipos y expresiones fenotípicas. La irrupción de los fármacos moduladores, que reestablecen parte de la funcionalidad de la proteína CFTR, ha supuesto una gran mejora en las perspectivas actuales y futuras de la enfermedad. Algunas de las moléculas moduladoras, ya han sido aprobadas, en monoterapia o en combinación, por las agencias de medicamentos *Food Drug Administration*, FDA y *European Medicines Agency*, EMA para ciertos genotipos CFTR (**Tabla 2**, en **Introducción**). La implementación de estas terapias en la práctica clínica, ha hecho incrementar de manera exponencial la esperanza y calidad de vida de los pacientes FQ.

Sin embargo, las respuestas farmacológicas no son iguales en todos los pacientes, inclusive en aquellos con el mismo genotipo, como se demuestra tanto en publicaciones previas como con el trabajo desarrollado en esta tesis.

El interés inicial de esta tesis doctoral fue poder disponer de un ensayo funcional de CFTR a partir de células primarias de pacientes. Para mimetizar la respuesta del sistema respiratorio, se optó por trabajar con células primarias obtenidas del epitelio respiratorio. De todas las células que conforman este epitelio, las de más fácil obtención son las células nasales; se pueden obtener mediante un pequeño raspado o curetaje nasal, método no invasivo e indoloro para el paciente. Sin embargo, los ensayos funcionales ya establecidos con células nasales, los estudios electrofisiológicos, presentan dificultad, largos tiempos de cultivo (cultivo en *air-liquid interface*; $\approx 50\%$ probabilidades de éxito y ≈ 30 días de cultivo) [149, 150] y requieren de especialización técnica del equipamiento a utilizar [151-153]. Mientras se analizaban distintas opciones para realizar estudios funcionales, en el año 2017 se publicó un ensayo funcional en esferas formadas *in vitro* a partir de células primarias nasales [137]. Este artículo, describía como el compuesto forskolina activaba el transporte de CFTR en estas nasoesferas y producía un cambio relativamente fácil de cuantificar mediante análisis de imagen: la reducción del tamaño de las estructuras esféricas. Aunque previamente ya se había descrito la formación de esferas a partir de células nasales [154], el artículo del 2017 [137] fue el primero en utilizar estas estructuras tridimensionales para el estudio de funcionalidad de CFTR. A pesar de las ventajas presentadas por este método (fácil obtención y cultivo, resultados rápidos), el estudio *in vivo* por microscopía resultaba dificultoso; las nasoesferas crecían en suspensión y estaban en continuo movimiento durante la(s) hora(s) que duraba el ensayo. Esto hacía que fuera imposible hacer un seguimiento de las esferas y por lo tanto, anulaba el estudio. Por otro lado, la *n* de estudio publicado en el artículo del 2017 era baja y presentaban datos de sólo tres pacientes con FQ, todos con la variante F508del. A partir de este contexto, se inició el camino para mejorar y validar el método,

compararlo con los ya establecidos organoides intestinales e investigarlos en una población más amplia y heterogénea de pacientes FQ.

Discusión según los objetivos y resultados

De acuerdo con los objetivos propuestos para esta tesis, a continuación, se va a elaborar la discusión punto por punto de las cuatro secciones de los Resultados.

El objetivo 1/ fue modificar el protocolo de crecimiento de las nasoesferas y el posterior ensayo funcional de CFTR. Para ello, exploramos la reproducibilidad del ensayo, estudiando siete individuos WT-CFTR y siete pacientes FQ con variedad fenotípica y genotípica (**Tabla 4**). Se implementaron una serie de modificaciones y cambios del protocolo publicado originalmente [137] con el objetivo de mejorar la precisión del protocolo y el posterior análisis. Se resuspendieron las nasoesferas en Matrigel con el objetivo de aumentar el número de observaciones (n) e incrementar el valor estadístico. En segundo lugar, se realizó un análisis más amplio de las imágenes de las nasoesferas obtenidas por microscopía, CRA e IFRA, parte externa e interna respectivamente, que ayudó a categorizar los resultados y las observaciones.

Se exploraron diversos ajustes técnicos utilizando nasoesferas de individuos WT-CFTR. Al incorporar las nasoesferas en Matrigel, se evita el inconveniente de que las células en suspensión se muevan y desaparezcan del foco durante los experimentos de imagen *in vivo*. Este ajuste técnico, permitió el estudio *in vitro* de cientos de nasoesferas derivadas de células primarias y formadas espontáneamente en cultivo celular. Al inmovilizar las nasoesferas para el ensayo *in vivo*, aumentamos hasta 20 veces el número de células estudiadas previamente en el ensayo de microscopía [137]. Esto permitió evaluar las respuestas a FSK de una manera más categórica. A continuación, se caracterizaron las nasoesferas WT-CFTR como respondedoras o no respondedoras, según la reducción fraccional (o *fractional reduction*, FR) que presentan después de la incubación con forskolina, amiloride e IBMX (condición “FSK”). Se determinó que la media de nasoesferas respondedoras a FSK es del 80% cuando se estudiaron las CRA y del casi 90% después de analizar las IFRA. En nuestra experiencia, observamos que la proporción “no respondedora” tiende a ser mayor en las nasoesferas C2 (~ 30%) en comparación con las nasoesferas C1 (~ 20%). Sin embargo, la respuesta a FSK no presentó diferencias significativas al comparar ambos grupos (**Figura 14a**). Después de comparar ambos métodos y observando que no hay diferencias en el estudio de la función CFTR, se decidió continuar con el protocolo C1. En nuestra experiencia, es un protocolo más útil durante el mantenimiento de las nasoesferas en cultivo.

Otra observación realizada fue la variabilidad de tamaños de nasoesferas. Nuestro estudio determinó que el tamaño no influía en la respuesta a FSK (**Figura 16b**). El estudio anterior [137] planteó la hipótesis de que las nasoesferas de tamaños similares, podrían presentar respuestas a

FSK similares. Según nuestros resultados, ambos valores no se correlacionan y todas las esferas serían potencialmente aceptables para el análisis. Las respuestas heterogéneas observadas en una proporción de nuestras nasoesferas podrían explicarse por diferentes niveles de expresión de CFTR en nasoesferas del mismo individuo.

Se exploraron diversos análisis alternativos al descrito anteriormente de las áreas externas o CRA y se analizaron las áreas internas o IFRA como posible biomarcador dinámico de la función CFTR. Se determinó que las IFRA eran más sensibles que las CRA para discriminar entre las respuestas WT-CFTR y FQ-CFTR (**Figura 17c**). En este modelo presentado, las nasoesferas crecen con la parte apical orientada al exterior, reduciendo sus áreas (CRA e IFRA) al activar el transporte mediante CFTR. Un artículo [136] donde se utilizaba el modelo de las nasoesferas con orientación inversa (membrana apical hacia el interior), también realizaba el análisis de las áreas internas para incrementar la sensibilidad del ensayo funcional. Previamente, Dekkers *et al* habían establecido en organoides intestinales el análisis de las partes internas para discernir entre los fenotipos WT y CFTR en ensayos funcionales análogos de CFTR [124]. Si bien se habían descrito diferencias en las estructuras de nasoesferas y de organoides intestinales entre los grupos WT y FQ [124, 136], en nuestro estudio, no observamos disparidad estructural ni diferencias significativas entre las áreas basales WT-CFTR y FQ-CFTR (**Figura 17b**).

Cuando estudiamos la reducción de las áreas de las nasoesferas de siete pacientes FQ, algunas presentaban respuesta a FSK inducida por fármacos moduladores. Dos sujetos no emparentados pero que compartían genotipo (FQ1 y FQ2, F508del/2183AA>G), mostraron diferentes respuestas después de la estimulación con FSK. Curiosamente, el paciente FQ1, que casi no mostró reducción de sus nasoesferas, presentaba una enfermedad pulmonar más grave que el paciente FQ2 (**Tabla 4**). De hecho, el paciente FQ1 mostró los niveles más bajos de activación de CFTR después de FSK de todo el grupo FQ estudiado (**Figura 18a**). Estas diferencias en la funcionalidad de CFTR entre pacientes con el mismo genotipo se han observado en diversos estudios de CFTR *in vitro* después del ensayo FIS utilizando organoides intestinales [21]. Estas diferencias deben ser consideradas en el contexto de modificadores genéticos o ambientales [30, 31], que muestran la individualidad de cada paciente a la hora de establecer los tratamientos y su eficacia.

En la parte final del bloque 1 de **Resultados**, se trataron nasoesferas de siete pacientes con FQ con la combinación VX-770+VX-809, aprobada por la FDA y la EMA, para pacientes con genotipos CFTR específicos. Además, estudiamos a varios pacientes que posiblemente respondían *in vitro* a la combinación VX-770+VX-661, también aprobada por la FDA y la EMA, para genotipos que presenten al menos una variante F508del. Un resultado interesante fue el del paciente FQ3 (F508del/3849+10KbC>T), que mostró una respuesta significativa a VX-770+VX-

661 (FR-CRA * $p=0.0104$, FR-IFRA ** $p=0.0047$) pero no a VX-770+VX-809 (CRA $p=0.2978$, IFRA $p=0.5848$) (**Figura 18b,c, Tabla 5**). Este resultado es consistente con la indicación de genotipo aprobada actualmente de VX-770+VX-661 (SYMKEVI®/SYMDEKO®) para pacientes portadores de variantes como el paciente FQ3.

Para un análisis sistemático de la respuesta a los moduladores CFTR, se utilizaron tres variables (FR, AUC y pendientes o *slopes*) y dos áreas diferentes (CRA e IFRA). En comparación con las pendientes, el análisis AUC ofrece la ventaja de no asumir respuestas lineales. Los valores AUC se utilizan habitualmente en ensayos *in vitro* de FQ con organoides intestinales. El cálculo de las AUC puede ser útil cuando se necesite comparar los resultados de una muestra determinada que se puede obtener con ambos métodos (organoides y nasoesferas). En algunas muestras de FQ, encontramos diferencias entre los resultados de CRA e IFRA. Por ejemplo, FQ6 F508del/F508del, un genotipo categorizado como respondedor a VX-770+VX-809 (ORKAMBI®), solo mostró una respuesta significativa *in vitro* a esta combinación de moduladores en las trayectorias IFRA (**Figura 18b,c**). Así pues, el estudio de las áreas internas o IFRA, que muestra un rango más amplio de reducción, puede resultar en una mejor categorización en algunos casos.

El paciente FQ3, con genotipo F508del/3849+10KbC>T, no mostró diferencias significativas entre la administración de VX-770+VX-809 (FR-CRA $p=0.2978$, FR-IFRA $p=0.5848$) después de 60 min de seguimiento. Si se observó una respuesta significativa en presencia de la combinación VX-770+VX-661 en comparación con FSK (FR-CRA * $p=0.0104$, FR-IFRA ** $p=0.0047$) (**Figura 18b,c**).

En conclusión, se realizaron una serie de modificaciones y mejoras para medir la funcionalidad CFTR en nasoesferas. Este enfoque simple, asequible y no invasivo proporciona una evaluación de la función de CFTR en una semana. Los resultados indican que este método modificado se puede utilizar como una herramienta inicial o complementaria para definir la función epitelial de las vías respiratorias CFTR y predecir qué pacientes podrán responder a la terapia moduladora.

2/ Para **estudiar la expresión de CFTR en las nasoesferas**, se realizaron estudios de inmunofluorescencia en nasoesferas WT-CFTR y FQ-CFTR. Para ello, se utilizó el anticuerpo *anti-human* CFTR, utilizado en otros artículos para IF en células nasales FQ y WT [155]. Este anticuerpo, presenta la ventaja de estar comercialmente disponible.

Por primera vez, se ha descrito la expresión de CFTR en las nasoesferas. Se observó que la expresión media de CFTR apical de las células que conforman una nasoesfera es ~ 60% de las mismas. También se determina que la expresión de WT-CFTR en las nasoesferas de un mismo

individuo, es desigual; mientras que hay esferas que presentaban ~ 90% de expresión, otras sólo llegan al ~ 30% (**Figura 19b**). Ambos resultados van en consonancia con estudios previos realizados en células de epitelio respiratorio. En ellos, se describió que la expresión de CFTR apical presenta un rango del 45 – 70% de las células totales del cultivo [155-157]. La expresión desigual de CFTR en nasoesferas podría explicar que haya nasoesferas que responden más que otras a la incubación de FSK *in vitro* (bloque 1 de **Resultados**). El motivo de la variabilidad de expresión de CFTR a lo largo de las distintas nasoesferas de un paciente, se podría explicar porque las nasoesferas son elementos artefactuales *in vitro*, que no mimetizan ninguna estructura *in vivo*. Por otro lado, sólo las células columnares expresan CFTR en el epitelio nasal (**Figura 3**, en **Introducción**), por lo que es esperable que sólo un porcentaje de las células que conforman las nasoesferas, sean susceptibles de mostrar CFTR.

En esta tesis también se describe por primera vez la expresión apical de CFTR en nasoesferas FQ-CFTR; determinamos que la expresión es significativamente menor que en WT-CFTR, en consonancia a lo reportado en células nasales primarias [155, 158]. Las nasoesferas F508del/F508del, presentaban una media de expresión de ~ 20 % (**Figura 19b,c**), parecido a los datos reportados en epitelio nasal cultivado en monocapa [155, 156]. F508del es una variante de función mínima, que provoca defectos del plegamiento y transporte de la proteína CFTR. Sin embargo, algunas proteínas consiguen transportarse e insertarse en la membrana plasmática. Es por ello, que solo se detecta expresión CFTR en la membrana apical [156], aunque sea de manera reducida respecto a lo observado en nasoesferas WT-CFTR. Dentro del grupo FQ-CFTR, también se observó que las nasoesferas de pacientes con la variante de función residual L206W, muestran más expresión en comparación a variantes de función mínima (**Figura 19c**). Por último, se demostró la expresión casi nula de CFTR en las nasoesferas con dos variantes STOP de clase I. A pesar de que no se esperaba marcaje de CFTR en la zona apical, en alguna nasoesfera se observa una célula con expresión de CFTR apical.

Los resultados del estudio de la expresión de CFTR en nasoesferas se relacionan con los genotipos CFTR; se observa menor expresión de proteína CFTR en las nasoesferas de los pacientes con genotipos más graves en comparación con genotipos de función residual y WT-CFTR.

3/ Una vez mejorado y validado el protocolo del ensayo funcional de CFTR en nasoesferas, se quiso comprobar si los datos obtenidos de este estudio podían **compararse con el ensayo funcional FIS establecido en organoides intestinales**. El ensayo FIS se estableció por primera vez en el año 2013[123] y desde entonces, se ha descrito en muchos artículos para determinar la funcionalidad de CFTR con y sin fármacos moduladores [100, 124, 146, 159]. Con algunas semejanzas al ensayo funcional de nasoesferas, la incubación de FSK aumenta los niveles de

AMPC en el cultivo y activa el transporte de Cl^- mediado por WT-CFTR. La disposición de la membrana apical en organoides, hacia el interior, hace que el movimiento del Cl^- se realice hacia el interior de los organoides. Esto provoca el aumento de tamaño de los mismos (**Figura 11, Material y Métodos**).

A pesar de estudios que correlacionan las respuestas respiratorias (valores $\text{FEV}_1\%$) con los resultados obtenidos del ensayo FIS en organoides intestinales [126, 148, 160], estos podrían no mimetizar de manera exacta la funcionalidad CFTR o la respuesta a moduladores del sistema respiratorio. Sin embargo, debido a su amplia validación, el ensayo FIS en organoides intestinales se ha erigido en estos últimos años como prueba *in vitro* estrella para el estudio de CFTR.

Por primera vez, en esta tesis se realizan ambos ensayos y se comparan las respuestas funcionales de CFTR en nasoesferas y en organoides intestinales de los mismos pacientes FQ. Para ello, se seleccionaron tres pacientes con genotipos distintos; un paciente con el genotipo común F508del/F508del, otro paciente con un genotipo de función residual, F508del/L206W, y un tercer paciente con dos mutaciones STOP de clase I, G542X/K668X. Primero, se analizó si el estudio de nasoesferas era capaz de discernir entre las distintas funcionalidades de CFTR, función mínima y función residual. En organoides intestinales, ya se había descrito la eficacia de este ensayo para distinguir entre pacientes con y sin funcionalidad de CFTR [123, 124]. Nuestros resultados, demostraron que el ensayo funcional en nasoesferas, mediante el análisis de sus áreas internas, IFRA, podía discernir entre función residual y función mínima en los pacientes estudiados. Tal y como se postulaba en el primer bloque de resultados, estos datos confirmarían que el análisis IFRA puede ser más sensible para determinados estudios. Después, se procedió a estudiar la respuesta de nasoesferas y organoides intestinales después de la incubación con moduladores. Las combinaciones de moduladores se escogieron según los genotipos presentados por los pacientes. Para los genotipos con la variante F508del, se escogieron los dos fármacos aprobados por la FDA y EMA para genotipos con presencia de F508del, VX-770+VX-661 (SYMKEVI®/SYMDEKO®) y VX-770+VX-661+VX-445 (KAFTRIO®/TRIKAFTA®). También se probó el fármaco aprobado para pacientes F508del/F508del, ORKAMBI® (VX-770+VX-809).

Las nasoesferas y organoides de los pacientes FQ8 F508del/F508del y FQ11 F508del/L206W respondieron a los tres tratamientos probados. Después, se compararon las respuestas observadas entre la triple terapia y las otras dos, VX-770+VX-809 y VX-770+VX-661, en nasoesferas y organoides. En nuestros resultados, la triple terapia no aportó más eficacia *in vitro* respecto a las otras dos terapias (**Figura 22 y 23**). En cambio, el ensayo clínico en fase III de la triple terapia KAFTRIO®/TRIKAFTA® demostró mayor eficacia de ésta respecto a SYMKEVI®/SYMDEKO® [82]. A pesar de que hay muy pocos estudios dónde se haya analizado la triple

combinación en células obtenidas de pacientes [161-163], en dos artículos, se describen pacientes heterocigotos para F508del que no mostraron beneficios adicionales con TRI respecto a VX-770+VX-661, después del ensayo FIS en organoides intestinales y en nasoesferas “apical-in” [82, 162, 163]. Esto podría implicar que (i) los ensayos funcionales *in vitro* pueden tener ciertas limitaciones a la hora de establecer beneficios cuantitativos entre las distintas terapias *in vivo* o (ii) la variabilidad de respuestas entre individuos.

Respecto las nasoesferas y organoides intestinales de FQ11 F508del/L206W, cabe destacar que se observa la funcionalidad de CFTR *in vitro* después del tratamiento con VX-770+VX-809, fármaco (ORKAMBI®) no aprobado para este genotipo [164]. Nuestros resultados en nasoesferas y en organoides de FQ11 F508del/L206W, incluso muestran que la respuesta a VX-770+VX-809 fue parecida a la de VX-770+VX-661, terapia aprobada para F508del/L206W. Todos estos resultados, indican que el genotipo F508del/L206W podría ser respondedor a ORKAMBI®. Este hallazgo no había sido descrito previamente. Solo un estudio electrofisiológico reportó la eficacia de VX-770+VX-809 en F508del/L206W en el modelo celular bronquial CFBE441o- [165].

El tercer paciente del estudio de la correlación, FQ16 que presenta dos variantes de clase I, no presentó respuesta *in vitro* a las combinaciones terapéuticas PTC-124, VX-770, PTC-124+VX-770 o VX-770+VX-661+VX-445. A pesar de que PTC-124/ATALUREN® es un fármaco dirigido a tratar mutaciones STOP, no fue aprobado por la FDA ni la EMA después de los resultados obtenidos en ensayos clínicos de fase III [94]. Sin embargo, algunos pacientes de estos ensayos, habían presentado beneficios clínicos después de la administración de ATALUREN®. Por ello, se decidió probar su acción en las células *in vitro* del paciente FQ16. El resto de la literatura previa no era tampoco concluyente. Un artículo describió la baja capacidad de restablecer la función CFTR por el agente PTC-124 en organoides intestinales que presentaban al menos una variante de clase I (F508del/clase I y clase I/*frameshit*) [146]. En cambio, dos ensayos clínicos en fase II con pacientes heterocigotos y homocigotos por variantes de clase I, comunicaron aumentos en el transporte de Cl⁻ dependiente de CFTR y de la expresión de proteína CFTR en el epitelio nasal después del tratamiento con ATALUREN® [93, 166], siendo la variante G542X la más respondedora de todas las estudiadas [93]. Cabe destacar que no hay ningún artículo que haya estudiado la eficacia del agente PTC-124 en el genotipo como el que presentaba nuestro paciente FQ16, G542X/K668X.

También se probó la combinación PTC-124+VX-770-VX-661-VX-445 para estudiar si los fármacos “VX” podrían potenciar la acción del PTC-124. Las nasoesferas del paciente FQ16 respondieron significativamente a la combinación PTC-124+VX-770+VX-661+VX-445 en comparación a FSK. Este resultado, se pudo observar sólo después del análisis de las IFRA de las nasoesferas (t=60 y t=120 min) (**Figura 24c,d**). Sin embargo, este efecto no se observó en los

organoides intestinales del mismo paciente (**Figura 25a,b**), tampoco cuando el agente PTC-124 se incubó 48 horas para maximizar su efecto *in vitro* (**Figura 25c,d**). Esto podría deberse a diferencias entre el epitelio respiratorio y epitelio intestinal. Sin embargo, el experimento con PTC+TRI en nasoesferas debería repetirse para confirmar este resultado.

Respecto a las horas de estudio mediante microscopia funcional, en el bloque 1 de **Resultados**, las nasoesferas WT-CFTR y FQ-CFTR se estudiaron durante una hora y ya se mostraron resultados concordes a lo esperado *in vivo*; observamos respuesta significativa del paciente FQ6 F508del/F508del a VX-770+VX-809 y del paciente FQ3 F508del/3849+10KbC>T a VX-770+VX-661 (**Figura 18a,b, Tabla 5**). En la correlación entre nasoesferas y organoides (bloque 3 de **Resultados**), se decidió realizar un seguimiento hasta los 120 minutos. El estudio funcional FIS en organoides, se suele realizar durante 60 minutos [123, 160, 167]. Sin embargo, cada vez más, se están llevando a cabo estudios funcionales de CFTR de más larga duración en modelos celulares tridimensionales. Por ejemplo, un grupo de investigación estadounidense publicó que el seguimiento de 8 horas de nasoesferas “*apical-in*”, ayudaba a discernir mejor entre respuestas basales de CFTR comparado con 1 hora de estudio [136]. En otro artículo, se utilizan seguimientos de 2 horas de los organoides intestinales para determinar la eficacia de compuestos farmacológicos muy experimentales, como el ELX-02 [100]. En nuestro caso, realizamos todos los estudios estadísticos del bloque 3 de **Resultados** a 60 y a 120 minutos. Determinamos que los ensayos funcionales en nasoesferas y en organoides intestinales podrían categorizar mejor las respuestas farmacológicas de CFTR después de las 2 horas de estudio. Por nuestra experiencia en ensayos funcionales en nasoesferas y organoides intestinales, seguimientos de microscopía más largos a las 2 horas, podrían revertir los efectos de los tratamientos; algunas estructuras vuelven a ensancharse (nasoesferas) o a empequeñecer (organoides) al cabo de unas horas seguidas de estudio *in vivo* con fármacos (datos observacionales no reportados en el apartado de resultados). Esto podría deberse al agotamiento del sustrato forskolina. En resumen, el seguimiento hasta las 2 horas de estudio pueden mejorar la sensibilidad en el ensayo FIS en organoides intestinales, igual que las IFRA en nasoesferas.

Comparando entonces los resultados de los ensayos funcionales con forskolina en nasoesferas y organoides intestinales derivados de pacientes con FQ se demuestra por primera vez la correlación entre ambos ensayos en un mismo paciente (**Figura 26**). Después de enfrentar cuatro pares de datos (FR-CRA vs CRA, FR-IFRA vs CRA, AUC-CRA vs AUC-CRA y AUC-IFRA vs AUC-CRA), todas muestran una correlación inversa significativa. Esto es, cuando un valor disminuye (reducción de las áreas en nasoesferas), el otro valor aumenta (aumento de las áreas de organoides). El emparejamiento de las AUC-CRA en nasoesferas con AUC-CRA organoides, es el que presentó mayor correlación ($r=-0.7261$) (**Figura 26c**). A pesar de que anteriormente se habían mostrado respuestas similares entre los organoides intestinales y estudios

electrofisiológicos en epitelio nasal [159], no hay ningún estudio publicado hasta la fecha que compare el ensayo FIS en las nasoesferas (membrana apical orientada hacia fuera o dentro) con el ensayo FIS en organoides. Después de determinar que ambos ensayos se correlacionan, a pesar del resultado discordante obtenido con el tratamiento PTC-124+VX-770+VX-661+VX-445 en el paciente FQ16, se pueden analizar las ventajas e inconvenientes de una técnica y otra (**Tabla 6**). Esto, genera una oportunidad a los laboratorios de investigación de FQ a decidir qué metodología puede ser más beneficiosa para estudios de funcionalidad CFTR personalizados o la posibilidad de complementación entre uno y otro, especialmente cuando los resultados son dudosos.

Características		Nasoesferas	Organoides
Obtención muestra	Invasiva	No	Sí
	Preparación previa	No	Si
	<u>Posibles</u> efectos secundarios	Picor, estornudos, lagrimeo	Pequeño sangrado rectal
Cultivo	Dificultad en establecer el cultivo	+	++
	Tiempo y dificultad de mantenimiento (pases)	+	++
	Especialización técnica requerida	+	++
Capacidad de pluripotencialidad		Si, potencialmente	Si
Número de estructuras obtenidas		Limitada	Ilimitada (18 meses de cultivo)
Congelación		No	Si
Coste		€	€€
Mimetizan estructura <i>in vivo</i>		No	Si
Ensayo funcional		1 semana	1 mes

Tabla 6. Tabla resumen de las ventajas e inconvenientes de nasoesferas y organoides intestinales. +: reducido/a, ++: elevado/a. € : coste reducido, €€ : coste elevado.

De la **Tabla 6**, cabe destacar el potencial pluripotencial del cultivo de nasoesferas. Una vez las nasoesferas se forman completamente (3 – 5 días), muy pocas veces se observa un incremento del número de esferas en cultivo. Sin embargo, encontramos células basales con capacidades pluripotenciales que, bajo nuestra experiencia, se adhieren a la placa y se expanden cuando el cultivo se mantiene varias semanas. Sin embargo, la limitación en la cantidad de esferas que se pueden obtener en un solo cultivo, comporta restricciones en estudio funcional; las condiciones farmacológicas que se puedan probar en el ensayo dependerán de la cantidad de nasoesferas que se formen. En cambio, los organoides intestinales pueden mantenerse en cultivo hasta un año y medio, según está descrito [121], aunque no tenemos experiencia manteniendo el cultivo tanto tiempo. Poder obtener muchos organoides intestinales, presenta la ventaja de poder probar todas

las condiciones farmacológicas que se desee. Por ello, esta técnica puede utilizarse en la investigación de medicamentos o *drug screening* [127].

Cabe comentar que las nasoesferas (orientadas apicalmente hacia el interior) también se pueden cultivar a partir de una expansión previa de las células nasales en co-cultivo con fibroblastos irradiados [136, 168]. Estas, pueden activar el canal CFTR mediante forskolina, produciendo el fenómeno FIS parecido a lo observado en organoides intestinales. La única ventaja observada respecto a nuestro protocolo de nasoesferas es la obtención de más estructuras esféricas gracias a la expansión previa realizada en co-cultivo. Sin embargo, las células nasales en co-cultivo se pueden expandir de manera limitada (2 – 3 pases máximo) antes de reconvertirlas en esferas. Esta técnica, presenta algunas desventajas: tiempo de cultivo elevado comparado con nuestro protocolo (\approx 1 mes), porcentaje de eficacia bajo y poca eficiencia en la congelación.

4/ Para el estudio de pacientes FQ con distintos genotipos, se decidió optar por la técnica de las nasoesferas para investigar la funcionalidad y respuesta a moduladores debido al rápido y fácil acceso a la muestra, la facilidad de la técnica, y la rapidez en la obtención de resultados. En total fueron diez pacientes FQ, 3 homocigotos para F508del, 2 con genotipo F508del/L206W, otros tres pacientes heterocigotos para F508del y dos pacientes con otros genotipos.

Genotipo F508del/F508del

Primero, se confirmó que las nasoesferas de pacientes F508del/F508del (n=3) respondieran a los moduladores VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y VX-770+VX-661+VX-445, discutido en el punto **3/**. Estos resultados, concuerdan con las aprobaciones de estas terapias (ORKAMBI®, SYMKEVI®/SYMDEKO® y KAFTRIO®/TRIKAFTA®) por la FDA y la EMA para este genotipo [74, 75, 77, 78, 84, 85] (ver **Tabla 2**, en **Introducción**).

Genotipo F508del/L206W

En consonancia a lo discutido en el punto **3/**, el genotipo F508del/L206W (n=2, FQ10 y FQ11) respondían a las tres combinaciones probadas (VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y VX-770+VX-661+VX-445), indicando que el hallazgo presentado previamente en las nasoesferas y organoides de FQ11, se debería a que este genotipo podría ser respondedor a ORKAMBI®, a pesar de no estar aprobado su uso clínico.

No hemos observado que la triple terapia presente mayores niveles de funcionalidad CFTR en los genotipos F508del/F508del (n=3) (**Figura 27b**) y F508del/L206W (n=2) (**Figura 28b**) respecto a las otras dos, VX-770 + VX-809/VX-661. Estos resultados van en consonancia a los descritos en los organoides intestinales de los pacientes FQ8 F508del/F508del y FQ11 F508del/L206W

(**Figura 22 y 23**). Sólo se determinaron diferencias significativas entre la triple combinación y VX-770+VX-809 en las nasoesferas F508del/F508del (n=3) (ANOVA, AUC).

Heterocigotos F508del

Se estudiaron otros tres pacientes heterocigotos para F508del: FQ13 F508del/1667delTA, FQ14 F508del/variante s.d. y FQ15 F508del/G542X.

El paciente FQ13 respondió a los tratamientos VX-770+VX-661 y VX-770+VX-661+VX-445, aprobados (SYMEKVI®/SYMDEKO y KAFTRIO®/TRIKAFTA®) para este genotipo por la FDA y la EMA (resumen en **Tabla 2**, en **Introducción**). No presentó respuesta después de la incubación con VX-770+VX-809 (OKAMBI®), tratamiento al que no pueden acceder pacientes heterocigotos para F508del (**Figura 28c,d**). Estos resultados pueden confirmar la eficacia del ensayo funcional de nasoesferas para predecir respuestas *in vivo* a fármacos moduladores.

El paciente FQ14, clínicamente FQ pero con una variante no encontrada en el otro alelo después de estudios del gen completo, no presentaba inicialmente funcionalidad CFTR con FSK. Esta se recuperó significativamente después de la incubación con las tres combinaciones de moduladores probados (VX-770+VX-809, VX-770+VX-661 y VX-770+VX-661+VX-445) (**Figura 28e,f**). Aunque desconozcamos la segunda variante presentada por el paciente FQ8, la presencia de la variante F508del hace que sea susceptible a la corrección de la función CFTR *in vivo* mediante moduladores, tal y como se ha descrito en artículos recientes [169, 170].

Para el paciente F508del/G542X (FQ15), se probaron distintas combinaciones de moduladores: PTC, VX-770, PTC-124+VX-770+VX-661+VX-445 (“PTC+TRI”). Las nasoesferas respondieron de manera significativa sólo al tratamiento con PTC combinado con los tres VX (**Figura 28g,h**). La ineffectividad del rescate de función CFTR por parte de PTC-124, concuerda con un artículo publicado en organoides intestinales [146]. Debido a la presencia de la variante F508del en combinación a una variante de función mínima clase I (G542X), el efecto observado después de la incubación PTC+TRI se debería a la efectividad de TRI en el rescate de la proteína CFTR. Sin embargo, no hay estudios publicados sobre la efectividad de la triple combinación de moduladores en células F508del/G542X.

Otros genotipos

Por último, estudiamos dos pacientes que presentan variantes distintas a F508del. Primero, probamos distintas combinaciones farmacológicas para el paciente FQ17 W1282X/W1282X, genotipo sin tratamiento clínico aprobado: VX-770, PTC-124 solo y combinado con VX-770+VX-661+VX-445 y con VX-770. Gracias al análisis IFRA, observamos respuestas significativas de la función de CFTR *in vitro* después de la incubación con PTC-124, PTC-124+VX-770 y PTC-124+TRI. Algunos grupos de investigación ya estudiaron la combinación de moduladores “VX” con PTC-124 para potenciar el rescate funcional de CFTR en la variante

W1282X [171]. En el mismo artículo, hipotetizan que una triple terapia con moduladores podría potenciar el efecto del PTC-124 en esta variante. En otro artículo, la combinación de ATALUREN®+VX-770 no produjo un incremento notable a nivel clínico en un paciente W1282X/W1282X en comparación a la administración ATALUREN® en monoterapia [172]. En nuestros resultados, no observamos un incremento de la actividad CFTR *in vitro* después de combinar VX-770 y VX-770+VX-661+VX-445 con PTC-124 respecto a PTC-124 en monoterapia (**Figura 29a,b**), indicando que la restauración de la funcionalidad de CFTR provendría del agente PTC-124. Un ensayo clínico fase II, mostró que pacientes con variantes STOP, entre ellas, W1282X, sin administración inhalada de tobramycin (compuesto que interfiere con los efectos *in vitro* e *in vivo* de PTC-124 [93, 94], presentaron beneficios clínicos notables respecto el grupo placebo. A pesar de ser una variante de clase I, algunos estudios evidencian la capacidad de esta variante de expresar proteína CFTR truncada en la membrana plasmática, lo que la haría más susceptible a ser restaurada mediante agentes *read-through* [171]. Con todos estos resultados en conjunto, se remarca que la eficacia de agentes *read-through* en monoterapia y en combinación con otros moduladores para la variante W1282X, debería continuar estudiándose. Sin embargo, algunos de los efectos observados *in vitro* e *in vivo* resultan prometedores como tratamiento para esta variante, la más prevalente de la clase I en todo el mundo (2.4%) [40].

Finalmente, no hemos observado restauración funcional del genotipo L227R/L227R, variante no clasificada y presentada por dos pacientes relacionados (FQ4, FQ18), mediante ninguna de las terapias probadas (VX-770+VX-809 y VX-770+VX-661) (**Figura 18b,c, Figura 29c,d**).

En conclusión, en esta tesis doctoral, se ha expuesto la validación de la técnica de las nasoesferas como método biomarcador de la funcionalidad de CFTR en epitelio respiratorio. Este ensayo simple, asequible y no invasivo, proporciona una lectura de la función de CFTR en tan solo una semana. En un futuro, se deberán realizar estudios a más larga escala; con más pacientes FQ-CFTR y otros genotipos. Este ensayo, correlacionado con el estudio FIS en organoides intestinales, puede utilizarse como una herramienta inicial o complementaria, para determinar la restauración de CFTR *in vitro* mediante tratamientos, de manera personalizada para Fibrosis Quística.

Perspectivas futuras en FQ

Después de validar el ensayo funcional de CFTR en el cultivo de nasoesferas, existen al menos tres contextos, actuales y futuros, en los que es y será relevante el estudio de las respuestas farmacológicas de CFTR previo a la aplicación de tratamiento clínico.

- Los tratamientos actuales, se aplican según la clase funcional (I-VII) de las alteraciones del *CFTR*. El primer contexto se aplica a los pacientes FQ-CFTR que presentan una variante

CFTR desconocida o inclasificable y que, por este motivo, no tienen acceso a las opciones terapéuticas aprobadas actualmente. Estudiar la funcionalidad basal de CFTR (función residual o mínima), permitiría predecir a qué clase funcional podría(n) pertenecer(n) la(s) variante(s) no encontrada(s) o sin clasificar. Así mismo, podrían beneficiarse de estudios *in vitro* que predigan las respuestas farmacológicas a moduladores ya aprobados.

- Por otro lado, la cantidad de investigaciones actuales para descubrir nuevas moléculas y terapias avanzadas, hace prever en unos años un contexto donde se implementarán nuevos tratamientos. Estos tratamientos irán dirigidos a: (i) pacientes que ya disponen de opción terapéutica, pero presentan mínimos beneficios clínicos y (ii) pacientes sin opción terapéutica disponible, como los de clase I, donde no hay síntesis de proteína CFTR. Se ha comunicado que algunas variantes de clase I serían más susceptibles de responder a fármacos que otras de la misma clase [173, 174]. Esto dependería, en parte, de la cantidad de transcritos de ARNm-*CFTR* producidos; a mayor cantidad, más probable de responder a agentes *read-through* [175]. Para ambos contextos, (i) y (ii), sería de utilidad disponer de estudios *in vitro* que investiguen respuestas farmacológicas antes de aplicar los tratamientos clínicos. Así, se podría decidir el tratamiento clínico para cada paciente de una manera más personalizada.
- Finalmente, desde el contexto de financiación sanitaria, se prevé que el coste de los nuevos tratamientos sea tan elevado como los actuales fármacos “VX”, debido a la complejidad de las investigaciones y las políticas de mercado. Por ello, sería relevante estudiar las respuestas farmacológicas *in vitro* para objetivar de manera más eficiente la indicación del inicio de un tratamiento.

En resumen, para llevar a cabo las situaciones anteriormente explicadas, es importante contar con un grupo de investigación multidisciplinar experto, como el que se ha desarrollado en nuestro Centro, que presente una conexión estrecha entre la Unidad de fibrosis quística clínica y el laboratorio de investigación para estudiar los distintos pacientes con FQ. De esta forma, se aseguraría la obtención de biomarcadores *in vitro* con el fin de estudiar de manera individualizada la funcionalidad basal de la proteína CFTR y evaluar qué tratamientos podrían restablecer la función de la misma.

VII – Conclusiones

Conclusiones respecto al Objetivo 1.

- Se han implementado cambios para mejorar el ensayo funcional de CFTR en nasoesferas derivadas de células nasales de individuos WT-CFTR y FQ-CFTR. Estas mejoras, permiten aumentar el tamaño de las muestras (*n*) y facilitar el estudio de imagen *in vivo* mediante microscopia. Se ha validado este ensayo funcional para estudiar el restablecimiento funcional de la proteína CFTR en células primarias del sistema respiratorio después de la incubación con fármacos moduladores.
- Las respuestas obtenidas de nasoesferas WT-CFTR después de la incubación con FSK, nos permiten clasificarlas en respondedoras o no respondedoras. Las nasoesferas WT-CFTR respondedoras representan el ~80% del total.
- El nuevo análisis de las áreas internas, IFRA, de las nasoesferas para analizar la respuesta funcional de la proteína CFTR, es en general más sensible para detectar respuestas.

Conclusiones respecto al Objetivo 2.

- Se ha estudiado la expresión de CFTR en nasoesferas WT-CFTR y FQ-CFTR y se observa una distribución heterogénea en las nasoesferas formadas a partir de células epiteliales nasales del mismo individuo.
- Se ha demostrado que la expresión de CFTR entre nasoesferas WT-CFTR y FQ-CFTR es significativamente distinta, en consonancia con las diferencias de funcionalidad de CFTR entre individuos WT-CFTR y FQ-CFTR. Asimismo, se observa una expresión reducida en los pacientes con genotipos asociados a mayor gravedad clínica respecto a genotipos asociados con función residual.

Conclusiones respecto al Objetivo 3.

- Por primera vez, se ha comparado y demostrado la correlación entre las respuestas obtenidas en los ensayos funcionales de CFTR en nasoesferas y en el ensayo FIS en organoides intestinales con células primarias derivadas de tres pacientes FQ-CFTR con distintos genotipos.
- El ensayo de correlación, demuestra que las nasoesferas pueden utilizarse para estudiar de manera personalizada la funcionalidad CFTR basal y la restauración de CFTR después de la incubación con fármacos moduladores.

Conclusiones respecto al Objetivo 4.

- Se ha ampliado el estudio funcional de CFTR en nasoesferas, estudiando diez pacientes FQ-CFTR con genotipos diversos y se han determinado las respuestas a distintos fármacos moduladores.

- En conjunto, los resultados obtenidos indican que las nasoesferas pueden utilizarse como una herramienta inicial o complementaria, para determinar la restauración y funcionalidad de CFTR *in vitro* mediante tratamientos de manera personalizada para pacientes con fibrosis quística.

**VIII –Líneas de investigación para la continuación de este
trabajo de tesis**

Disponer de este ensayo funcional en nasoesferas, fácil y rápido, permitiría su uso como herramienta inicial para estudiar de funcionalidad de CFTR en pacientes con posibles tratamientos que reparen la función CFTR o bien como complemento de alguna otra técnica o ensayo que requiera de más dificultad.

Además de la preparación de dos publicaciones que contendrán los resultados de los puntos 3 y 4 de la tesis, en el futuro, sería conveniente abordar las líneas de investigación que quedan abiertas después de este trabajo de investigación:

- Ampliar los estudios de correlación entre nasoesferas y organoides y determinar si ambos ensayos se correlacionan después de estudiar muestras de pacientes con otros genotipos a los estudiados en esta tesis.
- Ampliar el estudio funcional en nasoesferas a más pacientes con otros genotipos y para el uso de terapias actuales y futuras:
 - o Probar nuevas combinaciones con otros moduladores en estudio.
 - o Analizar el efecto de nuevos agentes en desarrollo, como el agente *read-through* ELX-02, en una variedad de genotipos. Este nuevo modulador, parece restablecer la función de CFTR en pacientes con algunas variantes de clase I. Se puede probar en aquellos genotipos que no respondan a PTC-124 *in vitro* y determinar las diferencias de respuesta entre PTC-124 y ELX-02.
 - o Analizar posibles nuevas moléculas, cuando estén disponibles para investigación.

IX – Bibliografía

- [1] J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, *et al.*, "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA," *Science*, vol. 245, pp. 1066-73, Sep 8 1989.
- [2] R. J. Gregory, S. H. Cheng, D. P. Rich, J. Marshall, S. Paul, K. Hehir, *et al.*, "Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator," *Nature*, vol. 347, pp. 382-6, Sep 27 1990.
- [3] P. Linsdell, "Functional architecture of the CFTR chloride channel," *Mol Membr Biol*, vol. 31, pp. 1-16, Feb 2014.
- [4] S. M. Rowe, S. Miller, and E. J. Sorscher, "Cystic fibrosis," *N Engl J Med*, vol. 352, pp. 1992-2001, May 12 2005.
- [5] J. R. Riordan, "CFTR function and prospects for therapy," *Annu Rev Biochem*, vol. 77, pp. 701-26, 2008.
- [6] D. N. Sheppard and M. J. Welsh, "Structure and function of the CFTR chloride channel," *Physiol Rev*, vol. 79, pp. S23-45, Jan 1999.
- [7] D. C. Gadsby and A. C. Nairn, "Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis," *Physiol Rev*, vol. 79, pp. S77-s107, Jan 1999.
- [8] F. Liu, Z. Zhang, L. Csanády, D. C. Gadsby, and J. Chen, "Molecular Structure of the Human CFTR Ion Channel," *Cell*, vol. 169, pp. 85-95.e8, Mar 23 2017.
- [9] Z. Zhang, F. Liu, and J. Chen, "Molecular structure of the ATP-bound, phosphorylated human CFTR," vol. 115, pp. 12757-12762, Dec 11 2018.
- [10] D. Muallem and P. Vergani, "Review. ATP hydrolysis-driven gating in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator," *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 364, pp. 247-55, Jan 27 2009.
- [11] N. Cant, N. Pollock, and R. C. Ford, "CFTR structure and cystic fibrosis," *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 52, pp. 15-25, Jul 2014.
- [12] M. Lopes-Pacheco, "CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis," *Front Pharmacol*, vol. 7, p. 275, 2016.
- [13] J. H. Hong, S. Park, N. Shcheynikov, and S. Muallem, "Mechanism and synergism in epithelial fluid and electrolyte secretion," *Pflugers Arch*, vol. 466, pp. 1487-99, Aug 2014.
- [14] V. Saint-Criq and M. A. Gray, "Role of CFTR in epithelial physiology," *Cell Mol Life Sci*, vol. 74, pp. 93-115, Jan 2017.
- [15] L. Guarner, "[Physiopathology, diagnosis, and treatment of exocrine pancreatic insufficiency in patients with cystic fibrosis]," *Gastroenterol Hepatol*, vol. 28 Suppl 1, pp. 29-32, Feb 2005.
- [16] N. L. Turcios, "Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview," *Respir Care*, vol. 65, pp. 233-251, Feb 2020.
- [17] I. J. Haq, M. A. Gray, J. P. Garnett, C. Ward, and M. Brodlie, "Airway surface liquid homeostasis in cystic fibrosis: pathophysiology and therapeutic targets," *Thorax*, vol. 71, pp. 284-7, Mar 2016.
- [18] R. Butler, T. Hunt, and N. J. Smith, "ENaC inhibitors for the treatment of cystic fibrosis," *Pharm Pat Anal*, vol. 4, pp. 17-27, Jan 2015.
- [19] S. A. Molina, B. Stauffer, H. K. Moriarty, A. H. Kim, N. A. McCarty, and M. Koval, "Junctional abnormalities in human airway epithelial cells expressing F508del CFTR," vol. 309, pp. L475-87, Sep 1 2015.
- [20] J. M. Anderson and C. M. Van Itallie, "Physiology and function of the tight junction," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 1, p. a002584, Aug 2009.
- [21] D. Günzel and A. S. Yu, "Claudins and the modulation of tight junction permeability," *Physiol Rev*, vol. 93, pp. 525-69, Apr 2013.
- [22] D. Adam, J. Roux-Delrieu, E. Luczka, A. Bonnomet, J. Lesage, J. C. Mérol, *et al.*, "Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation," *J Pathol*, vol. 235, pp. 408-19, Feb 2015.
- [23] N. Aldallal, E. E. McNaughton, L. J. Manzel, A. M. Richards, J. Zabner, T. W. Ferkol, *et al.*, "Inflammatory response in airway epithelial cells isolated from patients with cystic fibrosis," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 166, pp. 1248-56, Nov 1 2002.

- [24] E. F. Tizzano, D. Chitayat, and M. Buchwald, "Cell-specific localization of CFTR mRNA shows developmentally regulated expression in human fetal tissues," *Hum Mol Genet*, vol. 2, pp. 219-24, Mar 1993.
- [25] M. Sathe and R. Houwen, "Meconium ileus in Cystic Fibrosis," *J Cyst Fibros*, vol. 16 Suppl 2, pp. S32-s39, Nov 2017.
- [26] H. Tabori, C. Arnold, A. Jaudszus, H. J. Mentzel, D. M. Renz, S. Reinsch, *et al.*, "Abdominal symptoms in cystic fibrosis and their relation to genotype, history, clinical and laboratory findings," *PLoS One*, vol. 12, p. e0174463, 2017.
- [27] S. A. Molina, H. K. Moriarty, D. T. Infield, B. R. Imhoff, R. J. Vance, A. H. Kim, *et al.*, "Insulin signaling via the PI3-kinase/Akt pathway regulates airway glucose uptake and barrier function in a CFTR-dependent manner," vol. 312, pp. L688-1702, May 1 2017.
- [28] A. A. Stecenko and A. Moran, "Update on cystic fibrosis-related diabetes," *Curr Opin Pulm Med*, vol. 16, pp. 611-5, Nov 2010.
- [29] A. L. Brennan and J. Beynon, "Clinical updates in cystic fibrosis-related diabetes," *Semin Respir Crit Care Med*, vol. 36, pp. 236-50, Apr 2015.
- [30] L. L. Vanscoy, S. M. Blackman, J. M. Collaco, A. Bowers, T. Lai, K. Naughton, *et al.*, "Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 175, pp. 1036-43, May 15 2007.
- [31] G. R. Cutting, "Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application," *Nat Rev Genet*, vol. 16, pp. 45-56, Jan 2015.
- [32] M. R. Knowles and M. Drumm, "The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes," *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, p. a009548, Dec 1 2012.
- [33] J. M. Collaco and G. R. Cutting, "Update on gene modifiers in cystic fibrosis," *Curr Opin Pulm Med*, vol. 14, pp. 559-66, Nov 2008.
- [34] G. R. Cutting, "Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1214, pp. 57-69, Dec 2010.
- [35] M. S. Schechter, B. J. Shelton, P. A. Margolis, and S. C. Fitzsimmons, "The association of socioeconomic status with outcomes in cystic fibrosis patients in the United States," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 163, pp. 1331-7, May 2001.
- [36] H. L. Barr, J. Britton, A. R. Smyth, and A. W. Fogarty, "Association between socioeconomic status, sex, and age at death from cystic fibrosis in England and Wales (1959 to 2008): cross sectional study," *Bmj*, vol. 343, p. d4662, Aug 23 2011.
- [37] D. C. Taylor-Robinson, K. Thielen, T. Pressler, H. V. Olesen, F. Diderichsen, P. J. Diggle, *et al.*, "Low socioeconomic status is associated with worse lung function in the Danish cystic fibrosis population," *Eur Respir J*, vol. 44, pp. 1363-6, Nov 2014.
- [38] B. T. Kopp, L. Nicholson, G. Paul, J. Tobias, C. Ramanathan, and D. Hayes, Jr., "Geographic variations in cystic fibrosis: An analysis of the U.S. CF Foundation Registry," *Pediatr Pulmonol*, vol. 50, pp. 754-62, Aug 2015.
- [39] S. Gartner, P. Mondéjar-López, and Ó. Asensio de la Cruz, "[Follow-up protocol of patients with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening]," *An Pediatr (Engl Ed)*, vol. 90, pp. 251.e1-251.e10, Apr 2019.
- [40] CFTR2. *Clinical and functional translation of CFTR*. Available: <https://cftr2.org/>
- [41] S. Gartner, "Nuevos tratamientos para la Fibrosis Quística," in *Medicina Respiratoria*. vol. 8, ed, 2015, pp. 49-58.
- [42] S. S. e. I. Ministerio de Sanidad. (2013). *Cribado neonatal de la fibrosis quística. Eficacia/efectividad y protocolos de implementación*. Available: <https://www.sergas.es/Docs/Avalia-t/avaliat201201fibrosis-Quistica.pdf>
- [43] K. De Boeck and M. D. Amaral, "Classification of CFTR mutation classes - Authors' reply," *Lancet Respir Med*, vol. 4, p. e39, Aug 2016.
- [44] C. L. Ward, S. Omura, and R. R. Kopito, "Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway," *Cell*, vol. 83, pp. 121-7, Oct 6 1995.
- [45] G. L. Lukacs, A. Mohamed, N. Kartner, X. B. Chang, J. R. Riordan, and S. Grinstein, "Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP," *Embo j*, vol. 13, pp. 6076-86, Dec 15 1994.

- [46] E. L. Turnbull, M. F. Rosser, and D. M. Cyr, "The role of the UPS in cystic fibrosis," *BMC Biochem*, vol. 8 Suppl 1, p. S11, Nov 22 2007.
- [47] D. N. Sheppard, D. P. Rich, L. S. Ostedgaard, R. J. Gregory, A. E. Smith, and M. J. Welsh, "Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties," *Nature*, vol. 362, pp. 160-4, Mar 11 1993.
- [48] M. M. Hämmerle, A. A. Aleksandrov, and J. R. Riordan, "Disease-associated mutations in the extracytoplasmic loops of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator do not impede biosynthetic processing but impair chloride channel stability," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 14848-54, May 4 2001.
- [49] W. E. Highsmith, L. H. Burch, Z. Zhou, J. C. Olsen, T. E. Boat, A. Spock, *et al.*, "A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations," *N Engl J Med*, vol. 331, pp. 974-80, Oct 13 1994.
- [50] J. Zielenski and L. C. Tsui, "Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations," *Annu Rev Genet*, vol. 29, pp. 777-807, 1995.
- [51] M. Haardt, M. Benharouga, D. Lechardeur, N. Kartner, and G. L. Lukacs, "C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation," *J Biol Chem*, vol. 274, pp. 21873-7, Jul 30 1999.
- [52] M. R. Silvis, J. A. Picciano, C. Bertrand, K. Weixel, R. J. Bridges, and N. A. Bradbury, "A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator generates a novel internalization sequence and enhances endocytic rates," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 11554-60, Mar 28 2003.
- [53] M. Lopes-Pacheco, "CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 10, 2020-February-21 2020.
- [54] J. P. Clancy, C. U. Cotton, S. H. Donaldson, G. M. Solomon, D. R. VanDevanter, M. P. Boyle, *et al.*, "CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions," *J Cyst Fibros*, vol. 18, pp. 22-34, Jan 2019.
- [55] K. De Boeck and M. D. Amaral, "Progress in therapies for cystic fibrosis," *Lancet Respir Med*, vol. 4, pp. 662-674, Aug 2016.
- [56] S. Conway, I. M. Balfour-Lynn, K. De Rijcke, P. Drevinek, J. Foweraker, T. Havermans, *et al.*, "European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Framework for the Cystic Fibrosis Centre," *J Cyst Fibros*, vol. 13 Suppl 1, pp. S3-22, May 2014.
- [57] A. Reports. *CFTR modulators initiative drive towards personalized treatments and market growth*. Available: <https://www.asdreports.com/news-2225/cftr-modulators-initiate-drive-towards-personalized-treatment-market-growth>
- [58] F. Van Goor, S. Hadida, P. D. Grootenhuys, B. Burton, D. Cao, T. Neuberger, *et al.*, "Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, pp. 18825-30, Nov 3 2009.
- [59] P. D. Eckford, C. Li, M. Ramjeesingh, and C. E. Bear, "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner," *J Biol Chem*, vol. 287, pp. 36639-49, Oct 26 2012.
- [60] K. Y. Jih and T. C. Hwang, "Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, pp. 4404-9, Mar 12 2013.
- [61] H. I. Yeh, Y. Sohma, and K. Conrath, "A common mechanism for CFTR potentiators," vol. 149, pp. 1105-1118, Dec 4 2017.
- [62] E. F. McKone, D. Borowitz, P. Drevinek, M. Griese, M. W. Konstan, C. Wainwright, *et al.*, "Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: a phase 3, open-label extension study (PERSIST)," *Lancet Respir Med*, vol. 2, pp. 902-910, Nov 2014.
- [63] R. S. Pettit, "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-modifying medications: the future of cystic fibrosis treatment," *Ann Pharmacother*, vol. 46, pp. 1065-75, Jul-Aug 2012.

- [64] E. B. Burgener and R. B. Moss, "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators: precision medicine in cystic fibrosis," *Curr Opin Pediatr*, vol. 30, pp. 372-377, Jun 2018.
- [65] H. Yu, B. Burton, C. J. Huang, J. Worley, D. Cao, J. P. Johnson, Jr., *et al.*, "Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations," *J Cyst Fibros*, vol. 11, pp. 237-45, May 2012.
- [66] F. Van Goor, H. Yu, B. Burton, and B. J. Hoffman, "Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function," *J Cyst Fibros*, vol. 13, pp. 29-36, Jan 2014.
- [67] EMA. (2018). *P/0353/2018*. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p/0353/2018-ema-decision-22-november-2018-acceptance-modification-agreed-paediatric-investigation-plan_en.pdf
- [68] F. Van Goor, S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, J. H. Stack, K. S. Straley, *et al.*, "Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, pp. 18843-8, Nov 15 2011.
- [69] J. P. Clancy, S. M. Rowe, F. J. Accurso, M. L. Aitken, R. S. Amin, M. A. Ashlock, *et al.*, "Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation," *Thorax*, vol. 67, pp. 12-8, Jan 2012.
- [70] C. E. Wainwright, J. S. Elborn, and B. W. Ramsey, "Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR," *N Engl J Med*, vol. 373, pp. 1783-4, Oct 29 2015.
- [71] Z. Kopeikin, Z. Yuksek, H. Y. Yang, and S. G. Bompadre, "Combined effects of VX-770 and VX-809 on several functional abnormalities of F508del-CFTR channels," *J Cyst Fibros*, vol. 13, pp. 508-14, Sep 2014.
- [72] J. S. Elborn, B. W. Ramsey, M. P. Boyle, M. W. Konstan, X. Huang, G. Marigowda, *et al.*, "Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis," *Lancet Respir Med*, vol. 4, pp. 617-626, Aug 2016.
- [73] J. J. Brewington, G. L. McPhail, and J. P. Clancy, "Lumacaftor alone and combined with ivacaftor: preclinical and clinical trial experience of F508del CFTR correction," *Expert Rev Respir Med*, vol. 10, pp. 5-17, 2016.
- [74] FDA. (February 7, 2019). *Drug Approval Package: ORKAMBI (lumacaftor/ivacaftor)*. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/211358Orig1s000TOC.cfm
- [75] EMA. (2020). *ORKAMBI*. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orkambi>
- [76] S. M. Rowe, C. Daines, F. C. Ringshausen, E. Kerem, J. Wilson, E. Tullis, *et al.*, "Tezacaftor-Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis," *N Engl J Med*, vol. 377, pp. 2024-2035, Nov 23 2017.
- [77] Vertex. (June 21, 2019). *FDA Approves SYMDEKO® (tezacaftor/ivacaftor and ivacaftor) to Treat the Underlying Cause of CF in Children Ages 6-11 Years with Certain Mutations in the CFTR Gene*. Available: <https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/fda-approves-symdekor-tezacaftorivacaftor-and-ivacaftor-treat>
- [78] EMA. (2020). *SYMKEVI*. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/symkevi-0>
- [79] P. Grootenhuis, F. Van Goor, S. Hadida, B. Burton, T. Young, J. Selkirk, *et al.*, "Discovery and biological profile of next-generation CFTR correctors," in *PEDIATRIC PULMONOLOGY*, 2016, pp. 263-263.
- [80] J. C. Davies, S. M. Moskowitz, C. Brown, A. Horsley, M. A. Mall, E. F. McKone, *et al.*, "VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles," *N Engl J Med*, vol. 379, pp. 1599-1611, Oct 25 2018.
- [81] D. Keating, G. Marigowda, L. Burr, C. Daines, M. A. Mall, E. F. McKone, *et al.*, "VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles," *N Engl J Med*, vol. 379, pp. 1612-1620, Oct 25 2018.

- [82] J. L. Taylor-Cousar, M. A. Mall, B. W. Ramsey, E. F. McKone, E. Tullis, G. Marigowda, *et al.*, "Clinical development of triple-combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two F508del alleles," vol. 5, Apr 2019.
- [83] P. G. Middleton, M. A. Mall, P. Dřevínek, L. C. Lands, E. F. McKone, D. Polineni, *et al.*, "Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele," *N Engl J Med*, vol. 381, pp. 1809-1819, Nov 7 2019.
- [84] FDA. (November 25, 2019). *Drug Approval Package: TRIKAFTA*. Available: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212273Orig1s000TOC.cfm
- [85] EMA. (August 21, 2020). *KAFTRIO*. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kaftrio>
- [86] P. Morais, H. Adachi, and Y. T. Yu, "Suppression of Nonsense Mutations by New Emerging Technologies," *Int J Mol Sci*, vol. 21, Jun 20 2020.
- [87] E. M. Welch, E. R. Barton, J. Zhuo, Y. Tomizawa, W. J. Friesen, P. Trifillis, *et al.*, "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations," *Nature*, vol. 447, pp. 87-91, May 3 2007.
- [88] N. J. Ryan, "Ataluren: first global approval," *Drugs*, vol. 74, pp. 1709-14, Sep 2014.
- [89] EMA. (2020). *Translarna Summary of Product Characteristics*. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/translarna-epar-product-information_en.pdf
- [90] R. S. Finkel, K. M. Flanigan, B. Wong, C. Bönnemann, J. Sampson, H. L. Sweeney, *et al.*, "Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy," *PLoS One*, vol. 8, p. e81302, 2013.
- [91] K. Seo, E. K. Kim, J. Choi, D. S. Kim, and J. H. Shin, "Functional recovery of a novel knockin mouse model of dysferlinopathy by readthrough of nonsense mutation," *Mol Ther Methods Clin Dev*, vol. 21, pp. 702-709, Jun 11 2021.
- [92] M. Du, X. Liu, E. M. Welch, S. Hirawat, S. W. Peltz, and D. M. Bedwell, "PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, pp. 2064-9, Feb 12 2008.
- [93] I. Sermet-Gaudelus, K. D. Boeck, G. J. Casimir, F. Vermeulen, T. Leal, A. Mogenet, *et al.*, "Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 182, pp. 1262-72, Nov 15 2010.
- [94] E. Kerem, M. W. Konstan, K. De Boeck, F. J. Accurso, I. Sermet-Gaudelus, M. Wilschanski, *et al.*, "Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial," *Lancet Respir Med*, vol. 2, pp. 539-47, Jul 2014.
- [95] M. W. Konstan, D. R. VanDevanter, S. M. Rowe, M. Wilschanski, E. Kerem, I. Sermet-Gaudelus, *et al.*, "Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: The international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF)," *J Cyst Fibros*, vol. 19, pp. 595-601, Jul 2020.
- [96] C. M. McDonald, C. Campbell, R. E. Torricelli, R. S. Finkel, K. M. Flanigan, N. Goemans, *et al.*, "Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial," *Lancet*, vol. 390, pp. 1489-1498, Sep 23 2017.
- [97] C. Campbell, R. J. Barohn, E. Bertini, B. Chabrol, G. P. Comi, B. T. Darras, *et al.*, "Meta-analyses of ataluren randomized controlled trials in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy," *J Comp Eff Res*, vol. 9, pp. 973-984, Oct 2020.
- [98] EMA. (2014). *Translarna*. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/translarna>
- [99] E. Kerem, "ELX-02: an investigational read-through agent for the treatment of nonsense mutation-related genetic disease," *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 29, pp. 1347-1354, Dec 2020.

- [100] D. K. Crawford, J. Mullenders, J. Pott, S. F. Boj, S. Landskroner-Eiger, and M. M. Goddeeris, "Targeting G542X CFTR nonsense alleles with ELX-02 restores CFTR function in human-derived intestinal organoids," *J Cyst Fibros*, Feb 5 2021.
- [101] K. A. Giuliano, S. Wachi, L. Drew, D. Dukovski, O. Green, C. Bastos, *et al.*, "Use of a High-Throughput Phenotypic Screening Strategy to Identify Amplifiers, a Novel Pharmacological Class of Small Molecules That Exhibit Functional Synergy with Potentiators and Correctors," *SLAS Discov*, vol. 23, pp. 111-121, Feb 2018.
- [102] D. Dukovski, A. Vilella, C. Bastos, R. King, D. Finley, J. W. Kelly, *et al.*, "Amplifiers co-translationally enhance CFTR biosynthesis via PCBP1-mediated regulation of CFTR mRNA," *J Cyst Fibros*, vol. 19, pp. 733-741, Sep 2020.
- [103] S. V. Molinski and S. Ahmadi, "Orkambi® and amplifier co-therapy improves function from a rare CFTR mutation in gene-edited cells and patient tissue," vol. 9, pp. 1224-1243, Sep 2017.
- [104] S. H. Donaldson, G. M. Solomon, P. L. Zeitlin, P. A. Flume, A. Casey, K. McCoy, *et al.*, "Pharmacokinetics and safety of cavosonstat (N91115) in healthy and cystic fibrosis adults homozygous for F508DEL-CFTR," *J Cyst Fibros*, vol. 16, pp. 371-379, May 2017.
- [105] A. L. Cooney, P. B. McCray, Jr., and P. L. Sinn, "Cystic Fibrosis Gene Therapy: Looking Back, Looking Forward," vol. 9, Nov 7 2018.
- [106] E. K. Schneider-Futschik, "Beyond cystic fibrosis transmembrane conductance regulator therapy: a perspective on gene therapy and small molecule treatment for cystic fibrosis," *Gene Ther*, vol. 26, pp. 354-362, Sep 2019.
- [107] Z. Yan, P. B. McCray, Jr., and J. F. Engelhardt, "Advances in gene therapy for cystic fibrosis lung disease," *Hum Mol Genet*, vol. 28, pp. R88-r94, Oct 1 2019.
- [108] E. Alton, D. K. Armstrong, D. Ashby, K. J. Bayfield, D. Bilton, E. V. Bloomfield, *et al.*, "Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial," *Lancet Respir Med*, vol. 3, pp. 684-691, Sep 2015.
- [109] E. Alton, D. K. Armstrong, D. Ashby, K. J. Bayfield, D. Bilton, E. V. Bloomfield, *et al.*, "Efficacy and Mechanism Evaluation," in *A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis*, ed, 2016.
- [110] E. W. Alton, J. M. Beekman, A. C. Boyd, J. Brand, M. S. Carlon, M. M. Connolly, *et al.*, "Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis," *Thorax*, vol. 72, pp. 137-147, Feb 2017.
- [111] G. Schwank, B. K. Koo, V. Sasselli, J. F. Dekkers, I. Heo, T. Demircan, *et al.*, "Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients," *Cell Stem Cell*, vol. 13, pp. 653-8, Dec 5 2013.
- [112] M. H. Geurts, E. de Poel, G. D. Amatngalim, R. Oka, F. M. Meijers, E. Kruisselbrink, *et al.*, "CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank," *Cell Stem Cell*, vol. 26, pp. 503-510.e7, Apr 2 2020.
- [113] A. M. Crane, P. Kramer, J. H. Bui, W. J. Chung, X. S. Li, M. L. Gonzalez-Garay, *et al.*, "Targeted correction and restored function of the CFTR gene in cystic fibrosis induced pluripotent stem cells," *Stem Cell Reports*, vol. 4, pp. 569-77, Apr 14 2015.
- [114] M. A. Kotterman and D. V. Schaffer, "Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy," *Nat Rev Genet*, vol. 15, pp. 445-51, Jul 2014.
- [115] M. Marangi and G. Pistrutto, "Innovative Therapeutic Strategies for Cystic Fibrosis: Moving Forward to CRISPR Technique," *Front Pharmacol*, vol. 9, p. 396, 2018.
- [116] B. W. Ramsey, J. Davies, N. G. McElvaney, E. Tullis, S. C. Bell, P. Dřevínek, *et al.*, "A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation," *N Engl J Med*, vol. 365, pp. 1663-72, Nov 3 2011.
- [117] M. P. Boyle, S. C. Bell, M. W. Konstan, S. A. McColley, S. M. Rowe, E. Rietschel, *et al.*, "A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a Phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial," *Lancet Respir Med*, vol. 2, pp. 527-38, Jul 2014.

- [118] S. H. Donaldson, J. M. Pilewski, M. Griese, J. Cooke, L. Viswanathan, E. Tullis, *et al.*, "Tezacaftor/Ivacaftor in Subjects with Cystic Fibrosis and F508del/F508del-CFTR or F508del/G551D-CFTR," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 197, pp. 214-224, Jan 15 2018.
- [119] K. E. Secunda, J. S. Guimbellot, B. Jovanovic, S. L. Heltshe, S. D. Sagel, S. M. Rowe, *et al.*, "Females with Cystic Fibrosis Demonstrate a Differential Response Profile to Ivacaftor Compared with Males," vol. 201, pp. 996-998, Apr 15 2020.
- [120] P. O. Hanafin, I. Sermet-Gaudelus, M. Griese, M. Kappler, H. Ellemunter, C. Schwarz, *et al.*, "Insights Into Patient Variability During Ivacaftor-Lumacaftor Therapy in Cystic Fibrosis," *Front Pharmacol*, vol. 12, p. 577263, 2021.
- [121] T. Sato, R. G. Vries, H. J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D. E. Stange, *et al.*, "Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche," *Nature*, vol. 459, pp. 262-5, May 14 2009.
- [122] F. M. Gribble and F. Reimann, "Function and mechanisms of enteroendocrine cells and gut hormones in metabolism," vol. 15, pp. 226-237, Apr 2019.
- [123] J. F. Dekkers, C. L. Wiegerinck, H. R. de Jonge, I. Bronsveld, H. M. Janssens, K. M. de Winter-de Groot, *et al.*, "A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids," *Nat Med*, vol. 19, pp. 939-45, Jul 2013.
- [124] J. F. Dekkers, G. Berkers, E. Kruisselbrink, A. Vonk, H. R. de Jonge, H. M. Janssens, *et al.*, "Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis," *Sci Transl Med*, vol. 8, p. 344ra84, Jun 22 2016.
- [125] K. M. de Winter-de Groot, H. M. Janssens, and R. T. van Uum, "Stratifying infants with cystic fibrosis for disease severity using intestinal organoid swelling as a biomarker of CFTR function," vol. 52, Sep 2018.
- [126] G. Berkers, P. van Mourik, A. M. Vonk, E. Kruisselbrink, J. F. Dekkers, K. M. de Winter-de Groot, *et al.*, "Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis," *Cell Rep*, vol. 26, pp. 1701-1708.e3, Feb 12 2019.
- [127] E. de Poel, J. W. Lefferts, and J. M. Beekman, "Intestinal organoids for Cystic Fibrosis research," *J Cyst Fibros*, vol. 19 Suppl 1, pp. S60-s64, Mar 2020.
- [128] N. T. Awatade, S. L. Wong, C. K. Hewson, L. K. Fawcett, A. Kicic, A. Jaffe, *et al.*, "Human Primary Epithelial Cell Models: Promising Tools in the Era of Cystic Fibrosis Personalized Medicine," *Front Pharmacol*, vol. 9, p. 1429, 2018.
- [129] N. Sachs, A. Papaspyropoulos, D. D. Zomer-van Ommen, I. Heo, L. Böttinger, D. Klay, *et al.*, "Long-term expanding human airway organoids for disease modeling," vol. 38, Feb 15 2019.
- [130] N. Sachs, A. Papaspyropoulos, D. D. Zomer-van Ommen, I. Heo, L. Bottinger, D. Klay, *et al.*, "Long-term expanding human airway organoids for disease modeling," vol. 38, Feb 15 2019.
- [131] K. Kunzelmann, T. Koslowsky, T. Hug, D. C. Gruenert, and R. Greger, "cAMP-dependent activation of ion conductances in bronchial epithelial cells," *Pflugers Arch*, vol. 428, pp. 590-6, Oct 1994.
- [132] N. T. Awatade, I. Uliyakina, C. M. Farinha, L. A. Clarke, K. Mendes, A. Sole, *et al.*, "Measurements of Functional Responses in Human Primary Lung Cells as a Basis for Personalized Therapy for Cystic Fibrosis," *EBioMedicine*, vol. 2, pp. 147-53, 2015.
- [133] F. de Courcey, A. V. Zholos, H. Atherton-Watson, M. T. Williams, P. Canning, H. L. Danahay, *et al.*, "Development of primary human nasal epithelial cell cultures for the study of cystic fibrosis pathophysiology," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 303, pp. C1173-9, Dec 1 2012.
- [134] P. E. Bratcher, S. Yadav, C. A. Shaughnessy, and I. M. Thornell, "Effect of apical chloride concentration on the measurement of responses to CFTR modulation in airway epithelia cultured from nasal brushings," vol. 8, p. e14603, Oct 2020.
- [135] J. J. Brewington, E. T. Filbrandt, F. J. LaRosa, 3rd, A. J. Ostmann, L. M. Strecker, R. D. Szczesniak, *et al.*, "Detection of CFTR function and modulation in primary human nasal cell spheroids," *J Cyst Fibros*, vol. 17, pp. 26-33, Jan 2018.

- [136] Z. Liu, J. D. Anderson, L. Deng, S. Mackay, J. Bailey, L. Kersh, *et al.*, "Human Nasal Epithelial Organoids for Therapeutic Development in Cystic Fibrosis," *Genes (Basel)*, vol. 11, May 29 2020.
- [137] J. S. Guimbellot, J. M. Leach, I. G. Chaudhry, N. L. Quinney, S. E. Boyles, M. Chua, *et al.*, "Nasospheroids permit measurements of CFTR-dependent fluid transport," *JCI Insight*, vol. 2, Nov 16 2017.
- [138] M. L. Fulcher, S. E. Gabriel, J. C. Olsen, J. R. Tatreau, M. Gentzsch, E. Livanos, *et al.*, "Novel human bronchial epithelial cell lines for cystic fibrosis research," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 296, pp. L82-91, Jan 2009.
- [139] S. H. Randell, M. L. Fulcher, W. O'Neal, and J. C. Olsen, "Primary epithelial cell models for cystic fibrosis research," *Methods Mol Biol*, vol. 742, pp. 285-310, 2011.
- [140] I. Pranke, A. Hatton, A. Masson, T. Flament, M. Le Bourgeois, F. Chedevergne, *et al.*, "Might Brushed Nasal Cells Be a Surrogate for CFTR Modulator Clinical Response?," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 199, pp. 123-126, Jan 1 2019.
- [141] M. Calucho, S. Gartner, P. Barranco, P. Fernández-Álvarez, R. G. Pérez, and E. F. Tizzano, "Validation of nasospheroids to assay CFTR functionality and modulator responses in cystic fibrosis," *Sci Rep*, vol. 11, p. 15511, Jul 30 2021.
- [142] J. F. Dekkers, M. Alieva, L. M. Wellens, H. C. R. Ariese, P. R. Jamieson, A. M. Vonk, *et al.*, "High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids," vol. 14, pp. 1756-1771, Jun 2019.
- [143] (January 24, 2020). *Fiji ImageJ*. Available: <https://imagej.net/Fiji>
- [144] A. M. Vonk, P. van Mourik, A. S. Ramalho, I. A. L. Silva, M. Statia, E. Kruisselbrink, *et al.*, "Protocol for Application, Standardization and Validation of the Forskolin-Induced Swelling Assay in Cystic Fibrosis Human Colon Organoids," *STAR Protoc*, vol. 1, p. 100019, Jun 19 2020.
- [145] M. C. Hagemeijer, A. M. Vonk, N. T. Awatade, I. A. L. Silva, C. Tischer, V. Hilsenstein, *et al.*, "An open-source high-content analysis workflow for CFTR function measurements using the forskolin-induced swelling assay," *Bioinformatics*, Dec 26 2020.
- [146] D. D. Zomer-van Ommen, L. A. Vijftigschild, E. Kruisselbrink, A. M. Vonk, J. F. Dekkers, H. M. Janssens, *et al.*, "Limited premature termination codon suppression by read-through agents in cystic fibrosis intestinal organoids," *J Cyst Fibros*, vol. 15, pp. 158-62, Mar 2016.
- [147] (2020). *GraphPad Prism*. Available: <https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>
- [148] D. Muilwijk, E. de Poel, P. van Mourik, S. W. F. Suen, A. M. Vonk, J. E. Brunsveld, *et al.*, "Forskolin-induced swelling of intestinal organoids predicts long-term cystic fibrosis disease progression," *medRxiv*, p. 2021.02.01.21250609, 2021.
- [149] G. Cui, K. A. Cottrill, and N. A. McCarty, "Electrophysiological Approaches for the Study of Ion Channel Function," *Methods Mol Biol*, vol. 2302, pp. 49-67, 2021.
- [150] J. Hou, "Chapter 3 - Biophysical approaches for tight junction," in *A Laboratory Guide to the Tight Junction*, J. Hou, Ed., ed: Academic Press, 2020, pp. 89-151.
- [151] Y. Tian, R. Schreiber, P. Wanitchakool, P. Kongsuphol, M. Sousa, I. Uliyakina, *et al.*, "Control of TMEM16A by INO-4995 and other inositolphosphates," *Br J Pharmacol*, vol. 168, pp. 253-65, Jan 2013.
- [152] H. Li, D. N. Sheppard, and M. J. Hug, "Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber," *J Cyst Fibros*, vol. 3 Suppl 2, pp. 123-6, Aug 2004.
- [153] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, and J. J. Hickman, "TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems," *J Lab Autom*, vol. 20, pp. 107-26, Apr 2015.
- [154] M. A. Bridges, D. C. Walker, R. A. Harris, B. R. Wilson, and A. G. Davidson, "Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues," *Biochem Cell Biol*, vol. 69, pp. 102-8, Feb-Mar 1991.
- [155] I. Carvalho-Oliveira, A. Efthymiadou, R. Malhó, P. Nogueira, M. Tzetis, E. Kanavakis, *et al.*, "CFTR localization in native airway cells and cell lines expressing wild-type or

- F508del-CFTR by a panel of different antibodies," *J Histochem Cytochem*, vol. 52, pp. 193-203, Feb 2004.
- [156] D. Penque, F. Mendes, S. Beck, C. Farinha, P. Pacheco, P. Nogueira, *et al.*, "Cystic fibrosis F508del patients have apically localized CFTR in a reduced number of airway cells," *Lab Invest*, vol. 80, pp. 857-68, Jun 2000.
- [157] C. M. Harris, F. Mendes, A. Dragomir, I. J. Doull, I. Carvalho-Oliveira, Z. Bebok, *et al.*, "Assessment of CFTR localisation in native airway epithelial cells obtained by nasal brushing," *J Cyst Fibros*, vol. 3 Suppl 2, pp. 43-8, Aug 2004.
- [158] M. A. van Meegen, S. W. Terheggen, K. J. Koymans, L. A. Vijftigschild, J. F. Dekkers, C. K. van der Ent, *et al.*, "CFTR-mutation specific applications of CFTR-directed monoclonal antibodies," *J Cyst Fibros*, vol. 12, pp. 487-96, Sep 2013.
- [159] N. T. Awatade, S. Ramalho, I. A. L. Silva, V. Felício, H. M. Botelho, E. de Poel, *et al.*, "R560S: A class II CFTR mutation that is not rescued by current modulators," *J Cyst Fibros*, vol. 18, pp. 182-189, Mar 2019.
- [160] K. M. de Winter-de Groot, G. Berkers, R. E. P. Marck-van der Wilt, R. van der Meer, A. Vonk, J. F. Dekkers, *et al.*, "Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations," *J Cyst Fibros*, Nov 14 2019.
- [161] O. Laselva, C. Bartlett, T. N. A. Gunawardena, H. Ouyang, P. D. W. Eckford, T. J. Moraes, *et al.*, "Rescue of multiple class II CFTR mutations by elexacaftor+tezacaftor+ivacaftor mediated in part by the dual activities of elexacaftor as both corrector and potentiator," *Eur Respir J*, vol. 57, Jun 2021.
- [162] E. Furstova, T. Dousova, J. Beranek, M. Libik, L. Fila, M. Modrak, *et al.*, "Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis," *J Cyst Fibros*, Aug 1 2021.
- [163] J. D. Anderson, Z. Liu, L. V. Odom, L. Kersh, and J. S. Guimbellot, "CFTR Function and Clinical Response to Modulators Parallel Nasal Epithelial Organoid Swelling," *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, May 19 2021.
- [164] S. M. Rowe, S. A. McColley, E. Rietschel, X. Li, S. C. Bell, M. W. Konstan, *et al.*, "Lumacaftor/Ivacaftor Treatment of Patients with Cystic Fibrosis Heterozygous for F508del-CFTR," vol. 14, pp. 213-219, Feb 2017.
- [165] G. Veit and T. Velkov, "A Precision Medicine Approach to Optimize Modulator Therapy for Rare CFTR Folding Mutants," vol. 11, Jul 7 2021.
- [166] M. Wilschanski, L. L. Miller, D. Shoseyov, H. Blau, J. Rivlin, M. Aviram, *et al.*, "Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis," *Eur Respir J*, vol. 38, pp. 59-69, Jul 2011.
- [167] K. M. de Winter-de Groot, G. Berkers, R. E. P. Marck-van der Wilt, R. van der Meer, A. Vonk, J. F. Dekkers, *et al.*, "Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations," *J Cyst Fibros*, vol. 19, pp. 614-619, Jul 2020.
- [168] J. J. Brewington, E. T. Filbrandt, F. J. LaRosa, 3rd, J. D. Moncivaiz, A. J. Ostmann, L. M. Strecker, *et al.*, "Brushed nasal epithelial cells are a surrogate for bronchial epithelial CFTR studies," *JCI Insight*, vol. 3, Jul 12 2018.
- [169] M. Comegna, V. Terlizzi, and D. Salvatore, "Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor Therapy for Cystic Fibrosis Patients with The F508del/Unknown Genotype," vol. 10, Jul 7 2021.
- [170] V. Terlizzi, C. Colangelo, G. Marsicovetere, M. D'Andria, M. Francalanci, D. Innocenti, *et al.*, "Effectiveness of Elexacaftor/Tezacaftor/Ivacaftor Therapy in Three Subjects with the Cystic Fibrosis Genotype Phe508del/Unknown and Advanced Lung Disease," vol. 12, Jul 29 2021.
- [171] P. M. Haggie, P. W. Phuan, J. A. Tan, H. Xu, R. G. Avramescu, D. Perdomo, *et al.*, "Correctors and Potentiators Rescue Function of the Truncated W1282X-Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) Translation Product," *J Biol Chem*, vol. 292, pp. 771-785, Jan 20 2017.

- [172] J. E. Peabody Lever, V. Mutyam, H. Y. Hathorne, N. Peng, J. Sharma, L. J. Edwards, *et al.*, "Ataluren/ivacaftor combination therapy: Two N-of-1 trials in cystic fibrosis patients with nonsense mutations," vol. 55, pp. 1838-1842, Jul 2020.
- [173] I. Pranke, L. Bidou, N. Martin, S. Blanchet, A. Hatton, S. Karri, *et al.*, "Factors influencing readthrough therapy for frequent cystic fibrosis premature termination codons," vol. 4, Jan 2018.
- [174] S. M. Rowe, K. Varga, A. Rab, Z. Bebok, K. Byram, Y. Li, *et al.*, "Restoration of W1282X CFTR activity by enhanced expression," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 37, pp. 347-56, Sep 2007.
- [175] L. A. Clarke, N. T. Awatade, V. M. Felicio, I. A. Silva, M. Calucho, L. Pereira, *et al.*, "The effect of premature termination codon mutations on CFTR mRNA abundance in human nasal epithelium and intestinal organoids: a basis for read-through therapies in cystic fibrosis," *Hum Mutat*, vol. 40, pp. 326-334, Mar 2019.

X – Anexos

Publicaciones realizadas durante la tesis doctoral.

- Relacionadas con los resultados presentados en esta tesis doctoral:

ADJUNTADA. **Calucho M**, Gartner S, Barranco P, Fernández-Álvarez P, Pérez RG, Tizzano EF, “Validation of nasospheroids to assay CFTR functionality and modulator responses in cystic fibrosis”, *Sci Rep* 2021 Jul 30;11(1):15511. doi: 10.1038/s41598-021-94798-x.

- Otras publicaciones hechas durante los años de tesis doctoral, no relacionadas con los resultados presentados en esta tesis doctoral:

Clarke LA, Awatade NT, Felício VM, Silva IA, **Calucho M**, Pereira L, Azevedo L, Cavaco J, Barreto C, Bertuzzo C, Gartner S, Beekman J, Amaral MD, “The effect of premature termination codón mutations on CFR mRNA abundance in human nasal epithelium and intestinal organoids: a basis for read-through therapies in cystic fibrosis. *Hum Mutat.* 2019 Mar;40(3):326-334. doi:10.1002/humu.23692. Epub 2018 Dec 10.

Calucho M, Bernal S, Alías L, March F, Venceslá A, Rodríguez-Álvarez FJ, Aller E, Fernández RM, Borrego S, Millán JM, Hernández-Chico C, Cuscó I, Fuentes-Prior P, Tizzano EF, “Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord.* 2018 Mar;28(3):208-215. doi: 10.1016/j.nmd.2018.01.003. Epub 2018 Jan 11.

Alías L, Bernal S, **Calucho M**, Martínez E, March F, Gallano P, Fuentes-Prior P, Abuli A, Serra-Juhe C, Tizzano EF, “Utility of two SMN1 variants to improve spinal muscular atrophy carrier diagnosis and genetic counselling. *Eur J Hum Genet.* 2018 Oct;26(10):1554-1557. doi: 10.1038/s41431-018-0193-4. Epub 2018 Jun 14.

Costa C, Eixarch H, Martínez-Sáez E, Calvo-Barreiro L, **Calucho M**, Castro Z, Ortega-Aznar A, Ramón Y Cajal S, Montalban X, Espejo C, “Expression of bone morphogenetic proteins in multiple sclerosis lesions”. *Am J Pathol.* 2019 Mar;189(3):665-676. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.11.007. Epub 2018 Dec 13.

Cuscó I, Bernal S, Blasco-Pérez L, **Calucho M**, Alias L, Fuentes-Prior P, Tizzano EF, “Practical guidelines to manage discordant situations of SMN2 copy number in patients with spinal muscular atrophy”. *Neurol Genet.* 2020 Nov 18;6(6):e530. doi: 10.1212/NXG.0000000000000530. eCollection 2020 Dec.



OPEN

Validation of nasospheroids to assay CFTR functionality and modulator responses in cystic fibrosis

Maite Calucho^{1,2}, Silvia Gartner^{3,5}, Paula Barranco^{1,2}, Paula Fernández-Álvarez^{1,2}, Raquel García Pérez⁴ & Eduardo F. Tizzano^{1,2,5}✉

The availability of a simple, robust and non-invasive *in vitro* airway model would be useful to study the functionality of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) protein and to personalize modulator therapy for cystic fibrosis (CF) patients. Our aim was to validate a CFTR functional study using nasospheroids, a patient-derived nasal cell 3D-culture. We performed live-cell experiments in nasospheroids obtained from wild-type individuals and CF patients with different genotypes and phenotypes. We extended the existing method and expanded the analysis to upgrade measurements of CFTR activity using forskolin-induced shrinking. We also tested modulator drugs in CF samples. Immobilizing suspended-nasospheroids provided a high number of samples for live-cell imaging. The diversity observed in basal sizes of nasospheroids did not affect the functional analysis of CFTR. Statistical analysis with our method was simple, making this protocol easy to reproduce. Moreover, we implemented the measurement of inner fluid reservoir areas to further differentiate CFTR functionality. In summary, this rapid methodology is helpful to analyse response to modulators in CF samples to allow individualized treatment for CF patients.

Cystic fibrosis (CF) is the most common lethal monogenic disease with an incidence of 1/3000–10,000 newborns. It is caused by bi-allelic pathogenic variants in the cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene and codifies for an epithelial Cl⁻ channel¹. More than 2000 pathogenic variants have been reported in the *CFTR* gene to date but the F508del pathogenic variant is present in about 65% of mutant alleles worldwide². *CFTR* pathogenic variants are classified into seven types (I–VII) according to their effect on the CFTR protein (Supplementary Table S1)³. In view of the wide diversity of genotypes, clinical severity is variable. However, the most common and life-threatening manifestation is lung disease leading to respiratory failure.

The recent development of CFTR modulator drugs – correctors and potentiators – has been successful in partially restoring the CFTR protein defect. Corrector molecules (VX-809 lumacaftor, VX-661 tezacaftor, and VX-445 elxacaftor) partially restore the CFTR processing defects and the protein can reach the cell surface^{4,5}. The VX-770 potentiator (ivacaftor) enhances the CFTR channel opening (Supplementary Table S1)⁶. Modulator drugs are now approved for several *CFTR* genotypes^{7–10}. Monotherapy with potentiator VX-770 (KALYDECO) is addressed to class III and IV genotypes⁶. The combination lumacaftor with ivacaftor (ORKAMBI) has been used satisfactorily to treat patients who are homozygous for F508del, a class II pathogenic variant¹¹. Tezacaftor with ivacaftor (SYMDEKO/SYMKEVI) is indicated for patients who are F508del homozygous or F508del heterozygous with a residual function variant^{12,13}. More recently, a triple combination with two different correctors (tezacaftor and elxacaftor) and potentiator ivacaftor (TRIKAFTA/KAFTRIO), has been approved to treat F508del homozygous patients^{10,14}, or those who carry a single copy of the F508del genetic variant with a minimal function variant^{15,16}.

The advent of modulator therapy has undoubtedly advanced healthcare for CF patients. However, CFTR-drug restoration is limited in some patients^{17,18} and new pharmacological approaches are currently under investigation to treat patients for whom no specific treatment is yet available, such as those with class I, VII or rare pathogenic

¹Medicine Genetics Group, Vall D'Hebron Research Institute, 08035 Barcelona, Spain. ²Department of Clinical and Molecular Genetics, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain. ³Cystic Fibrosis Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain. ⁴Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. ⁵These authors contributed equally: Silvia Gartner and Eduardo F. Tizzano. ✉email: etizzano@vhebron.net

Subject (Gender)	Genotype	Functional class	Age at sampling procedure	Pancreatic function	FEV ₁ %	Bronchiectasis	Chronic colonization	In vitro response to modulators
CF1 (M)	F508del/2183AA>G	II/I	15	Insufficiency	45	Yes	SA-PA	+ +
CF2 (F)	F508del/2183AA>G	II/I	17	Insufficiency	85	Yes (mild)	No	+
CF3 (M)	F508del/3849 + 10KbC>T	II/V	6	Sufficiency	110	No	No	+ + *
CF4 (M)	L227R/L227R	Undetermined	19	Insufficiency	80	Yes	MRSA	-
CF5 (F)	G542X/R117H-7H	I/IV	12	Sufficiency	116	No	No	-
CF6 (M)	F508del/F508del	II	18	Insufficiency	57	Yes	SA-PA	+ +
CF7 (M)	F508del/1812-1G>A	II/I (canonical splicing)	18	Insufficiency	86	Yes	SA	-

Table 1. Patients' clinical information and in vitro response to modulators. CF1 and CF2 subjects share the same genotype but are unrelated. Pathogenic variants are indicated with their legacy names. Gender: M (male) F (female); Chronic colonization: SA (*Staphylococcus aureus*), MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*), SA-PA (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). Last column describes in vitro nasospheroid response to VX-770 + VX-809 and/or VX-770 + VX-661 assessing FR and AUC analysis in IFRA after live-cell imaging assay (t = 60 min). Responses were categorized according to the statistical differences found between FSK and VX treatment: + + notable response = observed in both, FR and AUC values; + moderate response = significant differences in FR or AUC values; - no response = no significant differences. * Only responder to VX-770 + VX-661.

variants. It is therefore crucial to study CFTR function individually in order to predict responses to currently approved or experimental drugs.

In this context, CFTR functional assays using in vitro patient-derived cells have emerged in recent years. The most remarkable approach is the forskolin-induced swelling (FIS) assay in intestinal organoids¹⁷. This in vitro assay stratifies patients according to disease severity and predicts CFTR restoration after treatment^{19–22}. However, it requires invasive biopsy, time-consuming cell cultures, and highly skilled personnel. Additionally, this model is derived from intestinal epithelium which may not be specific to study airway CFTR function. In an attempt to solve this inconvenience, a variety of respiratory patient-derived cell models has been investigated^{23–29}. Along these lines, Guimbellot et al.³⁰ developed a simple model of nasospheroids, a 3D nasal cell culture obtained by means of a minimally invasive procedure. This nasal cell culture approach enables measurements of CFTR-fluid transport by live-cell assay, and is therefore a potential tool to test the efficacy of modulator drugs in CF patients. However, a standardized protocol is not yet well established and the approach has two main limitations: the number of nasospheroids available for live-cell assay is low and the statistical analysis is complex.

Our aim was to validate the use of nasospheroids and enhance their reproducibility for implementation in order to analyze CFTR function and to test CFTR modulator drugs. Moreover, we aimed to overcome some limitations of the original protocol by implementing modifications in both the technique and the posterior analysis.

Methods

Participants. The study was conducted at the Cystic Fibrosis Unit and facilities at the Vall d'Hebron Research Institute at Hospital Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). The protocol was approved by the local ethics committee (Comité Ético de Investigación con Medicamentos y Comisión de Proyectos de Investigación del Hospital Universitari Vall d'Hebron) (PR(AMI)291/2017) and all methods were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Informed consent was signed by all participants, and their legal representative if under-age. Seven healthy wild-type (WT) volunteers over 18 years of age and 7 CF patients aged 6–19 years were recruited for this study. CF patients were diagnosed by positive neonatal screening, abnormal sweat chloride test and the presence of two pathogenic variants in the *CFTR* gene in all cases. CF patients were stable and recruited in a routine follow-up, and they presented the following genotypes: F508del/2183AA>G (n = 2), G542X/R117H-7 T (n = 1), F508del/3849+10kbC>T (n = 1), L227R/L227R (n = 1), F508del/F508del (n = 1) and F508del/1812-1G>A (n = 1). Patients sharing genotype F508del/2183AA>G were unrelated. Pathogenic variants are indicated with their legacy names. Table 1 provides further information on patients' demographic and clinical characteristics.

Nasal epithelial cell sampling. Nasal epithelial cells were collected by skilled professionals in the Cystic Fibrosis Unit of Hospital Vall d'Hebron using currettes (ASI Rhino-Probe, Arlington Scientific, Springville, UT). Two nasal curretages were collected from each nostril and cells were placed in 5 ml complete culture medium.

Growth and expansion of nasal epithelial cells. We modified the original protocol from Guimbellot et al. for expansion and maintenance of nasospheroids in three ways³⁰. First, the culture medium used was bronchial epithelial cell medium (BEpiCM ScienceCell; Carlsbad, CA, USA) supplemented for 3 days with 0.33 nM EC23, 1 μM A83-01, 5 μM Y-27632 (72304 STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada), and 1 μM DMH-1. Second, nasospheroids were grown in standard 24-well plates. And third, nasospheroids were embedded in Matrigel (Growth Factor Reduced and phenol-free, Corning, NY) under two conditions. In the standard protocol or condition 1 (C1), nasospheroids were grown and maintained in suspension until 24 h before the confocal live-cell imaging experiments. Cells were then collected in a 1.5 ml tube. After centrifugation (400 g,

5 min, 4 °C), 5 µl-drops of pellet were plated in a heated (37 °C, 1 week) 24-well black plate (ibidi GmbH 82406, Gräfelfing, Germany). Pellet drops were resuspended 1:1 with Matrigel and incubated for 15 min (37 °C) to let the Matrigel solidify before adding complete medium. For condition 2 (C2), fresh nasal epithelial cells were centrifuged (400 g, 5 min, 4 °C) and the pellet was slowly resuspended in Matrigel (final concentration 1:1). Matrigel drops were placed in standard 24-well plates. Cells were maintained until live-cell experiments were performed. Twenty-four hours before these experiments, nasospheroids were collected, centrifuged and transferred to 24-well black plates. In vitro live-cell imaging was carried out between days 8 and 10 after cell collection.

Confocal live-cell microscopy image. Nasospheroids were labelled with 8 µM Calcein Green AM 15 min before starting the confocal live-cell experiments. For CFTR activation, we administered 10 µM forskolin (FSK) (F3917 Sigma-Aldrich; to increase cAMP levels), 100 µM amiloride (to inhibit epithelial sodium channel) and 100 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (to maintain intracellular cAMP levels)³⁰. Modulators (VX-770, VX-809 and VX-661; S1144, S1565, S7059 Selleckchem) were tested at 5 µM and combined with FSK, Amiloride and IBMX. Correctors VX-809 and VX-661 were incubated for 24 h before the live-cell analysis. The vehicle control used was dimethyl sulfoxide (DMSO) (final concentration < 1% in culture medium; without supplements). CFTR inhibitor (CFTR_{inh} - 172; Sigma-Aldrich 219670) was incubated for 3 h (10 µM).

Equipment and settings. Microscopy fields were manually chosen at basal conditions (before administering any compound). Five z-stacks at 6 µm distance were taken sequentially. Images of the selected sections were taken every 10 min (up to 60 min) using a Zeiss LSM780 confocal microscope. This microscope has a motorized stage and a chamber controlling CO₂ (5%), humidity (55%) and temperature (37 °C); the chamber was preheated for 1 h. A 10×0.4 NA objective was used. Images were captured in bright-field and fluorescent/calcein emission (488 nm excitation and 500–530 nm emission). Images were obtained at 512×512, 8-bit. The confocal pinhole was set to 33.4.

Image analysis. Areas of nasospheroids were analyzed by ImageJ/FIJI³¹ using maximum intensity projection images. The contour of the nasospheroids was manually delineated using the *freehand* tool. IMAGEJ/FIJI software automatically calculates the selected area. For inner areas, we delineated the area of the lumen using the same tool. This delineation have been illustrated in previous reports^{17,32}.

GraphPad statistics. Statistical analysis tests based on the raw data were assessed using Prism statistical software version 6 and 8 (GraphPad)³³. Significance was considered at $p < 0.05$.

Area under the curve (AUC) values were calculated from raw data and based on intestinal organoid studies in CF research¹⁷. Automatic AUC analysis (section “XY analyses”) were performed by GraphPad Prism software, applying baseline $Y = 0$.

Development of a specific mixed-level model for analysis of nasospheroids. The logarithmic model was specifically designed for our data to analyze the area of WT nasospheroid according to “Stimulus” (FSK and DMSO) and “Condition” of cell culture (C1 or C2) (Supplementary Table S2). We assessed a novel mixed model for repeated measurements which were logarithmically transformed³⁴ (Supplementary Table S3). Supplementary Table S2 shows the variables considered for the model. All variables were considered independent and each nasospheroid was considered an aleatory factor. The level of significance used in the statistical tests was $p < 0.05$. Several model structures were explored using the Akaike information criterion (AIC) adjusted index. The initial model with logarithmic transformed measures showed an AIC value of -445,479. To describe quantitative variables we used the mean, standard deviation, maximum, and minimum values. To describe qualitative variables we analyzed the absolute and relative frequencies. Statistical analysis was carried out using SAS v9.4 and R software v3.1.2. The individual component was incorporated as a random factor.

Results

Formation and embedding of nasospheroids for in vivo imaging analysis. We first validated the formation of WT nasospheroids in cell cultures from epithelial nasal cells obtained by nasal curettage. A total of $5\text{--}7 \times 10^4$ cells were seeded, without resuspension, and cell aggregates are formed a few hours later. Three days after culture in a bronchial serum free-medium, these clusters developed hundreds of completely formed nasospheroids with the apical surface facing outward and expressing CFTR protein (Supplementary Fig. S1). Nasospheroid size depended on the number of agglutinated epithelial cells forming the spherical structure. CFTR FSK/cAMP-stimulated transport was studied in nasospheroids by live-cell imaging to analyze shrinking after CFTR activation³⁰. Given that cells were growing in suspension, we embedded nasospheroids in Matrigel to warrant stability and unambiguous follow-up during the live-cell imaging analysis. The maximum number of nasospheroids analyzed per experiment and sample was 55 (mean per experiment \pm SD = 21.310 ± 16.112).

To rule out the influence of Matrigel in CFTR-dependent transport, we performed the experiments in two different conditions: C1, where nasospheroids were embedded in Matrigel the day before live-cell imaging, and C2, where spheres were grown embedded in Matrigel from the start (details in *Methods*) (Supplementary Fig. S2, Supplementary Video S1 and S2). Nasospheroids grown in both conditions presented different mean sizes (mean \pm SD): $7911.351 \pm 6774.84 \mu\text{m}^2$ ($n = 162$ for C1) and $5956.277 \pm 5432.514 \mu\text{m}^2$ ($n = 125$ for C2) ($***p = 0.0003$ t-test). Changes in cross-sectional areas (CRA) of nasospheroids were calculated relative to $t = 0$ (fractional reduction, FR). After 60 min of FSK administration, we analyzed the FR of 80 nasospheroids in C1 and 98 in C2, and we found no significant differences between the two conditions ($p = 0.1563$; paired t-test) (Fig. 1a).

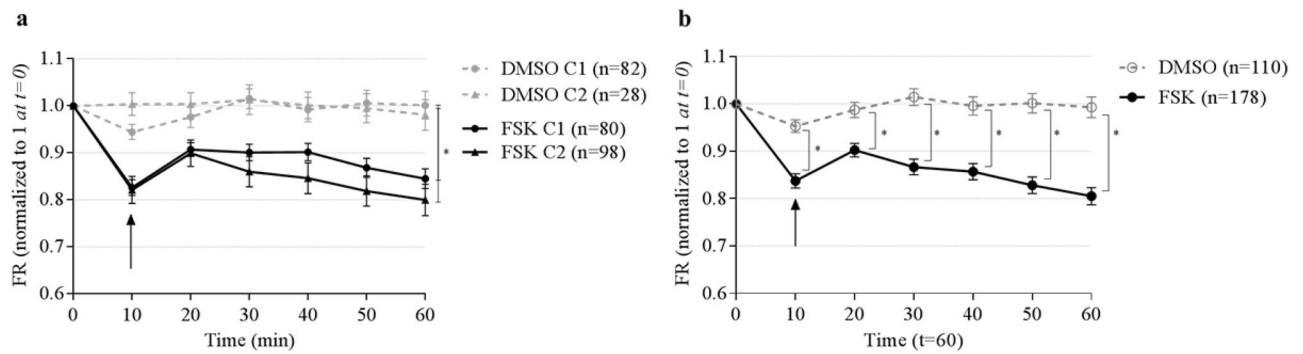


Figure 1. Similar responses of WT nasospheroids using two conditions of exposure to Matrigel and differences between incubation with FSK or DMSO. **(a)** Nasospheroids from seven WT patients were grown in two conditions: the standard protocol or *condition 1* (C1) (spheres formed in suspension and embedded in Matrigel the day before live-cell imaging) and *condition 2* (C2) (spheres in Matrigel for 7 days minimum) (see details in *Methods*). The starting size of each nasospheroid was set at 1. At time point 0, nasospheroids were in basal conditions. For CFTR activation (FSK), 10 μ M forskolin plus IBMX and amiloride (for epithelial sodium channel “ENaC” inhibition) were incubated ($t = 10$; black arrow). For non-stimulated spheres, dimethyl sulfoxide (DMSO) was administered. Size reduction in respect to basal size was calculated along time points up to 60 min. No significant differences were found between conditions 1 and 2 (“FSK” incubation or non-stimulated “DMSO”) ($*p = 0.1563$; paired t-test). Dots and triangles represent the mean fractional reduction (FR) at each time point. Bars represent standard deviation error (SEM). **(b)** Results from spheres grown under conditions 1 and 2 were combined. Differences between stimulus DMSO and FSK were observed from $t = 10$ and increased over time (t-test by GraphPad Prism and by our newly developed logarithmic-transformed measures’ model) ($t = 10$ min $p = 0.008$, $t = 35$ min $p = 0.0004$, $t = 70$ min $p = 0.0002$). We also observed a reduction peak when DMSO or FSK were added at time 10 (black arrow). This change could be due to a reaction of nasospheroids to the addition of compounds. Bars represent standard deviation error (SEM). Graphic created with GraphPad Prism version 6³³.

Matrigel-embedded nasospheroids (C1 and C2) presented similar FR mean values after FSK administration ($t = 60$) than suspended nasospheroids without Matrigel (Supplementary Fig. S3). The AUC was calculated for each nasospheroid (see *Methods*) and confirmed no significant differences between C1 and C2 FSK-trajectories ($p = 0.5205$; $t = 60$ min; t-test) (results of slopes are shown in Supplementary Information). FSK-induced shrinking in nasospheroids was reverted when CFTR inhibitor was added (Supplementary Fig. S4). This indicates that changes observed are depending on CFTR fluid transport.

Comparison of GraphPad Prism statistical results with a newly developed logarithmic model. Statistical results were obtained by GraphPad Prism software that is widely used for scientist statistical experiments. However, we established a new model with logarithmically transformed measurements without size-adjustments (see *Methods*) to validate results obtained with GraphPad Prism. We then compared results obtained after studying WT nasospheroids by both C1 and C2 with different stimulation (vehicle administration DMSO or FSK). Results were in concordance. Statistical information and values written in *Results* were conducted using GraphPad Prism software. Results obtained with the logarithmic model are included as Supplementary Information. Whilst the logarithmic model allows detailed resolution in significance of the test (p value), GraphPad Prism approximates the p value when the sample is large (more than 100 values)³³.

Because we did not report statistical differences between C1 and C2 in FSK responses, we combined results from both WT nasospheroids for the next studies.

Time and response variability after CFTR activation in WT nasospheroids. A total of 288 nasospheroids from seven non-CF patients were analyzed: 110 with DMSO and 178 in presence of FSK. Differences between vehicle and FSK were observed at minute 10 after the administration of the compounds, and response continued up to 60 min when experiments were completed (FR, and AUC $****p < 0.0001$ t-test) (Fig. 1b) (results of slopes are shown in Supplementary Information). These differences increased over time ($t = 10$ min $p = 0.008$, $t = 35$ min $p = 0.0004$, $t = 70$ min $p = 0.0002$) and were more clearly captured using the model with logarithmically transformed measurements than with GraphPad Prism (see *Methods*).

Analysis of WT nasospheroids after CFTR activation by FSK differentiated responders and non-responders according to shrinking (Fig. 2a). Classification was based on FR values at $t = 60$ min: nasospheroids presenting $FR > 1$ were considered *non-responders* while those with $FR \leq 1$ were defined as *responders*. From the 178 FSK-stimulated nasospheroids, we finally studied 173 from the seven WT subjects. We determined that $\approx 80\%$ (135/173) were FSK-responders (Fig. 2b). We categorized responders depending on FR values. Nasospheroids with an FR below the WT mean ($FR < 0.803$) were considered high responders. Thus, we observed a reduction in area $\geq 20\%$ of their initial size. Following this criterion, 67 of 135 (49.63%) responders were categorized as high responders and 68/135 (50.37%) were classified as low responders (reduction $< 20\%$ of its initial area). When studying nasospheroids from C1 and C2 separately, C2 showed a slightly higher proportion of non-responders ($\sim 30\%$) in comparison with C1 ($\sim 20\%$).

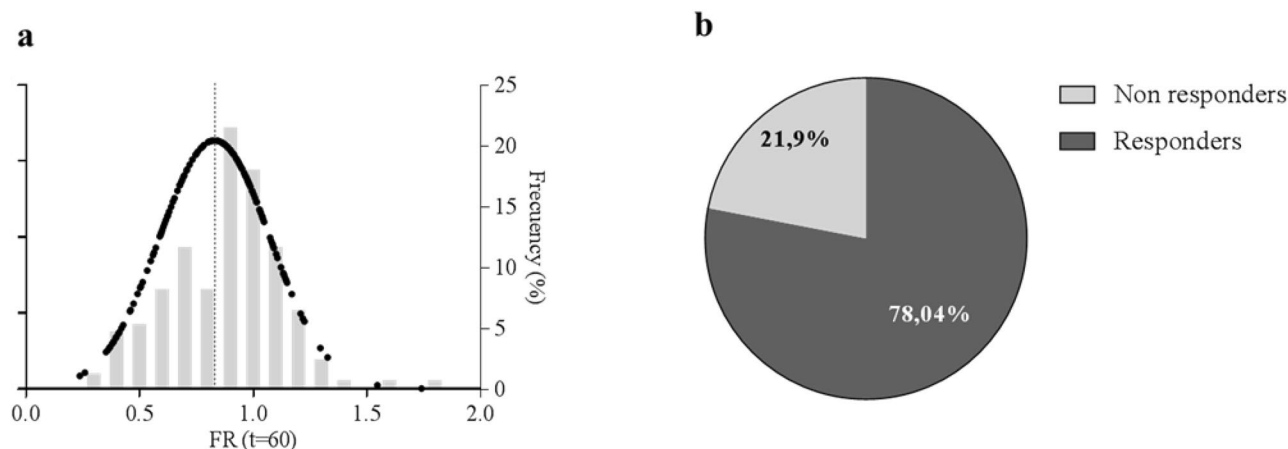


Figure 2. Distribution of FSK responses in WT nasospheroids. **(a)** WT nasospheroids present variability in FR values after 60 min FSK-incubation. Black dots show Gaussian distribution of FR values; right Y axis shows the frequency (%) of FR ranges. Each column represents 0.1 FR interval ranging from 0.2 to 1.7. The dotted line shows WT mean response to FSK (FR = 0.803). **(b)** Distribution of nasospheroids according to their response depending on their FR at t = 60 min. FR ≤ 1 was set for *responders* and FR > 1 for *non-responders*. Graphic created with GraphPad Prism version 6³³.

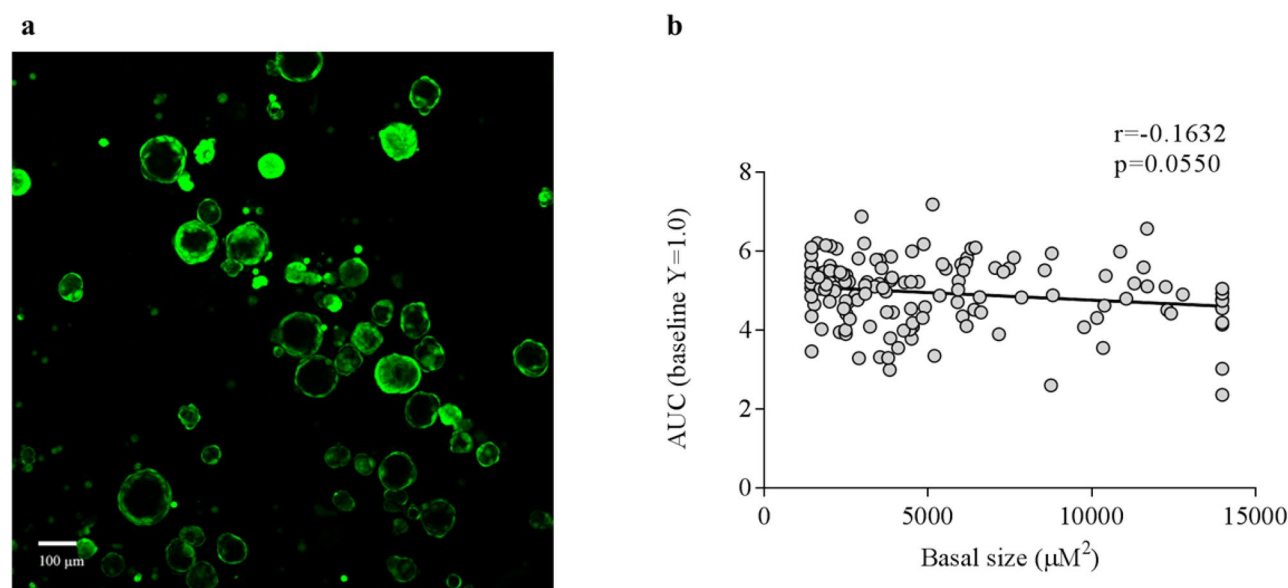


Figure 3. No correlation between basal size of nasospheroids and degree of response after 60 min of FSK incubation. **(a)** Nasospheroids showed diversity basal sizes. **(b)** After excluding non-responders nasospheroids (FR > 1 at t = 60), we matched basal size with AUC values (after CRA analysis). After 60 min of FSK activation in WT nasospheroids, we observed no correlation between the two parameters (basal size and FSK response). Similar results were observed after analysing FR ($r = -0.1216$, $p = 0.1537$) and slopes (results showing slopes of the same experiments are available in Supplementary Information). Results were a combination from spheres grown in conditions 1 and 2. Image taken with confocal microscope LSM780 Zeiss, scale bar created with ImageJ/FIJI³¹ and graphic created with GraphPad Prism version 6³³.

Potentially all spheres are suitable for analysis independently of their baseline size and condition. The degree of the FSK-response in WT may be influenced by the basal size of nasospheroids. The starting size values of nasospheroids were highly variable (Fig. 3a), ranging from 350 to 53,807 μm^2 (mean \pm SD = 7076.762 \pm 6304.907). First, we windsorized the basal size³ values to obtain a more adjusted correlation test. Basal size data was manually windsorized as follows: 5% of the top and 5% of the bottom data was replaced by the maximum or minimum of the values to the nearest extreme. We then performed a Spearman correlation test. In the analysis, we excluded the low proportion of non-responder nasospheroids. After studying 138 nasospheroids, we found no significant correlation when pairing FR values (t = 60 min) and basal sizes ($r = -0.1216$, $p = 0.1537$). We then calculated AUC for each nasospheroid (see *Methods*) (t = 60 min) and showed no statistical

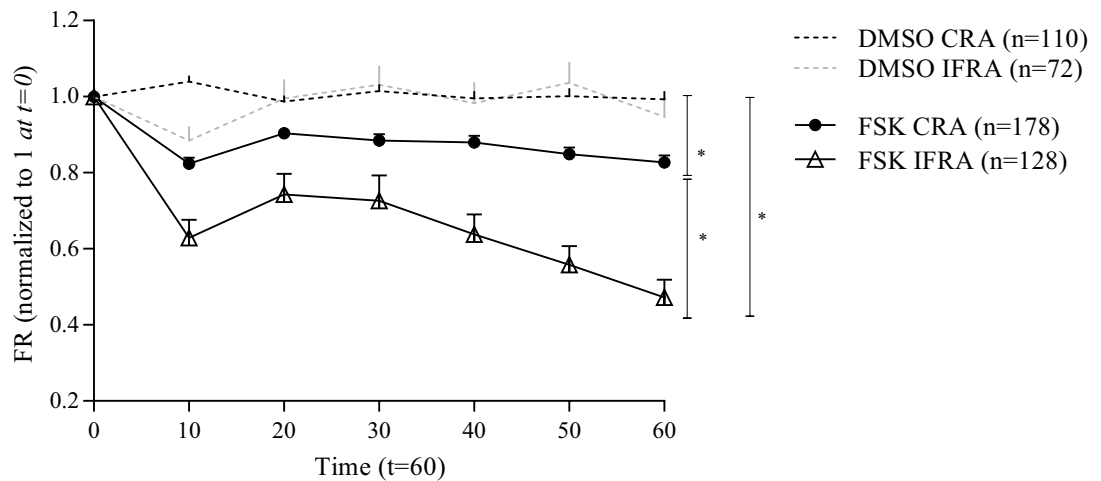


Figure 4. Cross-sectional areas (CRA) and inner fluid reservoir areas (IFRA) analysis of WT nasospheroids from different healthy WT subjects. Spheres were analyzed by live-cell imaging after DMSO or FSK incubation. Dots and triangles show mean FR values up to 60 min. Bars represent SEM. Both CRA and IFRA results present significant differences between the DMSO and the FSK stimulus. T-test also showed statistically different results for CRA and IFRA ($*p=0.0316$; paired t-test). Calculated AUC also showed significant differences between CRA and IFRA trajectories ($***p<0.0001$). Similar results were observed after analysing slopes (results showing slopes of the same experiments are available in Supplementary Information). Results were a combination from spheres grown in conditions 1 and 2. Graphic created with GraphPad Prism version 6³³.

correlation between response and size (AUC $r = -0.1632$, $p = 0.0550$) (Fig. 3b), (results of slopes are shown in Supplementary Information).

Analysis of inner fluid reservoir areas as an effective indicator to study CFTR functionality. When exploring alternative analysis to better evaluate nasospheroid behavior after CFTR stimulation, we observed that *responder* nasospheroids transported fluid from the interior to the media bath, leaving the inner fluid reservoir areas (IFRA) virtually empty in some cases. We then quantitated IFRA of WT nasospheroids after FSK administration up to 60 min. IFRA responders ($FR \leq 1$ at $t = 60$ min), represent almost the 90% of the total samples analyzed ($n = 114/128$). A comparison between CRA and IFRA responses showed a higher percentage of reduction in the inner parts: CRA ($t = 60$ min) = 0.805; IFRA ($t = 60$ min) = 0.473 (Fig. 4) (FR paired t-test $*p = 0.0313$; AUC $***p < 0.0001$ unpaired t-test) (results of slopes are shown in Supplementary Information). Then, we investigated whether IFRA could be more sensitive than CRA to study CFTR functionality and to differentiate CF subjects from the WT group. No basal-size significant differences in IFRA were observed when comparing non-CF and CF nasospheroids ($p = 0.6459$ t-test) (Supplementary Fig. S5a). After FSK treatment, IFRA areas facilitated the recognition of differences between the WT group and CF subjects ($*p = 0.0313$; paired t-test) (Supplementary Fig. S5b). We also assessed the baseline luminal ratio (BLR)³², IFRA:CRA, and significant differences were also observed between WT group and CF group ($*p = 0.0222$ t-test).

Differences in FSK response were also observed between CF patients ($n = 7$) with different genotypes (Table 1). Two patients (CF1 and CF2) sharing the same CF genotype (F508del/2183AA>G) showed differences in CFTR functionality after FSK stimulation (Fig. 5a). The CF1 patient had severe lung disease in clinical assessment (Table 1) and showed almost no shrinkage in comparison with the sample from the CF2 patient, which had milder lung disease (Fig. 5a, Supplementary Fig. S6).

Differential responses of nasospheroids from CF patients after combinatorial treatment of CFTR modulators. To assess the pharmacological restoration of CFTR function in our seven CF subjects, we tested several combinatorial regimens of FSK + CFTR modulators: VX-770 + VX-809 and VX-770 + VX-661. All CF nasospheroids were grown in C1 conditions according to previous results seen in WT samples. After performing three types of data analyses (FR, AUC and slopes) to examine CRA and IFRA we found that some patient samples showed a drug-induced response while others presented similar values in both FSK and VX-treated conditions (Fig. 5b, c, Fig. 6, Table 1, Supplementary Fig. S6). In patient CF6 (F508del/F508del) nasospheroids decreased in size after treatment but a statistically significant VX-770 + VX-809 response was only seen after IFRA assessment (FR values $*p = 0.0170$, AUC $*p = 0.0105$ in comparison to FSK-treated nasospheroids) (Fig. 5b, Supplementary Fig. S6).

Discussion

Here, we validated and explored the reproducibility of a functional CFTR assay in nasospheroids³⁰, studying seven WT subjects and seven CF patients presenting a variety of genotypes and phenotypes. We performed a series of modifications and changes aiming to improve the accuracy of the protocol and the following analysis. First, we made technical adjustments to increase the number of observations (n) for statistical power. Second, we

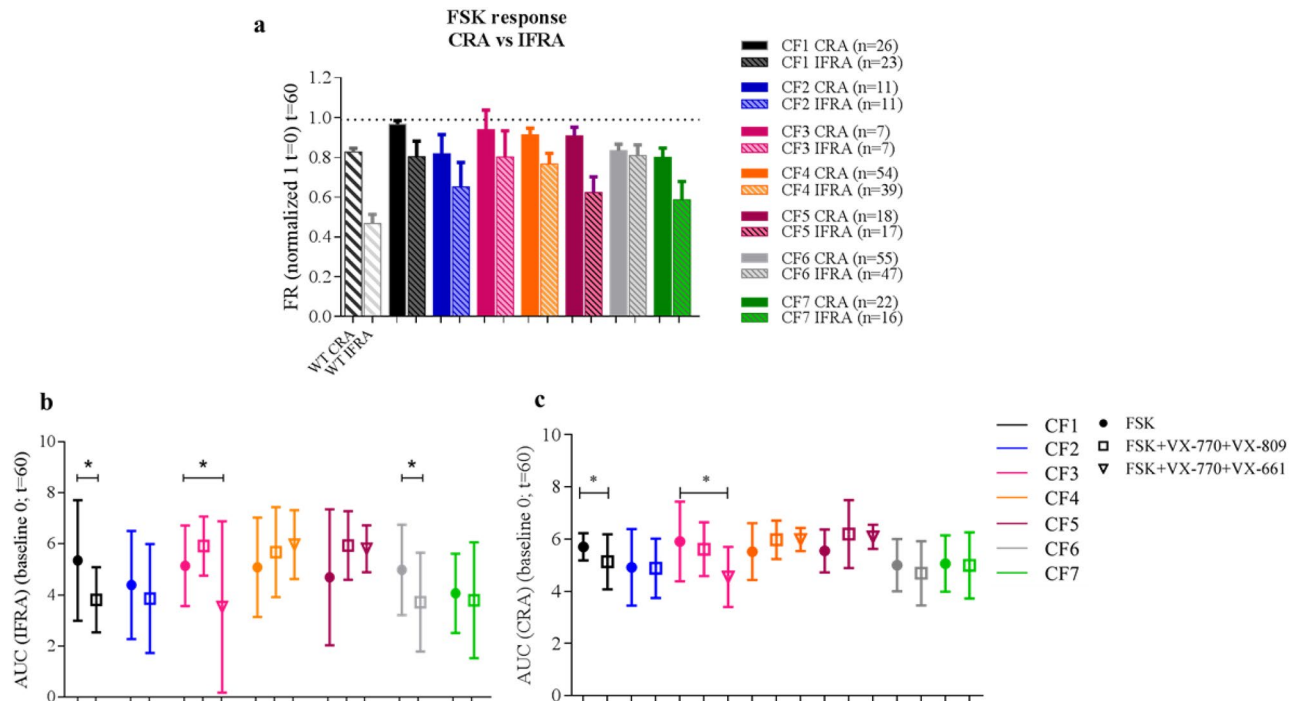


Figure 5. Inner fluid reservoir areas are more sensitive to categorize between healthy and CF responses after FSK-incubation. Both CRA and IFRA areas were studied in WT and CF subjects after 60 min following FSK-incubation. Each CF subject is represented by a different color. All CF nasospheroids were grown under condition 1. **(a)** CRA and IFRA DMSO CF values ($t = 60$) are represented by a dotted line. CF1 and CF2 unrelated patients share the same genotype (F508del/2183AA>G) but show significant different FSK responses ($****p < 0.0001$) in IFRA analysis. Columns of CF patients represent mean FR values. Bars represent SEM. AUC values after IFRA **(b)** and CRA **(c)** assessment were determined by GraphPad Prism (baseline $Y = 0$) at $t = 60$ min. Dots represent mean AUC values from FSK-incubated nasospheroids. Empty squares represent mean AUC values of VX-770 + VX-809-treated nasospheroids. Inverted triangles show mean AUC values from VX-770 + VX-661-treated nasospheroids. Bars represent standard deviation (SD). Significant differences ($p < 0.05$) within VX-treated and FSK-treated nasospheroids are shown. VX-incubation was always combined with FSK, Amiloride and IBMX. Graphic created with GraphPad Prism version 6³³.

performed a wider analysis of nasospheroids (CRA and IFRA, outer and inner part respectively) which helped to categorize the results and observations. And third, we implemented the use of a simple statistical analysis by GraphPad Prism to examine nasospheroids responses. We found that the results of our mixed linear statistic model (without size-adjustment) in comparison with those obtained by GraphPad Prism were the same for both models. In view of this equivalence, the functional assay using nasospheroids could be a more accessible and reproducible approach in research laboratories.

Technical adjustments were explored using WT nasospheroids. By embedding nasospheroids in Matrigel, we avoided the inconvenience of suspension cells running outside the focus during live-cell imaging experiments ($t = 60$ min). This allowed the *in vitro* study of hundreds of nasospheroids formed in a multi-well plate. By immobilizing the nasospheroids in culture, we increased number of cells by up to 20-fold during microscopy studies³⁰. The overall responses were therefore evaluated more categorically. WT nasospheroids were then characterized as responder or non-responder (classified depending on FR results). We determined that the overall frequency of responders was around 80% for each experiment when studying CRA and almost 90% when analysing IFRA. In our hands, we observed that the proportion of non-responders tends to be higher in C2 nasospheroids (~30%) in comparison to C1 nasospheroids (~20%). Although we were not able to observe cilia facing inward in the studied nasospheroids, we cannot discard that some cells could present apical-inside membranes after a prolonged Matrigel-time exposure. However, mean FSK response was not different between both groups. For simplicity, we have grown all CF nasospheroids in C1.

In our analysis, levels of responses were independent of the baseline size of nasospheroids. The previous study³⁰ hypothesized that nasospheroids with similar baseline sizes would show a similar degree of response and should be investigated. According to our results, all spheres were potentially acceptable for analysis. Heterogeneous responses observed in a proportion of our cells might be explained by different CFTR expression levels in nasospheroids of the same individual.

While exploring alternative analysis to CRA, we performed measurements of inner areas, which we found to be more sensitive than the CRA to discriminate between WT and CF FSK-responses. In our model, nasospheroids grow with the luminal surface facing outward and shrink following CFTR activation. Brewington and colleagues reported the analysis of inner areas in another nasal spheroid model that swell after FSK-stimulation³⁵. Dekkers

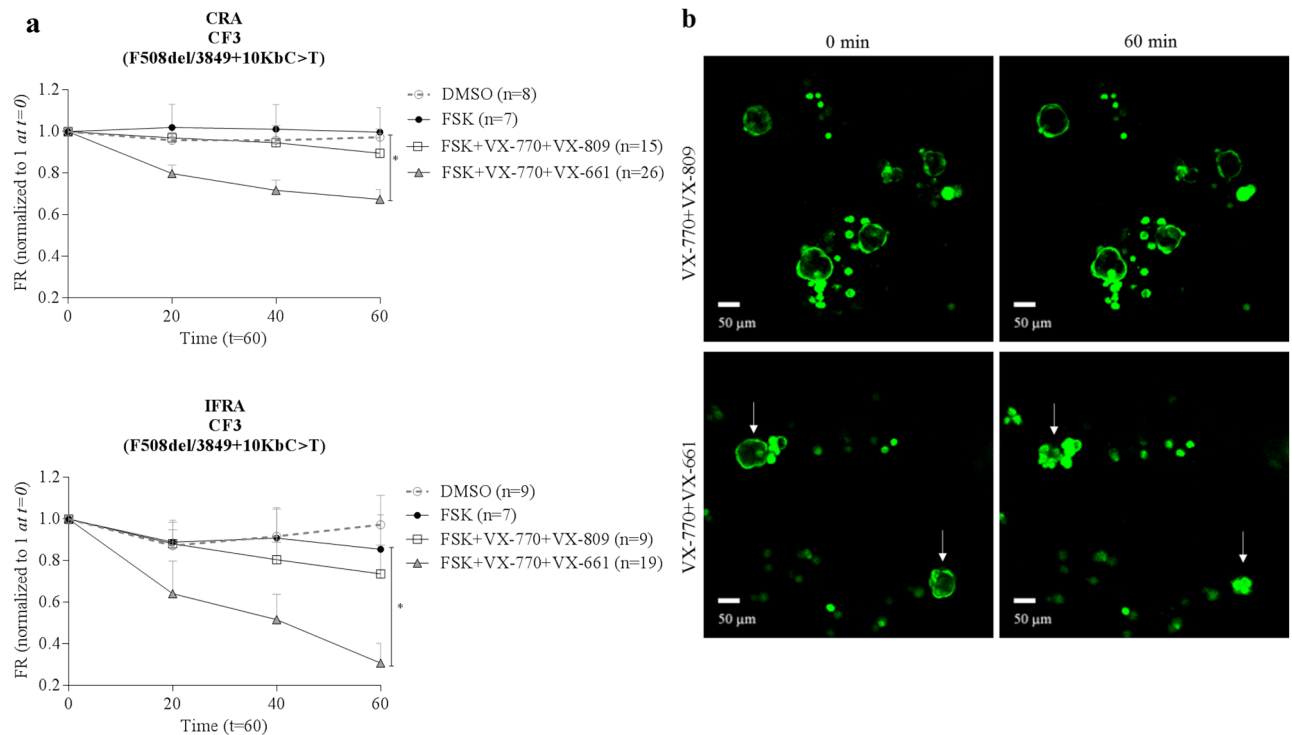


Figure 6. Pharmacological response in nasospheroids from patient CF3. **(a,b)** Patient CF3, presenting F508del/3849 + 10KbC>T genotype, showed no significant differences between FSK and VX-770 + VX-809 administration (CRA $p = 0.2978$, IFRA $p = 0.5848$) after 60 min of follow-up while a significant response was seen in presence of the VX-770 + VX-661 combination in comparison with only FSK (CRA $*p = 0.0104$, IFRA $**p = 0.0047$) **(a,b)**. Bars represent SEM. VX-incubation was always combined with FSK, Amiloride and IBMX. All CF nasospheroids were grown under condition 1. Image taken with confocal microscope LSM780 Zeiss, scale bar created with ImageJ/FIJI³¹ and graphic created with GraphPad Prism version 6³³.

et al. established the analysis of inner parts for analogous CFTR functional studies in intestinal organoids to discern between WT and CFTR phenotypes¹⁹. They reported that organoids from severe CF patients tended to have a more cystic shape and smaller inner areas than those from patients with milder illness and WT subjects. A recent report³² also showed differences in basal lumen size in nasal spheres (with inward apical orientation) between CF and non-CF samples and reported that the BLR value (IFRA:CRA) can distinguish between the WT group and CF group. In our study, we did not find any significant differences between basal inner areas of WT group and CF group but our BLR values indeed showed significant differences. This suggests that BLR may be a useful measure to differentiate CF from WT nasospheroids regardless of the culture condition.

When studying CF patients, we found that not all patient samples showed a drug-induced response, an observation that has been previously reported³⁰. Two CF subjects (CF1 and CF2) who shared the same genotype (F508del/2183AA>G), showed different responses after FSK stimulation. Interestingly, patient CF1, who showed almost no shrinking, had more severe pulmonary disease than patient CF2 (Table 1). In fact, patient CF1 showed the lowest levels of CFTR activation after FSK (Fig. 5a). Differences in CFTR functionality among patients with the same genotype have also been observed after FIS assay using intestinal organoids²¹. These differences should be considered in the context of genomic background or the effect of modifier genes³⁶.

Functional CFTR analysis by nasospheroids was also effective to determine the effect of in vitro treatment using a combination of CFTR modulators. We treated nasospheroids from seven CF patients with the combination VX-770 + VX-809, approved by the FDA³⁷ and the EMA³⁸, for patients with specific CFTR genotypes. In addition, we studied several patients who were possibly in vitro responders to the VX-770 + VX-661 combination also approved by FDA and EMA^{9,39,40}. An interesting example was patient CF3 (F508del/3849 + 10KbC>T), who showed a significant response to VX-770 + VX-661 (FR, $*p = 0.0104$ CRA analysis; $**p = 0.0047$ IFRA analysis) but not to VX-770 + VX-809 (FR, $p = 0.2978$ CRA analysis; $p = 0.5848$ IFRA analysis) (see Fig. 6). This result is consistent with the current approved genotype indication of VX-770 + VX-661 (SYMDEKO/SYMKEVI) for patients carrying variants such as our CF3 patient⁹. Correlations between in vitro results in treated nasospheroids and in vivo clinical improvements might be necessary to predict individual responses.

For a systematic analysis of the response to CFTR modulators, we used three variables (FR, AUC and slopes) and two different areas of study (CRA and IFRA). Results between the three variables were equivalent; showing similarities when determining which patients present a significant drug-induced volume reduction. In comparison with slopes, AUC analysis offers the advantage of not assuming linear responses³⁰. AUC values are commonly used in analogous CF in vitro assays using intestinal organoids¹⁷ and may be of interest to compare results of a given sample that can be obtained with both methods (organoids and nasospheroids).

In some CF samples we found differences between the results of CRA and IFRA. For example, CF6 with an F508del/F508del, a genotype that usually responds to VX-770 + VX-809 (ORKAMBI)^{41–43}, only showed an in vitro significant response when analysing FR and AUC in IFRA trajectories. Thus, the study of inner areas, which show a wider range of shrinking than CRA, may result in a more robust categorization of doubtful cases.

Future studies using nasospheroids may include an extended time for live-cell observations in some cases with rare CF genotypes^{44,45} and testing of recently approved modulator drugs, such TRIKAFTA/KAFTRIO⁴⁶.

The present modifications of the protocol help to improve the applications of nasospheroids to perform functional CFTR studies. This technique, however, is not without disadvantages. Differentiated nasal cells do not duplicate once nasospheroids are fully formed. Thus, the number of structures obtained is limited. Additionally, nasospheroids do not recapitulate in vivo structures, as they are an artificial product formed in culture. Very recently, a more complex protocol using epithelial nasal cells was described as a potential tool to study CFTR³² reinforcing the inherent value of nasal epithelium in the study of CF disease. Moreover, it has been showed that in vitro nasal cells can recapitulate functional CFTR characteristics of in vitro bronchial cells for individualized CFTR analysis²⁵. Nasal models present the advantage of enable the study of CFTR airway functionality in an easily accessible sample, unlike bronchial epithelial models.

In conclusion, we present a series of modifications and improvements to measure CFTR functionality in nasospheroids. This simple and affordable, non-invasive approach provides CFTR read-out within a week. Our data indicates that this improved method can be used as an initial or complementary tool to define CFTR airway epithelial function and to predict which patients will respond to modulator therapy.

Data availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

Received: 28 January 2021; Accepted: 5 July 2021

Published online: 30 July 2021

References

- Kerem, B. *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**, 1073–1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460> (1989).
- Cystic Fibrosis Mutation Database*, <<http://www.genet.sickkids.on.ca/>> (April 25, 2011).
- De Boeck, K. & Amaral, M. D. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir. Med.* **4**, 662–674. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(16)00023-0) (2016).
- Van Goor, F. *et al.* Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 18843–18848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105787108> (2011).
- Vertex. *Vertex and Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics to collaborate on discovery and development of new medicines to treat the underlying cause of cystic fibrosis* <<http://investors.vrtx.com/releasedetail.cfm?releaseid=563453>> (April 7, 2011).
- Van Goor, F. *et al.* Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 18825–18830. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904709106> (2009).
- Egan, M. E. Cystic fibrosis transmembrane conductance receptor modulator therapy in cystic fibrosis, an update. *Curr. Opin. Pediatr.* **32**, 384–388. <https://doi.org/10.1097/mop.0000000000000892> (2020).
- EMA. *EMA-001582-PIP01-13-M09*, <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/paediatric-investigation-plans/ema-001582-pip01-13-m09>> (2020).
- EMA. *SYMKEVI*, <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/symkevi-0>> (2020).
- Pharmaceuticals, V. Vertex Announces FDA Approvals of TRIKAFTA (elixacaftor/tezacaftor/ivacaftor and ivacaftor), SYMDEKO (tezacaftor/ivacaftor and ivacaftor) and KALYDECO (ivacaftor) for Use in People With CF With Certain Rare Mutations. (Dec 21, 2020).
- Taylor-Cousar, J. L. *et al.* Lumacaftor/ivacaftor in patients with cystic fibrosis and advanced lung disease homozygous for F508del-CFTR. *J. Cyst. Fibros.* **17**, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.09.012> (2018).
- McNamara, J. J. *et al.* Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of lumacaftor and ivacaftor combination therapy in children aged 2–5 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: an open-label phase 3 study. *Lancet Respir. Med.* **7**, 325–335. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(18\)30460-0](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(18)30460-0) (2019).
- Walker, S. *et al.* A phase 3 study of tezacaftor in combination with ivacaftor in children aged 6 through 11 years with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **18**, 708–713. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.06.009> (2019).
- FDA. *Drug Approval Package: TRIKAFTA*, <https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212273Orig1s000TOC.cfm> (November 25, 2019).
- Heijerman, H. G. M. *et al.* Efficacy and safety of the elixacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* **394**, 1940–1948. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32597-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32597-8) (2019).
- Middleton, P. G. *et al.* Elixacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N. Engl. J. Med.* **381**, 1809–1819. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908639> (2019).
- Dekkers, J. F. *et al.* A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat. Med.* **19**, 939–945. <https://doi.org/10.1038/nm.3201> (2013).
- Clancy, J. P. *et al.* CFTR modulator therotyping: Current status, gaps and future directions. *J. Cyst. Fibros.* **18**, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.05.004> (2019).
- Dekkers, J. F. *et al.* Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **8**, 344–384. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8278> (2016).
- de Winter-de Groot, K. M., Janssens, H. M. & van Uum, R. T. Stratifying infants with cystic fibrosis for disease severity using intestinal organoid swelling as a biomarker of CFTR function. *Eur Respir J* <https://doi.org/10.1183/13993003.02529-2017> (2018).
- de Winter-de Groot, K. M. *et al.* Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations. *J. Cyst. Fibros.* <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.10.022> (2019).
- Berkers, G. *et al.* Rectal organoids enable personalized treatment of cystic fibrosis. *Cell Rep.* **26**, 1701–1708.e1703. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.068> (2019).
- Pedersen, P. S., Frederiksen, O., Holstein-Rathlou, N. H., Larsen, P. L. & Qvortrup, K. Ion transport in epithelial spheroids derived from human airway cells. *Am. J. Physiol.* **276**, L75–80. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1999.276.1.L75> (1999).

24. Wiszniewski, L. *et al.* Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**, 39–48. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0161OC> (2006).
25. Brewington, J. J. *et al.* Brushed nasal epithelial cells are a surrogate for bronchial epithelial CFTR studies. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99385> (2018).
26. Awatade, N. T. *et al.* Human primary epithelial cell models: promising tools in the era of cystic fibrosis personalized medicine. *Front. Pharmacol.* **9**, 1429. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01429> (2018).
27. Sachs, N. *et al.* Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EmBO J.* <https://doi.org/10.15252/embj.2018100300> (2019).
28. Lee, R. E. *et al.* Assessing human airway epithelial progenitor cells for cystic fibrosis cell therapy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **63**, 374–385. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0384OC> (2020).
29. Brewington, J. J. *et al.* Detection of CFTR function and modulation in primary human nasal cell spheroids. *J. Cyst. Fibros.* **17**, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.010> (2018).
30. Guimbellot, J. S. *et al.* Nasospheroids permit measurements of CFTR-dependent fluid transport. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95734> (2017).
31. *Fiji ImageJ*, <<https://imagej.net/Fiji>> (January 24, 2020).
32. Liu, Z. *et al.* Human nasal epithelial organoids for therapeutic development in cystic fibrosis. *Genes (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/genes11060603> (2020).
33. *GraphPad Prism*, <<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>> (2020).
34. Bland, J. M. & Altman, D. G. Transformations, means, and confidence intervals. *BMJ* **312**, 1079. <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7038.1079> (1996).
35. Brewington, J. J. *et al.* Generation of human nasal epithelial cell spheroids for individualized cystic fibrosis transmembrane conductance regulator study. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/57492> (2018).
36. Knowles, M. R. & Drumm, M. The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a009548. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009548> (2012).
37. Vertex. *FDA approves ORKAMBI (lumacaftor/ivacaftor) as first medicine to treat the underlying cause of cystic fibrosis for children ages 2–5 years with most common form of the disease*, <<https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/fda-approves-orkambi-lumacaftorivacaftor-first-medicine-treat>> (August 7, 2018).
38. EMA. *ORKAMBI*, <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orkambi>> (2020).
39. Taylor-Cousar, J. L. *et al.* Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2013–2023. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709846> (2017).
40. CFF. *FDA Approves Expansion of Modulators for People With Certain Rare Mutations*, <<https://www.cff.org/News/News-Archive/2020/FDA-Approves-Expansion-of-Modulators-for-People-With-Certain-Rare-Mutations/>> (Dec 21, 2020).
41. Boyle, M. P. *et al.* A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a Phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **2**, 527–538. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(14\)70132-8](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(14)70132-8) (2014).
42. Wainwright, C. E. *et al.* Lumacaftor-Ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* **373**, 220–231. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409547> (2015).
43. Konstan, M. W. *et al.* Assessment of safety and efficacy of long-term treatment with combination lumacaftor and ivacaftor therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation (PROGRESS): a phase 3, extension study. *Lancet Respir. Med.* **5**, 107–118. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(16\)30427-1](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(16)30427-1) (2017).
44. Crawford, D. K. *et al.* Targeting G542X CFTR nonsense alleles with ELX-02 restores CFTR function in human-derived intestinal organoids. *J. Cyst. Fibros.* <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.01.009> (2021).
45. McHugh, D. R. *et al.* A G542X cystic fibrosis mouse model for examining nonsense mutation directed therapies. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199573> (2018).
46. Anderson, J. D., Liu, Z., Odom, L. V., Kersh, L. & Guimbellot, J. S. CFTR Function and clinical response to modulators parallel nasal epithelial organoid swelling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajplung.00639.2020> (2021).

Acknowledgements

We thank Laura Garriga for assistance during cell brushings, Marta Valeri for help setting up the live-cell microscopy conditions and confocal microscopy images, Anna Lladó and Lidia Bardia for their support with live-cell microscopy studies, Llorenç Badiella for designing the personalized statistical model, Llorenç Badiella and Sandra Cobo for performing the statistical analysis using the personalized statistical model, and Carolyn Newey for revision of our manuscript.

Author contributions

M.C., S.G. and E.F.T. designed the experiments and analyzed data. M.C. and R.G.P. performed the experiments. R.G.P. and P.B. helped with the analysis. S.G. selected patients and performed cell brushings. S.G. classified patients according to clinical manifestations. P.F.-A. performed *CFTR* mutation analysis. M.C., E.F.T. and S.G. wrote the manuscript. All authors contributed to the final critical revision of the manuscript.

Funding

This work was supported by a grant from Fundació Mutua Madrileña (Rare disorders, MM/XIV/RECERCA/2017/TIZZANO) to E.F.T. and Fundació Arcadi to S.G. and supporting M.C. and P.B.; M.C. was partially supported by Fundació Daniel Bravo Andreu.

Competing interests

S.G. reports personal fees for participation in advisory boards and speaking activities from Vertex Pharmaceuticals. The remaining authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94798-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to E.F.T.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Online Supplementary Information

Validation of nasospheroids to assay CFTR functionality and modulator responses in cystic fibrosis

Maite Calucho, Silvia Gartner, Paula Barranco, Paula Fernández-Álvarez, Raquel García Pérez, Eduardo F. Tizzano

Supplementary Results

Logarithmic Model

Supplementary Table S2 shows the variables included in the logarithmic model. Applying the initial logarithmic model (see **Supplementary Table S3**), statistical differences were found between stimulus FSK and DMSO ($p=0.0047$), and stimulus through time “Stimulus:T” ($p=0.0001$). No statistical differences were found when comparing measures of conditions C1 and C2 ($p=0.4684$) and neither “Condition:T” ($p=0.8892$). Then, the variable “Condition” was eliminated from the initial model (see **Supplementary Table S2 and S3**). When removed “Condition” from the model, differences between “Stimulus” and “Stimulus:T” were maintained statistically different ($p=0.0053$; $p=0.0001$).

When studying the logarithmically transformed relative growth (“Y2”) (see **Supplementary Table S3**), statistical differences were found between “Stimulus” and “Stimulus:T” ($p=0.0009$, 0.0216). No statistical differences were found between “Condition” and “Condition:T” ($p=0.4456$, $p=0.5196$). Then, variable “Condition” was eliminated from the model (see **Supplementary Table S3**). Again, statistical differences were observed between “Stimulus” and “Stimulus:T” ($p=0.0008$, $p=0.0204$) and those increase over time ($p=0.0087$, $t=10$, $p=0.0004$ $t=35$ and $p=0.0002$ $t=70$).

Section “Formation and embedding of nasospheroids for in vivo imaging analysis”

Slopes were calculated for each nasospheroid and confirm no significant differences between C1 and C2 FSK-trajectories ($p=0.1297$ t-test; $t=60$ minutes).

Section “Time and response variability after CFTR activation in WT nasospheroids”

We observed statistically differences in slopes between DMSO and forskolin administration in WT nasospheroids (slopes $p<0.0001$ t-test; $t=60$ minutes).

Section “Potentially all spheres are suitable for analysis independently of their baseline size”

We calculated slopes for each nasospheroid ($t=60$ minutes) and showed no statistical correlation between response and basal size ($r=0.04124$, $p=0.6298$).

Section “Analysis of inner fluid reservoir areas as an effective indicator to study CFTR functionality”

IFRA slopes after FSK in WT nasospheroids showed a higher reduction in comparison with CRA analysis ($p < 0.0001$ t-test; $t = 60$ minutes).

Supplementary Table S1. Classification of CFTR pathogenic variants in classes I to VII, their consequences in the CFTR protein and potential therapies.

CFTR mutation class	Defect in CFTR protein	Therapeutic strategy
Class I	No protein synthesis. mRNA is often degraded	Read-through compounds
Class II	Protein is retained in the endoplasmic reticulum and is not transported to the apical membrane	Modulators (correctors and potentiators)
Class III	Impaired channel gating. Reduced channel opening probability	Modulators (potentiators)
Class IV	Changes in protein structure producing low chloride conduction	Modulators (potentiators)
Class V	Reduced levels of normal protein, often due to alternative splicing. Splicing produces both normal and aberrant CFTR	Modulators (correctors)
Class VI	Protein instability in the apical membrane leading to rapid CFTR removal	Stabilizers
Class VII	Gene deletion. No CFTR production	Gene therapy

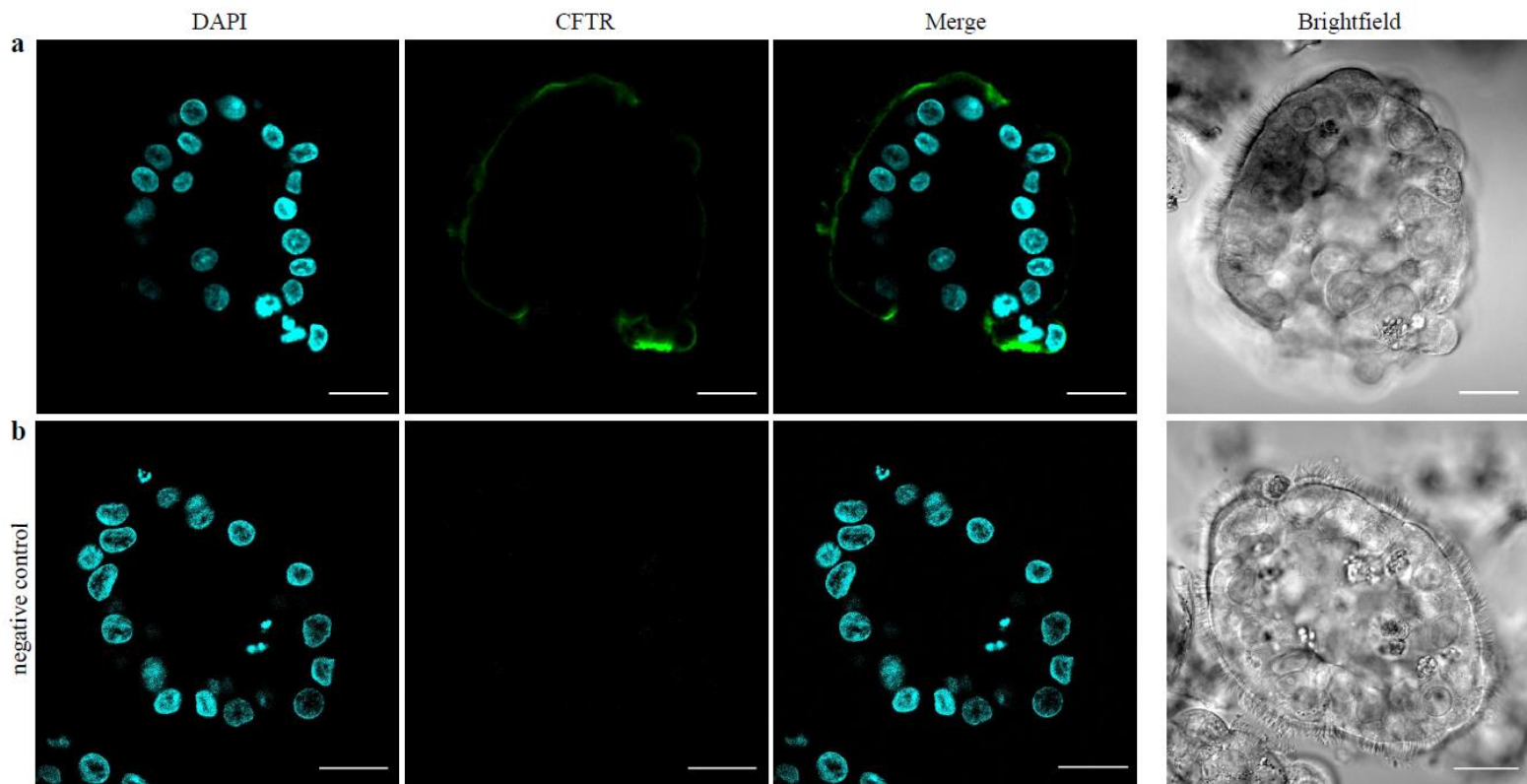
Supplementary Table S2. This table shows the two main variables (explanatory and response) and subvariables within the two groups that are included in the mixed-linear logarithmic model used to study the area of WT nasospheroids. An explanatory variable is a type of independent variable. A response variable is the focus of a question in the experiment.

Explanatory variables	ID	Individual
	ID BLOC	Consistent replication of a set of nasospheroids
	ID nasospheroids	Individual identification of nasospheroids
	T	Time points (t0, t10, t20, t30, t40, t50, t60)
	Stimulus	Stimulus applied to each sample (DMSO or FSK)
	COND	Cell culture condition (<i>Condition 1</i> or <i>Condition 2</i>)
Response variables	Measure	The value of the measures (μm^2)
	Y	Values of the measure logarithmically transformed: $\log(\text{measure})$
	Relative growth (MR)	Ratio of measure between basal measure: $\text{measure}/\text{initial measure}$
	Y2	Logarithmic of MR: $\log(\text{measure}/\text{initial measure})$

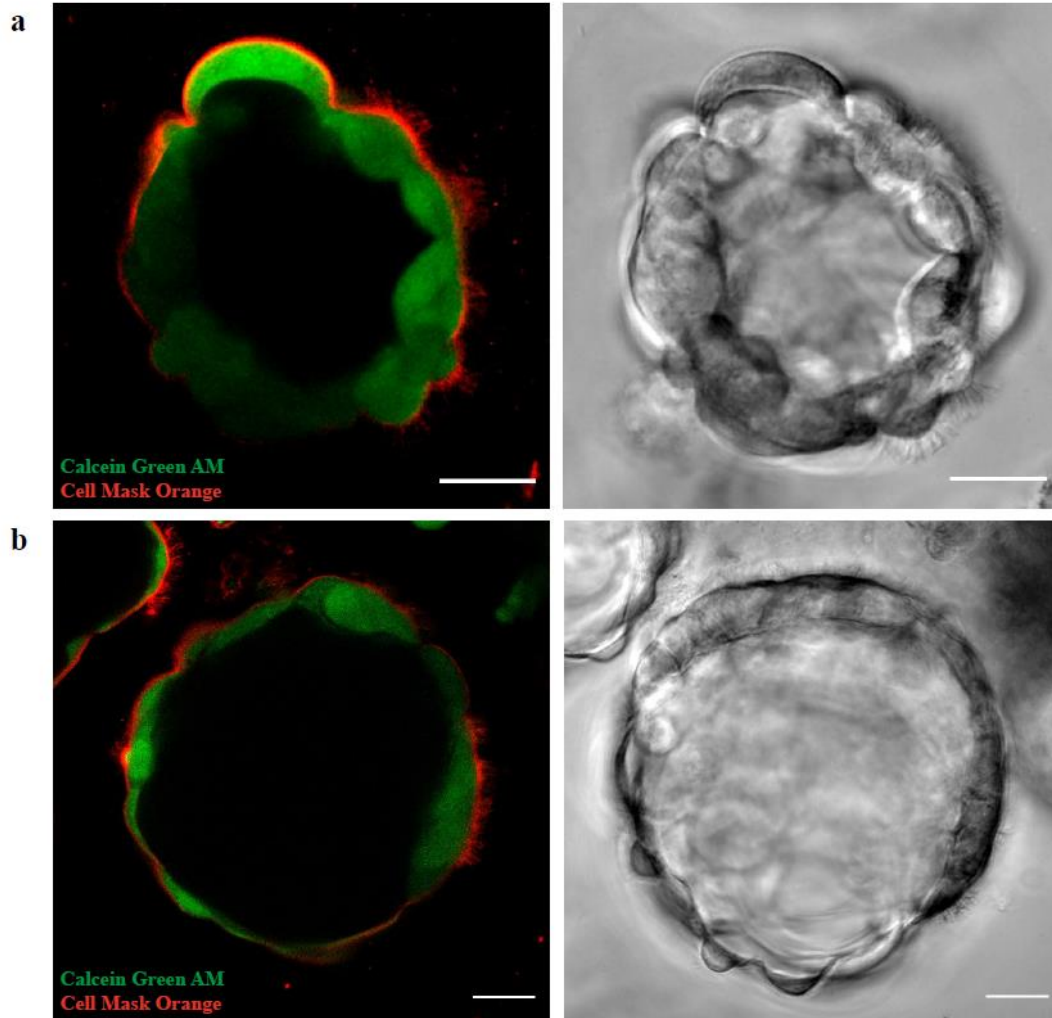
Supplementary Table S3. This table presents the logarithmic model with formulas and variations used to study the area of WT nasospheroids. The logarithmic model was specifically designed for our study to analyze the area of WT nasospheroids through time. Several model structures were explored to analyze the variation of areas through time. Statistical analysis was carried out using SAS v9.4 and R software v3.1.2.

Initial model	<code>m0 <- lmer (Y ~ STIMULUS + COND + T + STIMULUS:T + COND:T + (T ID:BLOC), data)</code>
Initial model without variable “COND”	<code>m0 <- lmer (Y ~ STIMULUS + T + STIMULUS:T + (T ID:BLOC), data)</code>
Y2 model	<code>m01 <- lmer (Y2 ~ STIMULUS + COND + T + STIMULUS:T + COND:T + (T-1 ID) + (T ID:BLOC), data[data\$T>0,])</code>
Y2 model without variable “COND”	<code>m11 <- lmer (Y2 ~ STIMULUS + T + STIMULUS:T + (T- 1 ID) + (T ID:BLOC), data[data\$T>0,])</code>

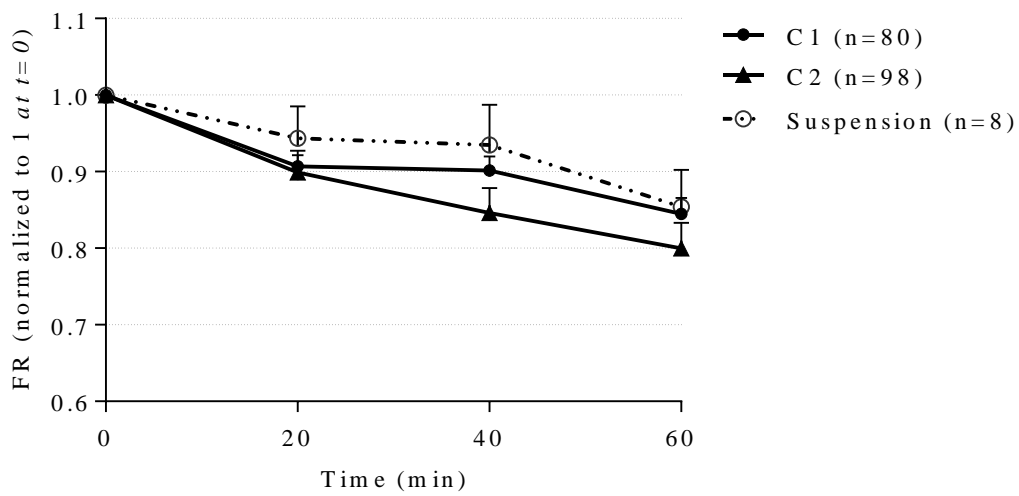
Supplementary Figure S1. Confocal microscopy images of CFTR detection in suspended WT nasospheroids. After 7-8 days of cell culture, WT nasospheroids were fixed with paraformaldehyde (PFA) (4°C, 45 min)². **(a)** Primary antibody Anti-CFTR (MAB1660-SP; R&D Systems) was incubated O/N, 4°C at 1:10 concentration³. Secondary antibody used was Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (115-545-003; Jackson Immuno Research) diluted 1:500 and incubated 3 hours at 4°C. DAPI (D1306; ThermoFisher) was used at 1:1000 to stain the nucleus. Cells were mounted in 8-wells chambers (iBidi) with fructose-glycerol clearing solution². **(b)** The same protocol was followed for the negative control but without incubation of primary antibody anti-CFTR. Images show one z-stack and were taken by a confocal microscope. Scale bars: 20 µm.



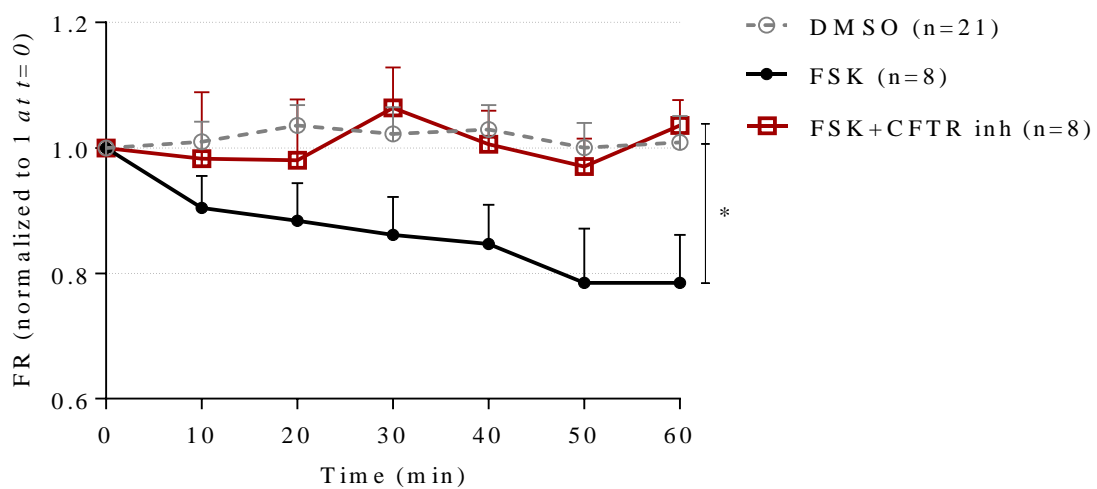
Supplementary Figure S2. WT nasospheroids embedded in Matrigel under C1 and C2 present cilia facing outside. Right panel shows non-fixed C1 (a) and C2 (b) WT nasospheroids stained with Cell Mask Orange 1X (red; cilia and plasma membrane) and Calcein Green AM 8 μ M (green; live cells)¹ and left panel shows brightfield. Images show one z-stack and were taken by a confocal microscope. Scale bars: 20 μ m.



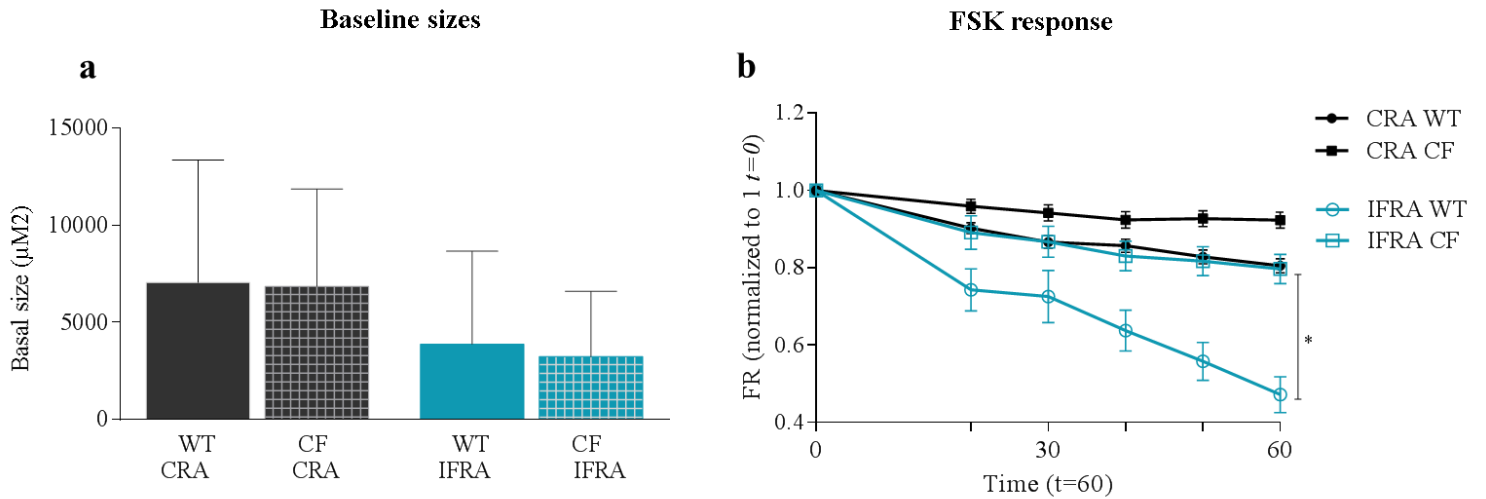
Supplementary Figure S3. WT nasospheroids in suspension present similar values than WT nasospheroids embedded in Matrigel after FSK treatment. WT nasospheroids from two WT individuals grown in suspension and never embedded in Matrigel. After 8 days in culture, cells were collected, centrifuged (400 g, 5 min) and seeded in black 24 well plates. Cells were incubated with FSK, IBMX and Amiloride as described in the article. No significant differences were reported after 60 minutes of FSK treatment between suspension nasospheroids and Matrigel-embedded nasospheroids (C1 and C2) ($p=0.9839$, $p=0.5138$; t-test).



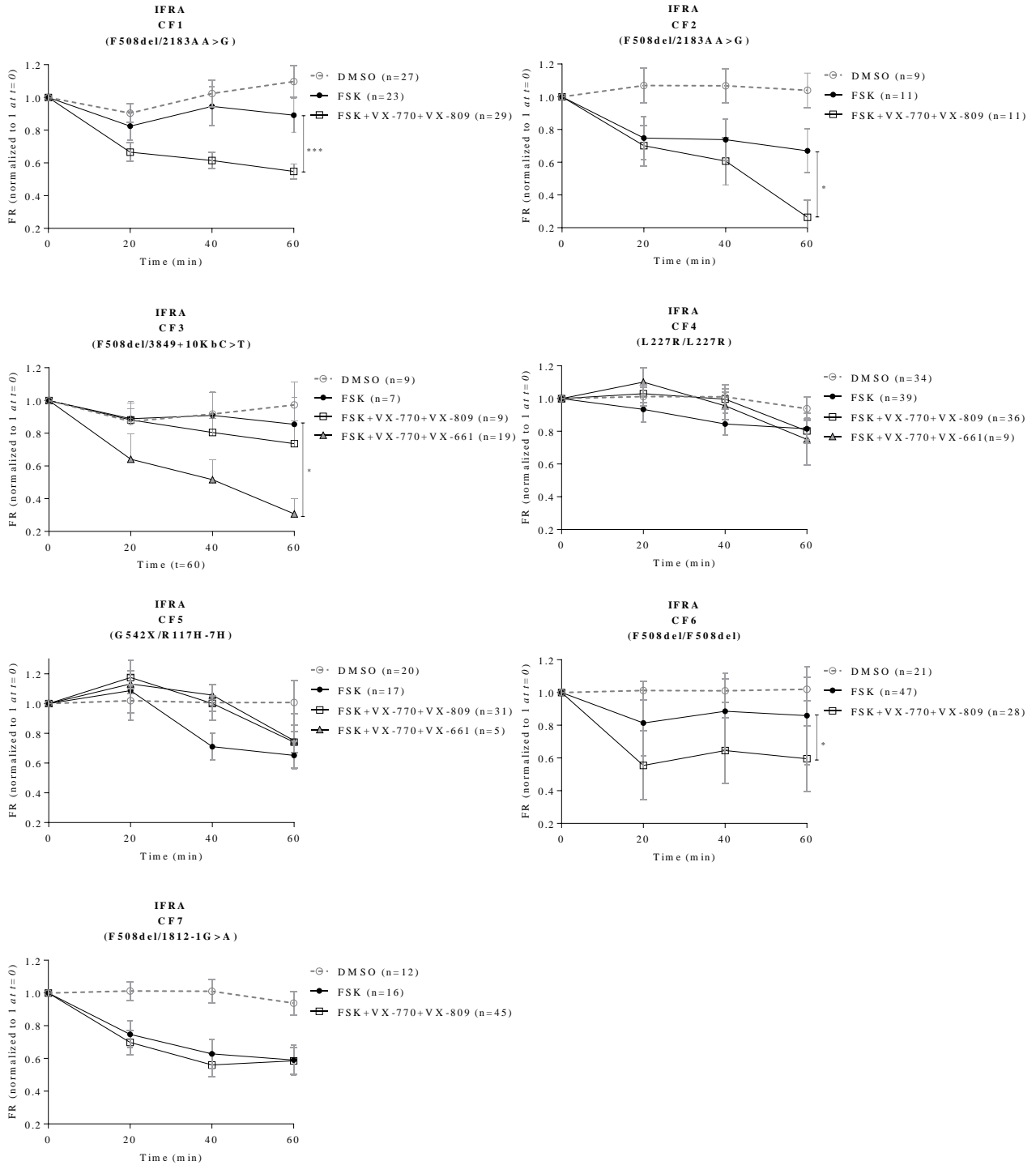
Supplementary Figure S4. WT nasospheroids revert shrinking when are treated with FSK plus CFTR inhibitor. Nasospheroids from one healthy WT were grown in suspension and embedded in Matrigel the day before the live-cell imaging (C1). WT nasospheroids are shown to respond to FSK after 60 minutes of live-cell imaging observations and shrinking is reverted when 10 μ M CFTR inhibitor-172 was incubated (3 hours) prior to FSK, Amiloride and IBMX (FSK vs CFTR inhibitor *p=0.0313 paired t-test).¹ Bars represent SEM.



Supplementary Figure S5. CRA and IFRA sizes in WT group and CF group. **(a)** No basal-size differences were seen between nasospheroids from WT group and CF group (CRA $p=0.2443$, IFRA $p=0.6459$; t-test). Columns represent mean basal sizes and bars represent SD. **(b)** After FSK treatment, IFRA analysis is more sensitive to differ between WT and CF group (CRA $p=0.0625$, IFRA $*p=0.0313$; paired t-test). Bars represent SEM. All CF nasospheroids were grown under condition 1.



Supplementary Figure S6. IFRA analysis in nasospheroids from seven CF subjects treated with FSK alone and FSK+modulators (VX-770+VX-809 and VX-770+VX-661). FR mean values every 10 minutes and over 60 minutes are represented by dots, squares or triangles. VX-incubation was always combined with FSK, Amiloride and IBMX. Bars represent SEM. All CF nasospheroids were grown under condition 1.



Supplementary Video S1. WT nasospheroid embedded in Matrigel under C1 showing cilia facing outside. Images were taken consecutively by a confocal microscope every one second up to one minute. The video is created with ImageJ/FIJI by combining all the images at 7fps frame rate. Video shows one z-stack. Scale bar: 20 μm .

Supplementary Video S2. WT nasospheroid embedded in Matrigel under C2 showing cilia facing outside. Images were taken consecutively by a confocal microscope every one second up to one minute. The video is created with ImageJ/FIJI by combining all the images at 7fps frame rate. Video shows one z-stack. Scale bar: 20 μm .

References Online Supplementary Information

- 1 Guimbellot, J. S. *et al.* Nasospheroids permit measurements of CFTR-dependent fluid transport. *JCI Insight* **2**, doi:10.1172/jci.insight.95734 (2017).
- 2 Dekkers, J. F. *et al.* High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. **14**, 1756-1771, doi:10.1038/s41596-019-0160-8 (2019).
- 3 Carvalho-Oliveira, I. *et al.* CFTR localization in native airway cells and cell lines expressing wild-type or F508del-CFTR by a panel of different antibodies. *J Histochem Cytochem* **52**, 193-203, doi:10.1177/002215540405200207 (2004).