



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudio de la modulación de los receptores adenosinérgicos como tratamiento complementario en la Fibrosis Quística

Paula Barranco Bartolomé

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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 LA MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS

como tratamiento  
complementario  
en la Fibrosis Quística

---

Tesis Doctoral, 2024  
**Paula Barranco Bartolomé**

---



Tesis Doctoral

Barcelona, 2024

# Estudio de la modulación de los receptores adenosinérgicos como tratamiento complementario en la Fibrosis Quística

Memoria presentada por:

**Paula Barranco Bartolomé**

Para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona

Programa de Genética

## Directores

Dra. Elena García Arumí

Dr. Eduardo F. Tizzano

Dr. Julio C. Castro-Palomino

## Tutora

Dra. Susanna Balcells

## Doctoranda

Paula Barranco Bartolomé



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



Los estudios realizados en esta tesis doctoral han sido financiados por el  
Pla de Doctorats Industrials del Departament de Recerca i Universitats  
de la Generalitat de Catalunya y por la Fundació Arcadi.

*Quan arribi el ball, ballarem.*



## AGRADECIMIENTOS

El camino hasta llegar aquí no ha sido fácil. Estos últimos tres años y medio han estado llenos de obstáculos, tanto a nivel profesional como personal, pero gracias a ellos me llevo grandes lecciones de vida. Una de ellas es que es importante rodearte de buenas personas, y en este sentido creo que he tenido (y tengo) mucha suerte. Sin todas ellas, no hubiese sido posible llegar al final de esta tesis doctoral.

Primero de todo quisiera dar las gracias a mis tres directores, Eduardo, Elena y Julio por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por acompañarme y guiarme durante todo el camino. También quisiera agradecer a Silvia, por tu implicación y por gestionar la participación de los pacientes. Además del aspecto profesional, Eduardo y Silvia, también quisiera daros las gracias por la amabilidad, preocupación y humanidad que me transmitisteis en los momentos que lo he necesitado. Os estoy muy agradecida, de corazón.

Quisiera hacer un especial agradecimiento a todos los participantes de este proyecto, por dar vuestro consentimiento y hacer posible que la investigación biomédica en FQ pueda seguir avanzando.

A mi tutora de la UB, Susanna Balcells, gracias por estar siempre atenta y pendiente, y por celebrar mis avances en este camino.

Maite, mi gran pilar en la primera etapa de esta tesis. Gracias por acogerme tan bien en el grupo, por enseñarme todo lo que sabías acerca de los organoides, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por guiarme en todo momento. Gracias por escuchar mis dramas y por sacarme una sonrisa cuando más la necesitaba. Gracias por tu apoyo incondicional y por ayudarme a levantar cuando el mundo se me puso en contra.

Laia, gracias por ayudarme con los cultivos y durante los ratos interminables en microscopia. Poder contar con alguien como tú, sin duda, hace las cosas mucho más fáciles. Georg, gracias por la confianza depositada en mí. Te deseo mucho ánimo ya que en breves pasarás por lo mismo. A todos y cada uno del grupo de VIH con los he compartido laboratorio: David, Cris, Alba, Nerea, Ana, Judith, Oriol, Aleix, a las recientes incorporaciones (Mireia y Maria) y a los que ya no están (Joan y Sebas) que, junto con Laia y Georg, habéis conseguido crear un ambiente de trabajo genial. Gracias por el buen rollo y por estar siempre disponibles para lo fuera. Me llevo muchas anécdotas y risas que las conservaré con cariño.

David, mi salsero científico favorito. Gracias por la comprensión y por la tranquilidad que transmites en todo momento, especialmente durante el que fue “mi lunes” catastrófico! Estoy segura que sea cual sea tu siguiente destino, tus futuros compañeros y amigos se sentirán muy afortunados de tenerte, como lo estoy yo de ti.

Laura, Anabel, Pamela, Ingrid, Esther, Noelia y Núria, gracias por las risas a la hora de la comida, por solucionarme las mil y una dudas que he tenido a nivel experimental y por animarme en todo momento. Cris, de lupus, gracias también por todas las consultas que te he hecho y que siempre me has resuelto con una gran sonrisa.

Bernat y Pau, el tándem de la primera planta y las últimas caras que siempre veía antes de encerrarme en la sala de cultivos durante horas. Gracias por vuestra alegría y por las confidencias compartidas. Sabéis que esto no se acaba aquí! Yolanda y Tomàs, gracias a los dos por estar ahí siempre que lo he necesitado; por tu comprensión, Yolanda y tu sentido del humor, Tomàs.

Al personal de microscopia, Marta y Cristina, gracias por vuestra ayuda durante los experimentos funcionales y el interés que siempre habéis mostrado.

A todo mi grupo de la uni, gracias por hacer posible esta pequeña gran familia y por seguir apostando por ella, a pesar de que cada uno ha seguido su propio camino. Me siento muy afortunada de teneros a mi lado.

Sandra, Paula, Arnau y Joaquim, gracias por vuestro apoyo incondicional, especialmente estas últimas semanas. Gracias por ayudarme en los momentos de crisis, que no han sido pocos. La “pausa” llega a su fin... así que preparaos para lo que os viene!

Laura, sé que no solo me llevo a una compañera del VHIR, sino también a una compañera de viajes y de clases de salsa. Pero lo más importante, me llevo a una amiga. Gracias por transmitirme siempre tu calma, aunque quizás no seas consciente de ello tienes ese efecto en mí. Te deseo todo lo mejor en tu propia recta final; no me cabe ninguna duda que podrás con ello! Muchos ánimos, y recuerda que siempre que lo necesites puedes contar conmigo.

Alba, Jorge y Carol, gracias por ser mi espacio seguro, mi refugio. Gracias por animarte cuando más lo he necesitado, por saber escuchar y por sacarme una sonrisa en pleno llanto. Esta tesis sin vosotros tampoco hubiera sido posible porque siempre habéis estado ahí y sé que siempre lo estaréis.

Sandra, gracias por ser mi *coach* emocional, mi faro en la tormenta y mi persona vitamina. Gracias por animarte cada día y darme la energía cuando veías que me faltaba. Eres un referente como científica y como amiga. Estoy muy orgullosa de ti.

José María, Fátima y Manolo, gracias por invertir vuestro tiempo y profesionalidad en hacer posible que esta tesis cobre color y cuerpo. No puedo estar más contenta con el resultado. Os estoy muy agradecida.

Por último, a mis padres y a mi hermano, por ser mis pilares ahora y siempre. Gracias por creer en mí sin ninguna duda, por animarme a seguir adelante y por ayudarme a levantarme siempre que lo he necesitado, especialmente en el momento más difícil. No hubiese sido capaz de remontar sin vosotros. Espero que os sintáis orgullosos de mí, como yo lo estoy de vosotros. Os quiero muchísimo.

## RESUMEN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por variantes patogénicas en el gen *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR). La proteína resultante, también llamada CFTR, se expresa en varios tejidos epiteliales y confiere a la FQ un carácter multisistémico, siendo los aparatos respiratorio y digestivo los más afectados. La CFTR actúa como canal de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  tras su activación, iniciada gracias al aumento de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Se han identificado más de 2.000 variantes patogénicas del gen CFTR, las cuales se clasifican en seis grupos (I-VI) según el tipo de alteración que provoca en la expresión y funcionalidad de la proteína. En la actualidad, el uso de fármacos específicos, conocidos como moduladores, ha supuesto un avance importante en el tratamiento de la enfermedad y ha permitido mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por la FQ. Los moduladores son capaces de corregir la conformación de la proteína CFTR y/o potenciar su función. Se ha comprobado que la combinación de estos moduladores también resulta beneficiosa. Desde la aprobación del primer modulador en el 2012, se han aprobado tres nuevas combinaciones, la más reciente (2020) bajo el nombre de Kaftrio. Estos tratamientos están indicados para variantes patogénicas específicas del CFTR, lo que restringe su uso a determinados grupos de individuos. Además, se ha demostrado una variabilidad de respuesta al tratamiento, incluso entre individuos con el mismo genotipo. Esta situación subraya la necesidad de desarrollar terapias más específicas y eficaces que consideren el contexto genético y fenotípico de cada individuo. En enfermedades como la FQ, la medicina personalizada cobra especial relevancia, ya que es importante prever la respuesta a cada tipo de modulador para seleccionar el tratamiento más adecuado. El uso de modelos validados como los organoides intestinales, provenientes del epitelio rectal, permiten valorar la funcionalidad *in vitro* de la CFTR antes y después del tratamiento con moduladores. Este modelo celular, además, sirve como herramienta para explorar nuevas vías terapéuticas que mejoren la función de la CFTR. Este proyecto de tesis doctoral se ha enfocado en estudiar la modulación de los receptores adenosinérgicos (RAs) en organoides intestinales como un posible tratamiento complementario para la FQ, dado que los RAs regulan los niveles de AMPC. Por primera vez, se ha caracterizado la expresión de los cuatro subtipos de RAs ( $A_1R$ ,  $A_{2A}R$ ,  $A_{2B}R$  y  $A_3R$ ) en organoides intestinales obtenidos de individuos control y de afectados por la FQ, destacando que el subtipo  $A_{2B}R$  es el predominante en ambos grupos. Para poder evaluar la implicación de la vía de los RAs en la función de la CFTR en organoides intestinales, se adaptó y validó un ensayo funcional *in vitro* ampliamente utilizado en este modelo celular. Además, se demostró el papel del AMPC en la conexión entre ambas vías. Una vez establecido el ensayo funcional, se llevó a cabo un cribado de 20 compuestos antagonistas de los RAs en organoides intestinales control. Este proceso permitió, por un lado, la selección de dos compuestos antagonistas como candidatos para potenciar la función de la CFTR en organoides intestinales y, por otro lado, destacó la importancia del uso de agonistas de  $A_{2B}R$  para mejorar la función de la CFTR. Finalmente, se evaluaron estos compuestos en organoides intestinales FQ. Los resultados de esta investigación doctoral demuestran que la combinación de agonistas de  $A_{2B}R$  con el modulador del CFTR Kaftrio potencia el efecto del modulador, lo que resulta en un incremento significativo de la función de la CFTR en organoides intestinales FQ. En conjunto, los resultados presentados indican que los fármacos agonistas de  $A_{2B}R$  pueden ser investigados para aplicarlos como complemento a las terapias actuales de la FQ.

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by pathogenic variants in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)* gene. The resulting protein, also called CFTR, is expressed in various epithelial tissues and confers a multisystemic nature to CF, with the respiratory and digestive systems being the most affected. CFTR acts as a transporter for  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  upon activation, initiated by increased cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels. Over 2,000 pathogenic variants of the *CFTR* have been identified and classified into six groups (I-VI) based on the type of alteration they cause in the expression and functionality of the protein. The introduction of specific drugs, referred to as modulators, represents a significant advancement in disease treatment and has led to improved quality of life for individuals with CF. Modulators can correct the conformation of the CFTR protein and/or enhance its function. Combining these modulators has also been found to be beneficial. Since the approval of the first modulator in 2012, three new combinations have been approved, with the most recent one (in 2020) named Kaftrio. These treatments are indicated for specific pathogenic variants of *CFTR*, thereby limiting their use to specific patient groups. Furthermore, variability in treatment response has been demonstrated even among individuals with the same genotype. This situation underscores the need to develop more precise and efficacious therapies that account for each individual's genetic and phenotypic context. In diseases like CF, personalized medicine becomes particularly relevant, predicting the response to each type of modulator for selecting the most suitable treatment. Validated models such as intestinal organoids, derived from rectal epithelium, allow for evaluating CFTR functionality *in vitro* before and after treatment with modulators. Additionally, this cellular model serves as a platform to explore new therapeutic pathways to enhance CFTR function. This doctoral thesis project has focused on studying the modulation of adenosinergic receptors (ARs) in intestinal organoids as a possible complementary treatment for CF, given that ARs regulate cAMP levels. For the first time, the expression of the four subtypes of ARs ( $\text{A}_1\text{R}$ ,  $\text{A}_2\text{A}\text{R}$ ,  $\text{A}_2\text{B}\text{R}$ , and  $\text{A}_3\text{R}$ ) has been characterized in intestinal organoids obtained from control individuals and those affected by CF, highlighting that the  $\text{A}_2\text{B}\text{R}$  subtype is predominant in both groups. A widely used *in vitro* functional assay in this cellular model was adapted and validated to assess the involvement of the AR pathway in CFTR function in intestinal organoids. Additionally, the role of cAMP in connecting both pathways was demonstrated. Once the functional assay was established, 20 AR antagonist compounds were screened in control intestinal organoids. This process allowed the selection of two antagonist compounds as candidates to enhance CFTR function in intestinal organoids, and also emphasized the importance of using  $\text{A}_2\text{B}\text{R}$  agonists to improve CFTR function. Finally, these compounds were evaluated in CF organoids. The results of this doctoral research demonstrate that combining  $\text{A}_2\text{B}\text{R}$  agonists with the CFTR modulator Kaftrio enhances the modulator's effect, resulting in a significant increase in CFTR function in CF intestinal organoids. Taken together, the presented results indicate that  $\text{A}_2\text{B}\text{R}$  agonist drugs can be investigated for application as a complement to current CF therapies.

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>2D</b>	Dos dimensiones
<b>3D</b>	Tres dimensiones
<b>A<sub>1</sub>R</b>	Receptor adenosinérgico 1
<b>A<sub>2A</sub>R</b>	Receptor adenosinérgico 2A
<b>A<sub>2B</sub>R</b>	Receptor adenosinérgico 2B
<b>A<sub>3</sub>R</b>	Receptor adenosinérgico 3
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ABC</b>	Familia de proteínas transportadores dependientes de ATP o <i>ATP-binding cassette</i>
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>Ado</b>	Adenosina
<b>ALI</b>	<i>Air-liquid interfase</i>
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AUC</b>	Área bajo la curva o <i>area under the curve</i>
<b>C</b>	Modulador de tipo corrector
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>CFTR</b>	Gen <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
<b>CFTR</b>	Proteína <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
<b>CFTR-Inh 172</b>	Inhibidor de la proteína CFTR
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ion cloruro
<b>cPLA2</b>	Fosfolipasa A2 citosólica o <i>cytosolic phospholipase A2</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EC50</b>	Concentración efectiva media
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>EMA</b>	Agencia Europea de Medicamentos o <i>European Medicines Agency</i>
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos o <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FIS</b>	<i>Forskolin-induced swelling</i>
<b>FQ</b>	Fibrosis quística
<b>FSK</b>	Forskolina
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados a proteínas G o <i>G-protein-coupled receptors</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Ion bicarbonato
<b>HUVH</b>	Hospital Universitari Vall d'Hebron
<b>IC50</b>	Concentración media inhibitoria

<b>IM</b>	Íleo meconial
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>IP</b>	Insuficiencia pancreática
<b>LP</b>	Líquido periciliar
<b>LSVA</b>	Líquido de la superficie de las vías respiratorias
<b>NBD1</b>	Dominio de unión a nucleótidos 1 del CFTR
<b>NBD2</b>	Dominio de unión a nucleótidos 1 del CFTR
<b>NECA</b>	5'-(N-Etilcarboxamida)adenosina
<b>NHERF2</b>	Proteína <i>Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor isoform 2</i>
<b>ns</b>	No significativo
<b>P</b>	Moduladors de tipo potenciador
<b>PKA</b>	Proteína quinasa A
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PPIA</b>	Gen <i>peptidil proil isomerasa A</i>
<b>R</b>	Dominio regulador del CFTR
<b>RAs</b>	Receptores adenosinérgicos
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RT-qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>STOP</b>	Codón de terminación prematura o PTC
<b>T0</b>	Tiempo basal
<b>TIR</b>	Tripsina inmunoreactiva
<b>TMD1</b>	Dominio transmembrana 1 del CFTR
<b>TMD2</b>	Dominio transmembrana 2 del CFTR
<b>VHIR</b>	Vall d'Hebron Institut de Recerca
<b>WT</b>	Control, no afectado por la FQ o <i>wild type</i>

# ÍNDICE

<b>Agradecimientos</b> .....	7
<b>Resumen</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	10
<b>Lista de abreviaciones</b> .....	11
<b>I – INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1.1 Fibrosis Quística .....	19
1.1.1 La proteína CFTR.....	19
1.1.2 Variantes patogénicas del gen <i>CFTR</i> .....	22
1.1.3 Diagnóstico de la FQ.....	23
1.1.4 Manifestaciones clínicas de la FQ.....	24
1.1.5 Genes y factores ambientales modificadores de la FQ.....	26
1.1.6 Terapias farmacológicas para la FQ.....	27
1.2 Modelos celulares para el estudio de la FQ.....	28
1.3 Receptores adenosinérgicos .....	32
1.3.1 Activación de la CFTR mediante A <sub>2B</sub> R .....	34
<b>II – HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	37
<b>III – MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	41
3.1 Sujetos de estudio .....	43
3.2 Líneas celulares .....	44
3.2.1 Reactivos.....	44
3.2.2 Medios .....	44
3.2.3 Protocolo de cultivo .....	44

3.3 Organoides intestinales.....	45
3.3.1 Obtención de biopsias intestinales y rectales .....	45
3.3.2 Procesamiento y cultivo de los organoides intestinales .....	45
3.3.2.1 Reactivos .....	46
3.3.2.2 Medios.....	46
3.3.2.3 Protocolos.....	46
3.3.2.3.1 Recepción de las biopsias y extracción de las criptas .....	46
3.3.2.3.2 Protocolo de pase .....	48
3.3.3 Ensayo funcional <i>in vitro</i> de los organoides intestinales.....	49
3.4 Técnicas de biología molecular .....	53
3.4.1 Extracción de ARN y purificación.....	53
3.4.1.1 Reactivos .....	53
3.4.1.2 Protocolo .....	53
3.4.2 Síntesis de ADN complementario.....	54
3.4.2.1 Reactivos .....	54
3.4.2.1 Protocolo .....	54
3.4.3 RT-qPCR .....	55
3.4.3.1 Reactivos .....	55
3.4.3.2 Protocolo .....	55
3.4.3.3 Análisis.....	55
3.4.4 ELISA .....	56
3.4.4.1 Reactivos .....	56
3.4.4.2 Protocolo .....	56
3.4.4.3 Análisis.....	57
3.5 Análisis estadístico .....	57

<b>IV – RESULTADOS</b> .....	59
4.1 Estudio de la expresión y función de los receptores adenosinérgicos en organoides intestinales.....	61
4.1.1 Análisis de expresión de los RAs en líneas celulares inmortalizadas .....	61
4.1.2 Análisis de expresión de los RAs en organoides intestinales control.....	62
4.1.3 Expresión de los RAs en organoides intestinales FQ.....	62
4.1.4 Adaptación del ensayo funcional FIS para estudiar la respuesta de la CFTR tras la activación de los RAs en organoides intestinales control .....	64
4.2 Estudio de la modulación de los ras en la función de la CFTR en organoides control.....	68
4.2.1 Cribado de antagonistas de los RAs.....	68
4.2.1.1 Antagonistas de A <sub>1</sub> R .....	69
4.2.1.2 Antagonistas de A <sub>2A</sub> R.....	71
4.2.1.3 Antagonistas de A <sub>2B</sub> R.....	72
4.2.1.4 Antagonistas de A <sub>3</sub> R .....	74
4.2.1.5 Antagonistas de dos RAs distintos .....	76
4.2.2 Fármacos candidatos.....	77
4.2.2.1 Antagonistas candidatos: PBF-03 y PBF-17 .....	78
4.2.2.2 Agonistas candidatos de A <sub>2B</sub> R: PBF-21 y PBF-22 .....	80
4.3 Evaluación del uso de agonistas de A <sub>2B</sub> R en la función de la CFTR en organoides intestinales FQ.....	82
 <b>V – DISCUSIÓN</b> .....	 91
 <b>VI – CONCLUSIONES</b> .....	 103
 <b>VII – FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	 107
 <b>VIII – BIBLIOGRAFÍA</b> .....	 111

<b>IX – ANEXOS</b> .....	129
9.1 Figuras .....	131
9.2 Protocolo de expansión y diferenciación de las células epiteliales nasales humanas....	135
9.2.1.1 Reactivos.....	135
9.2.1.2 Medios .....	136
9.2.1.3 Protocolos.....	136
9.2.1.3.1 Obtención y expansión de las células epiteliales nasales humanas.....	136
9.2.1.3.2 Diferenciación de las células epiteliales nasales expandidas.....	137

## **I – Introducción**



## 1.1 FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva potencialmente mortal que afecta a más de 162.000 personas en todo el mundo [1], siendo más prevalente en la población caucásica [2,3]. La sospecha diagnóstica se obtiene generalmente mediante pruebas de cribado neonatal, prueba de sudor, manifestaciones clínicas sugestivas y su posterior confirmación con su estudio genético.

La FQ se caracteriza por ser una enfermedad multisistémica, afectando al aparato reproductor, glándulas sudoríparas, aparato respiratorio y digestivo, siendo estos dos últimos los más gravemente comprometidos. La variabilidad en la sintomatología se debe, en parte, a las numerosas variantes patogénicas del *CFTR* (de sus siglas en inglés, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) que son responsables de la FQ. Se han identificado más de 2.000 variantes patogénicas del gen *CFTR*, cada una con distintos efectos en la expresión y funcionalidad de la proteína, lo que incide directamente en la severidad de la enfermedad.

El gen *CFTR* codifica un canal aniónico, conocido como CFTR. Las alteraciones en la funcionalidad de este canal conducen a una disminución o incluso a la ausencia del flujo de aniones, así como a la reducción del transporte de agua hacia la superficie celular. Como consecuencia, el moco producido de forma natural en distintos órganos se vuelve más espeso y viscoso, llevando a la obstrucción de las vías respiratorias y de los conductos pancreáticos y biliares, además de afectar a la función intestinal. Esta situación también propicia la colonización de infecciones recurrentes y, la persistencia de estas condiciones, puede llevar al fallo pulmonar y pancreático irreversible.

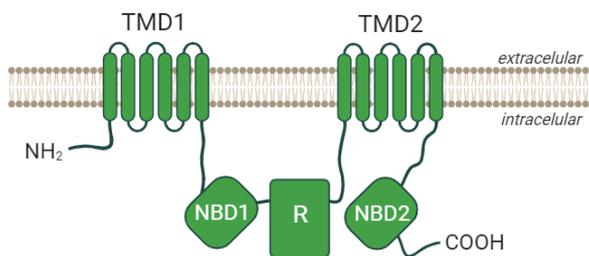
A pesar de que actualmente no existe una cura definitiva para la FQ, el uso de fármacos específicos que modulan la función de la CFTR y el tratamiento de las infecciones pulmonares con antibióticos, entre otras estrategias terapéuticas, han contribuido a la mejora de la calidad de vida de las personas afectadas por la FQ.

### 1.1.1 La proteína CFTR

El gen *CFTR* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7, en la posición 7q31.2 [4]. Este gen está compuesto por un total de 27 exones. La proteína CFTR actúa principalmente como canal de cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), además de regular otros canales, como el canal de sodio ENaC (de sus siglas en inglés, *epithelial sodium channel*), sobre el cual ejerce una función inhibitoria.

La CFTR se expresa en la región apical de varios tejidos epiteliales y glandulares, incluyendo aquellos presentes en el páncreas, cavidad nasal, bronquios, glándulas bronquiales, intestino, hígado y glándulas sudoríparas [5,6]. Sin embargo, presenta un papel regulador especialmente importante en los tejidos donde hay una mayor expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del *CFTR*: el epitelio respiratorio, intestinal y pancreático [7].

La CFTR es una proteína de membrana compuesta por 1.480 aminoácidos y tiene un peso molecular de 170 kDa. Pertenece a la familia de las proteínas transportadoras transmembrana llamada “transportadoras ABC” (de sus siglas en inglés, *ATP-binding cassette*). Los integrantes de esta familia comparten una estructura conservada compuesta por dos dominios transmembrana (TMD1 y TMD2), que anclan la proteína a la membrana celular, y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) que interactúan con el adenosín trifosfato (ATP). Sin embargo, la CFTR se distingue de los demás miembros ABC debido a la presencia de un quinto dominio denominado dominio regulador (R) (Figura 1). Este dominio desempeña un papel fundamental en la regulación de la apertura del canal.



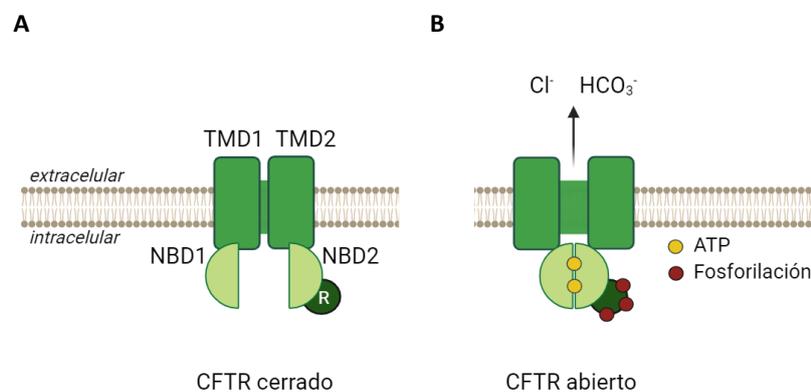
**Figura 1. Dominios del canal CFTR.** Imagen creada con BioRender.com.

Los distintos dominios de la CFTR se sintetizan en el retículo endoplásmico (RE), donde posteriormente interaccionarán entre ellos para generar una proteína estable. Durante el proceso de plegamiento, tanto chaperonas como co-chaperonas realizan un control de calidad de la proteína. Cuando detectan un plegamiento incorrecto, marcan a la proteína a través de un sistema llamado ERAD (de las siglas en inglés, *endoplasmic-reticulum-associated degradation*), para que posteriormente sean conducidas al proteosoma para su degradación [8–10].

Este marcaje generalmente tiene lugar mediante ubiquitinación [11,12], aunque algunos estudios sugieren que también puede ocurrir mediante sumoilación [13–15].

Después de pasar el control de calidad en el RE, la CFTR es transportada al aparato de Golgi, donde debe someterse a modificaciones postraduccionales y superar otro control de calidad. Si no pasa esta etapa, es degradada por el lisosoma [9]. Finalmente, la CFTR madura es transportada mediante vesículas que siguen la vía exocítica hasta la membrana apical, donde es insertada [16,17].

La activación de la CFTR es un proceso sujeto a modificaciones postraduccionales, que facilitan la transición de un estado cerrado e inactivado (Figura 2A) a uno abierto y funcional (Figura 2B). La proteína quinasa A (PKA) es la principal responsable de iniciar dicho proceso al fosforilar residuos del dominio R que permiten cambiar la conformación de la CFTR [18,19]. Previamente, para poder activar la PKA es necesario que haya ciertos niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) [20].

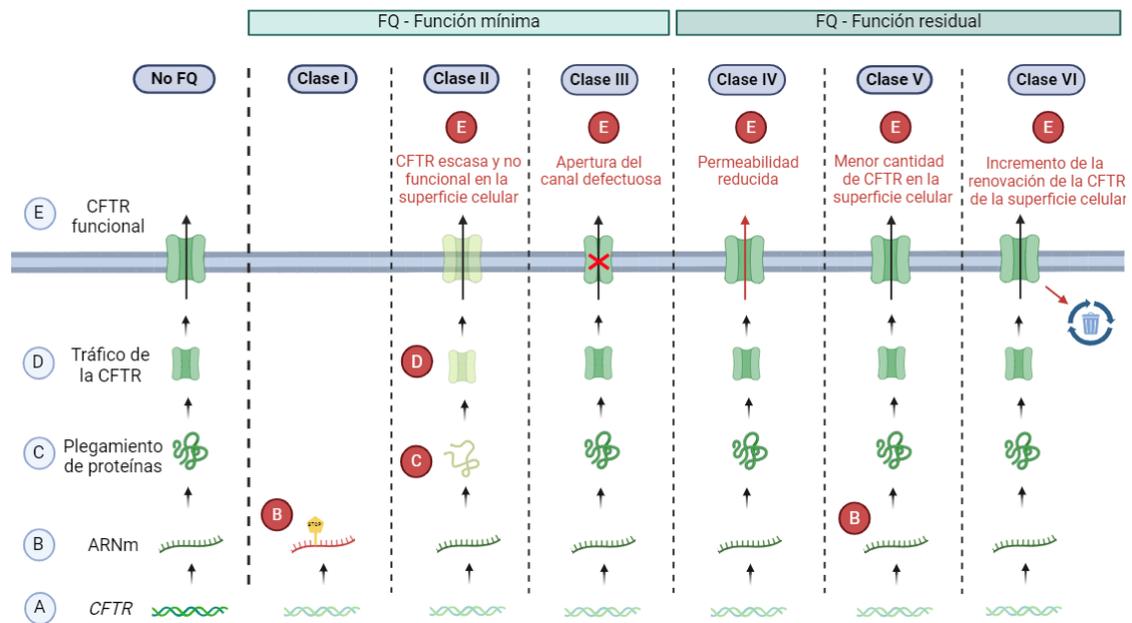


**Figura 2. Estadios de conformación de la CFTR.** (A) El estado inactivo se caracteriza por presentar un bloqueo alostérico efectuado por una región del propio dominio R. (B) El incremento de los niveles de AMPc permite activar a la enzima PKA, la cual fosforila ciertos residuos del dominio R de la CFTR. El cambio de conformación resultante facilita la unión del ATP a los dominios NBD y su posterior dimerización [18,21]. Finalmente, se produce la apertura del canal, posibilitando el transporte de Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> hacia el espacio extracelular. Para volver a cerrar el canal, es necesario la hidrólisis de las moléculas de ATP, lo que provoca la desestabilización y disociación del dímero NBD [22]. La disociación induce un cambio de conformación en los dominios TMDs, promoviendo el acercamiento entre ellos e impidiendo el flujo de aniones a través del canal. Imagen creada con BioRender.com

El AMPc intracelular se genera mediante la conversión del ATP gracias a la acción de las enzimas adenilato ciclasas (ACs). En los mamíferos, la mayoría de estas ACs son proteínas transmembrana que se activan como parte de la cascada de señalización iniciada por los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés *G-protein-coupled receptors*), como es el caso de los receptores adenosinérgicos (RAs) (ver sección 1.3).

### 1.1.2 Variantes patológicas del gen *CFTR*

Desde la identificación del gen *CFTR* en 1989 [4], se han identificado más de 2.000 variantes patológicas [23] que provocan una amplia variedad de alteraciones a nivel molecular y celular. Dada esta diversidad, ha sido necesario establecer un sistema de clasificación que categoriza estas variantes según el defecto que producen [24]. Tradicionalmente, las variantes patológicas del *CFTR* se dividen en seis grupos (Figura 3).



**Figura 3. Clasificación de las variantes patológicas del *CFTR* según su expresión y función proteica.** Cada variante patológica del *CFTR* (A) da lugar a una serie de alteraciones que repercuten principalmente en la producción de su ARNm (B), en el proceso de plegamiento de la proteína (C), en el tráfico hacia la membrana plasmática (D) y/o en la funcionalidad de la proteína CFTR una vez es insertada en la superficie celular (E). Imagen creada con BioRender.com.

Las variantes de clase I producen alteraciones en la transcripción del *CFTR* debido a la introducción de un codón de terminación prematura (codón PTC o STOP) [25,26]. Dado que los niveles de producción de la CFTR dependen de la ubicación del codón STOP, hay algunos autores que consideran una séptima clase para aquellas variantes patológicas con grandes deleciones y que causan la ausencia total del ARNm [27]. Las variantes de clase II son aquellas en las que el procesamiento y el tráfico de la proteína son defectuosos. Como consecuencia, la CFTR queda retenida en el RE al no pasar el control de calidad para posteriormente ser degradada. Aunque la mayoría de las proteínas de este grupo acaban siendo degradadas, una pequeña fracción logra llegar a la superficie celular.

Sin embargo, debido a su alteración estructural, su capacidad de activación se ve afectada y su estabilidad en la membrana disminuye [28]. Un ejemplo de esta clase es la variante F508del-*CFTR*, que se estima que está presente en el 80% de las personas afectadas por la FQ [3,23,29,30]. La clase III se asocia con la funcionalidad de la proteína, específicamente con una deficiencia en la apertura del canal. Sin embargo, la cantidad de *CFTR* en la membrana plasmática permanece dentro de un rango normal. Las variantes de clase IV se relacionan con alteraciones en la conductancia, mientras que las de clase V presentan anomalías en el promotor y los niveles de *CFTR* normal están disminuidos. Las variantes de clase VI causan inestabilidad a la proteína una vez se localiza en la superficie celular, por lo que el recambio proteico está acelerado.

Aunque esta clasificación es útil para variantes bien caracterizadas y que son comunes en la población, existen variantes con un fenotipo molecular complejo que son difíciles de categorizar en una única clase. Es por ello que paralelamente se ha desarrollado un enfoque de clasificación basado en la función residual de la *CFTR* [27,31]. Según esta aproximación, se distinguen dos grupos: aquellas variantes patogénicas con función mínima o con función residual (Figura 3). Las variantes con función mínima corresponden a las clases I, II y III, según la clasificación tradicional, ya que muestran poca o ninguna función de la *CFTR*. Por otro lado, las variantes con función residual (clases IV, V y VI) presentan cierto nivel de actividad, aunque en menor medida en comparación con la forma no patogénica. Esto contribuye a que las manifestaciones clínicas de la FQ asociadas a estas variantes sean menos severas.

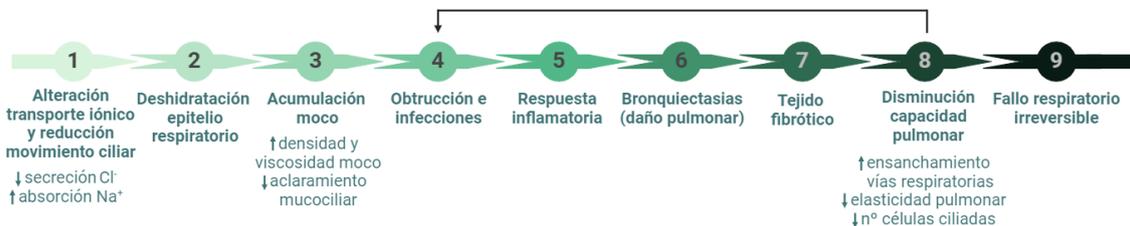
### 1.1.3 Diagnóstico de la FQ

En la mayoría de países desarrollados actualmente se realiza un cribado neonatal para detectar posibles enfermedades congénitas, incluyendo la FQ. Este cribado se hace a partir de una pequeña muestra de sangre extraída del talón de la cual se evalúa, entre otros parámetros, los niveles de tripsina inmunoreactiva (TIR), una enzima proteolítica que se encuentra en los jugos pancreáticos. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que un resultado positivo de estos valores no es específico de la FQ, ya que los niveles elevados de TIR también pueden indicar problemas pancreáticos no relacionados con esta enfermedad. Por esta razón, es necesario complementar el resultado con un examen clínico, la realización de la prueba del sudor y con un posterior análisis genético para identificar las variantes patogénicas del *CFTR*.

La prueba del sudor es considerada como la "prueba de referencia" en el diagnóstico de la FQ. Durante este test se colocan, generalmente en el antebrazo, dos electrodos que contienen un disco con gel de pilocarpina, un medicamento que estimula las glándulas sudoríparas para que produzcan sudor. La muestra de sudor generada es recogida y analizada para determinar la concentración de Cl<sup>-</sup>. Este sistema resulta especialmente valioso en situaciones donde posibles análisis genéticos no concluyentes puedan complicar la obtención de un diagnóstico definitivo [32–34].

### 1.1.4 Manifestaciones clínicas de la FQ

La FQ es una enfermedad que presenta manifestaciones clínicas en diversos órganos debido a la amplia distribución de la proteína CFTR en diferentes tejidos epiteliales. Sin embargo, la principal causa de morbilidad y mortalidad es consecuencia de las complicaciones pulmonares. A nivel celular, las complicaciones pulmonares se originan debido a la deshidratación del tejido respiratorio, lo que provoca cambios funcionales graves que, en casos extremos, pueden requerir un trasplante pulmonar debido a un fallo respiratorio irreversible (Figura 4).



**Figura 4. Eventos clínicos secuenciales que conducen al fallo respiratorio irreversible en FQ.** Imagen creada con BioRender.com

La alteración del transporte de Cl<sup>-</sup> causada por las variantes patogénicas del *CFTR* conduce a un desequilibrio iónico y a la disminución del contenido de agua del líquido de la superficie de las vías respiratorias (LSVA), que recubre el epitelio respiratorio [35]. Como consecuencia, se produce un aumento de la densidad y la viscosidad del moco en el tracto respiratorio [36]. Paralelamente se produce una disminución de la eficiencia del aclaramiento mucociliar que, junto con el incremento de la viscosidad del moco, contribuyen a la obstrucción de las vías respiratorias y predisponen a la recurrencia de infecciones pulmonares, particularmente por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Además, hay evidencias que sugieren que la alteración del equilibrio iónico afecta a la actividad antimicrobiana de ciertas moléculas presentes en el moco, lo que fomenta la colonización de estas bacterias [37,38]. La respuesta inflamatoria excesiva y crónica provocada por las infecciones contribuye al daño pulmonar progresivo, que se manifiesta en forma de bronquiectasias y tejido fibrótico. La formación de tejido fibrótico conduce al ensanchamiento de las vías respiratorias y a la pérdida de la elasticidad pulmonar, reduciendo así la capacidad pulmonar. Además, la disminución de las células ciliadas del epitelio respiratorio, substituidas por tejido fibrótico, empeora la expectoración del moco pulmonar. Este proceso puede convertirse en un círculo interminable que va agravando la obstrucción de las vías respiratorias. Con el tiempo, la acumulación del daño en el tejido pulmonar, la persistente inflamación y las infecciones recurrentes pueden llevar a una insuficiencia pulmonar significativa, culminando en un fallo respiratorio irreversible [39].

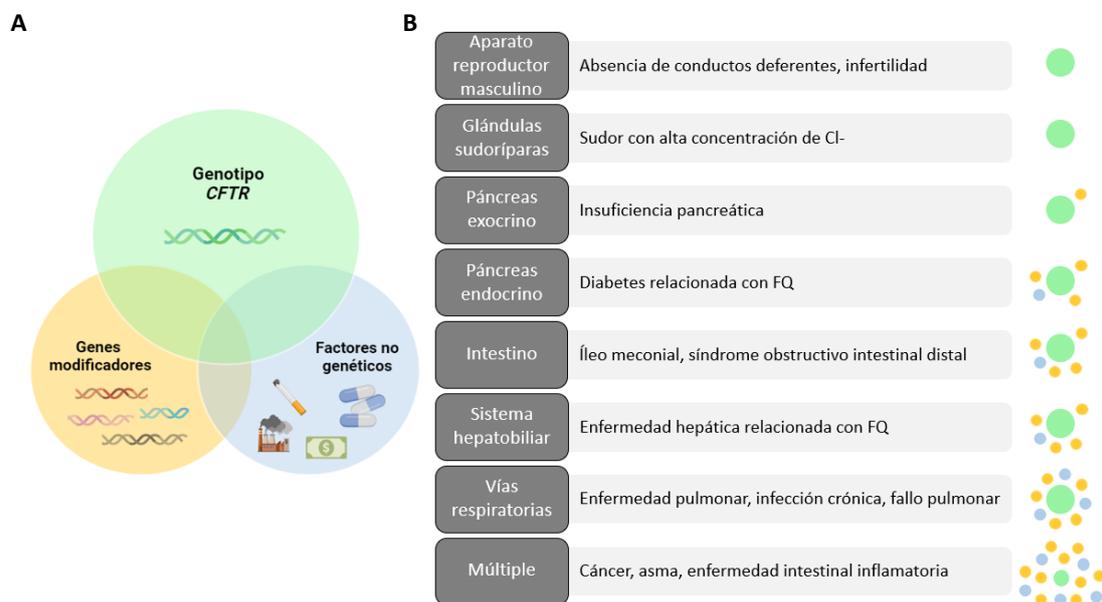
La insuficiencia pancreática (IP) representa la segunda complicación más común asociada con la FQ. En el páncreas, la disfunción de la CFTR en las células ductales proximales desencadena un desequilibrio iónico en el jugo pancreático y la deshidratación del epitelio pancreático. A pesar de ello, las células acinares mantienen su capacidad para producir y secretar enzimas pancreáticas hacia el jugo. Como resultado, el jugo pancreático presenta una elevada concentración de proteínas pancreáticas, que se acumulan en los conductos pancreáticos, ocasionando su obstrucción y el consiguiente deterioro del tejido acinar. La actividad enzimática también se ve comprometida, lo que conlleva a una absorción inadecuada de nutrientes y trastornos gastrointestinales. En etapas avanzadas de la IP, la formación de tejido fibroso, como consecuencia de las lesiones celulares, resulta en una IP irreversible. Otra complicación frecuente relacionada con la FQ es la diabetes, la cual se ha observado que su prevalencia en Europa tiende a aumentar con el paso del tiempo [40].

Las alteraciones en el canal CFTR también afectan al sistema gastrointestinal, favoreciendo un ambiente más seco y ácido en la luz intestinal. La disminución del pH degrada las enzimas digestivas y compromete al proceso digestivo de los alimentos. Esta circunstancia, combinada con la acumulación de mucosidad en el intestino [41], conduce a una obstrucción intestinal. Aproximadamente el 20% de los recién nacidos afectados por la FQ desarrollan una obstrucción en el íleon distal, que tiene su origen durante el desarrollo fetal [42]. En ocasiones, esta afección, conocida como íleo meconial (IM), se puede detectar antes del nacimiento mediante ecografía [43].

En adultos, esta obstrucción se denomina síndrome obstructivo intestinal distal (DIOS). Además, la alteración del entorno luminal puede propiciar estados de malnutrición, desequilibrios en el microbioma intestinal (disbiosis microbiana) o incluso alteraciones en el sistema inmunológico de las mucosas intestinales [44]. Otras complicaciones relacionadas con la FQ son la cirrosis biliar, la formación de cálculos biliares, el desarrollo de osteoporosis, la aparición de anomalías en los aparatos reproductores masculino y femenino, cálculos urinarios y trastornos en las glándulas sudoríparas, lo que puede dar lugar a una deshidratación generalizada, entre otros.

### 1.1.5 Genes y factores ambientales modificadores de la FQ

Como se ha comentado anteriormente, la gravedad del fenotipo de la FQ está asociada a la clase a la cual pertenece la variante patogénica del *CFTR*. Por consiguiente, cabría esperar que individuos con el mismo genotipo mostraran síntomas similares, así como una misma respuesta al tratamiento. Sin embargo, se han descrito casos en los que individuos con las mismas variantes *CFTR* presentan una sintomatología y una respuesta al tratamiento diferente [31,45]. Este fenómeno pone de manifiesto la existencia de genes modificadores y factores no genéticos que influyen en el desarrollo clínico de la FQ (Figura 5A).



**Figura 5. Complejidad del fenotipo de la FQ.** (A) El fenotipo asociado a la FQ principalmente es el resultado de las variantes patológicas del *CFTR* (en verde), pero también contribuyen genes modificadores (en amarillo) y factores no genéticos (en azul). (B) Algunos ejemplos de las manifestaciones clínicas más comunes de cada tejido o sistema que puede verse afectado en la FQ. A la derecha de cada ejemplo, se representan el grado la influencia del genotipo *CFTR*, de los genes modificadores y de los factores ambientales mediante el tamaño y cantidad de los círculos verdes, amarillos y azules, respectivamente. Imagen creada con BioRender.com y adaptada de O'Neal et al., 2018.

El término "genes moduladores" hace referencia a aquellos genes distintos a *CFTR* que, según su variante específica, pueden tener un efecto positivo o negativo en la fisiopatología de la FQ. Es importante destacar que la influencia de estos genes modificadores es diferente en cada caso (Figura 5B) [46]. Por ejemplo, se ha estimado que los genes modificadores no influyen en la malformación de los conductos deferentes del aparato reproductor masculino [47]. Sin embargo, tienen un impacto limitado en la enfermedad pancreática [48], mientras que juegan un papel determinante (más del 50%) en la gravedad de la enfermedad pulmonar [49]. Algunos ejemplos de genes modificadores son *IL-8*, *IL-10*, *SLC9A3*, *SLC6A14* (relacionados con una mayor susceptibilidad a infecciones respiratorias); *ATP12A* (íleo meconial); *SLC26A9* (diabetes); *MUC4*, *MUC20* (severidad de la enfermedad pulmonar); *TGF $\beta$ 1* (enfermedad pulmonar y hepática); *SLC26A9*, *SLC6A14* (eficacia en la respuesta a los tratamientos con moduladores) [47,50–52].

Los factores ambientales, como el hábito de fumar [53], la exposición a niveles elevados de contaminación [54], así como las condiciones socioeconómicas [55], desempeñan un papel significativo en la evolución de la FQ. La situación económica y personal de cada individuo afectado por la FQ o de su familia pueden influir en su acceso a los tratamientos, no solo a opciones costosas y personalizadas como la terapia con moduladores [56], sino también a la atención médica que incluye la suplementación de enzimas pancreáticas [57], la planificación nutricional [44] o el uso de antibióticos.

### 1.1.6 Terapias farmacológicas para la FQ

En la última década, los avances en el conocimiento de las alteraciones moleculares que producen las variantes patogénicas del *CFTR* han contribuido al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la FQ. Históricamente, esta enfermedad carecía de un tratamiento específico por lo que las terapias convencionales se centraban en abordar los síntomas pulmonares con el objetivo de mejorar la eliminación de la mucosidad y controlar las infecciones recurrentes. Sin embargo, a partir de 2012, la introducción de las moléculas denominadas "moduladores del CFTR" ha tenido un impacto significativo en la calidad de vida de las personas afectadas por la FQ.

Los moduladores son compuestos diseñados para restaurar la función de la proteína CFTR. El primer modulador en llegar al mercado fue el Ivacaftor (VX-770) en 2012, que actúa como un potenciador (P) de la CFTR al mejorar la apertura del canal [58]. Su uso está aprobado para ciertas variantes patogénicas de las clases III y IV.

Otro grupo de moduladores, conocidos como "correctores" (C), se caracterizan por mejorar la estructura mal plegada de la CFTR, facilitando su transporte hacia la superficie celular. Estos correctores están aprobados para determinadas variantes de clases II y V. Ejemplos de correctores incluyen el Lumacaftor (VX-809) y el Tezacaftor (VX-661).

En 2015 y 2018 la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) aprobaron respectivamente el uso combinado de ciertos moduladores: Symkevi® (VX-661+VX-770) y Orkambi® (VX-809+VX-770). El ejemplo más reciente es la triple terapia denominada KAFTRIO® o TRIKAFTA® que combina el VX-661 con VX-770 y un tercer modulador llamado Elexacaftor (VX-445) [59,60].

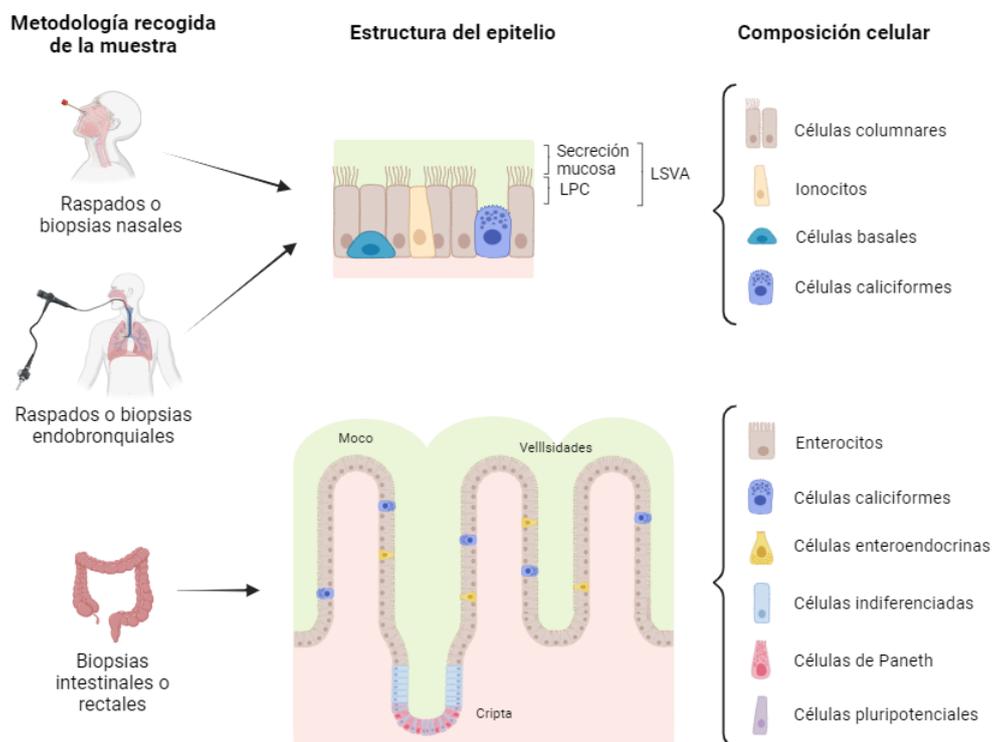
Es importante señalar que cada terapia moduladora ha sido aprobada para tratar variantes específicas del *CFTR* [61], por lo que no todos los individuos afectados por la FQ son candidatos para el uso de moduladores. Por esta razón, a pesar de los notables avances en el tratamiento de la enfermedad, aún es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a aquellos individuos que carecen de opciones de tratamiento disponibles en la actualidad o que muestran respuestas limitadas.

Paralelamente a estos tratamientos con moduladores, se está investigando si el uso de compuestos que promueven la lectura del *CFTR* a pesar de la existencia de codones STOP, conocidos como compuestos "*read-through*," podría resultar beneficioso en el tratamiento de la FQ. Estos compuestos están dirigidos a los genotipos pertenecientes a la clase I. Otra alternativa que está en estudio es el uso de moduladores de *splicing* (oligonucleótidos antisentido) enfocados para las variantes de clase V [62].

## 1.2 MODELOS CELULARES PARA EL ESTUDIO DE LA FQ

El tratamiento con moduladores ha supuesto una mejora significativa en la calidad de vida de las personas afectadas por la FQ. No obstante, aproximadamente el 20% de los afectados en Europa y el 10% en Estados Unidos quedan excluidos como candidatos para acceder a las terapias actuales debido a que presentan variantes raras o desconocidas del *CFTR*. La falta de conocimiento de los efectos moleculares y celulares de dichas variantes, junto con la escasez de personas portadores de ellas a menudo conduce a su exclusión de los ensayos clínicos, lo que dificulta la evaluación de tratamientos adecuados. Por otro lado, también se ha observado diferencias en la respuesta farmacológica entre pacientes con las mismas variantes *CFTR*, poniendo de manifiesto la influencia de factores ambientales y/o genes modificadores.

En este contexto, el uso de modelos celulares derivados de individuos afectados por la FQ se presenta como una herramienta esencial que permite investigar las implicaciones moleculares y celulares de variantes poco comunes y comprender los mecanismos subyacentes de la FQ. Además, permite evaluar de manera precisa la respuesta de cada individuo a los tratamientos moduladores aprobados, así como nuevos compuestos en desarrollo. Los modelos celulares actualmente empleados en la investigación de la FQ provienen de biopsias del epitelio intestinal y de las vías respiratorias (Figura 6).



**Figura 6. Ilustración de la obtención de las muestras biológicas que se utilizan para establecer los diferentes modelos celulares derivados de individuos utilizados para el estudio de la FQ.** LPC (líquido periciliar (LPC); LSVA (líquido de la superficie de las vías respiratorias). Imagen creada con Biorender.com y adaptada de Ramalho et al., 2022.

El epitelio intestinal está compuesto por diferentes tipos celulares que se organizan formando estructuras tubulares denominadas vellosidades intestinales. En la base de estas vellosidades se encuentran las criptas de Lieberkühn, que albergan células pluripotentes que permiten la constante renovación y regeneración del epitelio. En las criptas también se localizan las células de Paneth, productoras de sustancias antimicrobianas.

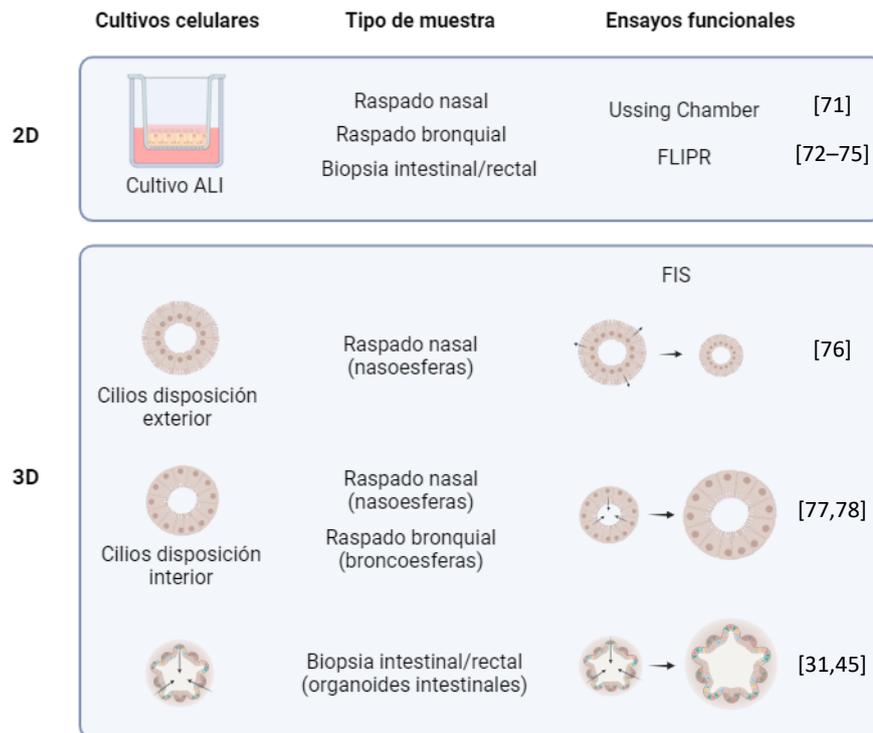
A medida que las células pluripotentes se diferencian y migran hacia las vellosidades, pasan a un estadio donde mantienen cierta capacidad pluripotencial (células indiferenciadas), para seguidamente adquirir su identidad como células caliciformes, células enteroendocrinas o enterocitos, siendo estos últimos el tipo celular predominante en las vellosidades.

Es importante destacar que la expresión del *CFTR* varía a lo largo del tracto intestinal, siendo más elevada en las zonas proximales, como el duodeno y el ciego, que en las zonas distales como el íleon y el recto [7]. Además, dentro del propio epitelio intestinal los niveles de *CFTR* son mayores en la base de la cripta que en las vellosidades [63,64].

El epitelio respiratorio se forma a partir de la diferenciación de las células basales que presentan capacidad pluripotencial, dando lugar a las células caliciformes, ionocitos y células columnares. Las células caliciformes son las encargadas de producir y secretar moco, el cual tiene funciones protectoras. Los ionocitos tienen poca presencia en el epitelio, sin embargo, presentan altos niveles de *CFTR* [65–68]. Las células columnares son las mayoritarias del tejido epitelial respiratorio y pueden ser ciliadas o no ciliadas: las primeras facilitan la renovación del moco con el movimiento constante de los cilios, mientras que las segundas están implicadas principalmente en el mantenimiento de la homeostasis del epitelio.

Las secreciones y fluidos generados por el epitelio respiratorio forman el LSVA, de unos 10  $\mu\text{m}$ . La composición del LSVA está regulada por varios canales apicales y basolaterales, entre ellos el *CFTR*. Este fluido, de aspecto gelatinoso, se puede dividir en dos capas distintas: 1) una capa de moco encargada de atrapar las partículas externas (agentes patógenos y sustancias nocivas) y 2) una capa periciliar situada justo bajo la capa mucosa y compuesta por un fluido menos denso denominado líquido periciliar (LPC). En la zona de la capa periciliar es donde se encuentran inmersos los cilios pertenecientes a las células ciliadas del epitelio. El movimiento continuado y coordinado de los cilios, un proceso denominado aclaramiento mucociliar, permite la eliminación del moco junto con las partículas atrapadas hacia afuera de las vías respiratorias [69,70].

Las muestras de epitelio respiratorio, intestinal o rectal se pueden cultivar en dos o tres dimensiones (2D o 3D), y de ello dependerá el tipo de ensayo funcional *in vitro* que se pueda llevar a cabo (Figura 7).



**Figura 7. Resumen de los cultivos en 2D y 3D que se utilizan en los modelos nasales, bronquiales e intestinales/rectales derivados de individuos, así como los ensayos funcionales que se pueden aplicar en cada caso.** FLIPR (*Fluorescent Imaging Plate Reader*); FIS (*Forskolin-Induced Swelling*). Imagen creada con Biorender.com y adaptada de Ramalho et al., 2022.

Los cultivos en 2D necesitan una expansión previa de las células primarias extraídas (nasales, bronquiales, intestinales o rectales) antes de ser cultivadas sobre un soporte poroso (inserto). Este sistema permite diferenciar dos compartimentos: uno inferior donde se añade medio de cultivo y uno superior, sin medio, que queda expuesto directamente al aire para imitar la fisiología de los conductos respiratorios. Este método promueve la diferenciación celular, obteniendo así un epitelio pseudoestratificado con función mucociliar. Este cultivo se conoce como ALI (de sus siglas en inglés, *Air-Liquid Interface*) [79–81].

El ensayo electrofisiológico, que utiliza la cámara de Ussing (*Ussing chamber*), permite analizar la conductancia de la CFTR en los cultivos 2D [71]. Aunque es el método más comúnmente utilizado en estos casos, requiere una amplia experiencia en el manejo de la instrumentación. Por esta razón, recientemente se ha comenzado a utilizar el ensayo FLIPR (de sus siglas en inglés, *Fluorescent Imaging Plate Reader*) como una alternativa, el cual permite evaluar la función del canal mediante fluorescencia [72–75].

Los cultivos 3D, también llamados organoides, son modelos *in vitro* generados a partir de células madre que imitan la complejidad funcional, estructural y biológica del tejido en cuestión. En el estudio de la FQ, se utilizan organoides nasales (llamados nasoesferas), organoides bronquiales (broncoesferas) y organoides intestinales. Estos últimos, normalmente son generados a partir del aislamiento de las criptas de Lieberkühn de biopsias rectales y son considerados como el “*gold standard*”, principalmente debido a cuatro características: i) presentan una alta expresión de la CFTR en el epitelio intestinal [82], ii) tienen una rápida expansión *in vitro* debido a las células pluripotentes presentes en las criptas [83], lo que permite obtener una fuente considerable de material experimental, iii) la estabilidad genética y fenotípica se mantiene durante un largo período de cultivo [84,85], y iv) el protocolo para obtener las biopsias rectales es relativamente fácil y no requiere anestesia [86]. No obstante, hay que tener en cuenta que al ser un modelo intestinal no es el más adecuado para estudiar la afectación respiratoria en la FQ. Es por ello que, poco a poco, el uso de las nasoesferas y las broncoesferas va ganando importancia en la investigación de la FQ.

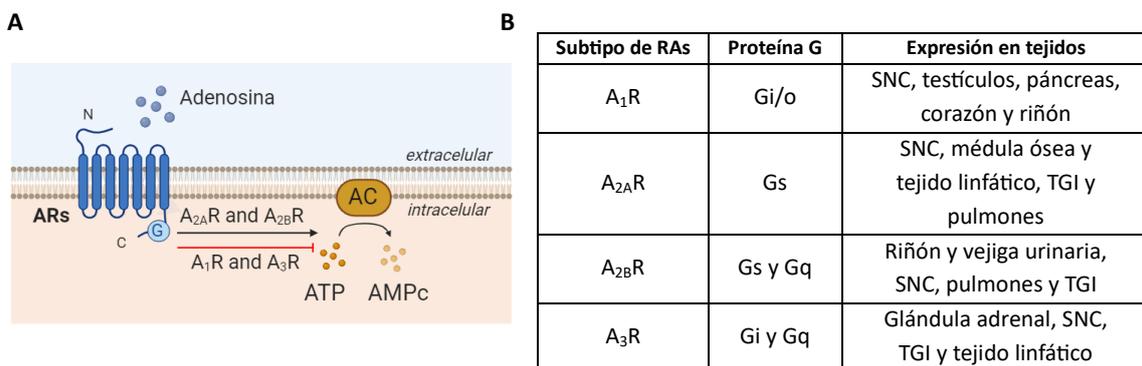
La funcionalidad de la CFTR en organoides se determina mediante el ensayo conocido como FIS (de sus siglas en inglés *forskolin-induced swelling*). Este ensayo se basa en la estimulación directa de la CFTR mediante foskolina (FSK) y el transporte de aniones resultante provoca cambios en el volumen del organoide. Estos cambios son observados mediante microscopía y cuantificados mediante un *software* de análisis de imágenes. Sin embargo, la disposición de la CFTR en cada modelo de organoide determina la dirección del flujo de aniones y, como consecuencia, el organoide puede incrementar o disminuir su tamaño (Figura 7). Estas variaciones son utilizadas para evaluar la función de las variantes *CFTR*, correlacionarla con el fenotipo del individuo y estudiar la respuesta a los moduladores, así como nuevos fármacos en desarrollo [77,78,87].

### **1.3 RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS**

En la función de la CFTR participan numerosas proteínas que interactúan directamente con el canal o median su activación. Estos elementos regulatorios son especialmente interesantes en la FQ, ya que su modulación podría ser una estrategia terapéutica alternativa o complementaria a los moduladores. Un ejemplo son los RAs, cuya principal vía de señalización regula la producción de AMPc e influye en la secreción de Cl<sup>-</sup> mediada por la CFTR. Los RAs pertenecen a la familia de receptores purinérgicos, cuyos miembros desempeñan funciones en la diferenciación celular [88,89], procesos inmunológicos [90,91], neuromodulación y neurotransmisión [92–94], entre otros procesos fisiológicos.

La adenosina (Ado), un nucleósido purino que se genera mediante la metabolización secuencial del ATP [95], constituye el principal ligando de los RAs. En condiciones fisiológicas normales, la concentración extracelular de Ado se mantiene en niveles bajos (20-300 nM) debido a su rápida metabolización o internalización en el espacio intracelular. Sin embargo, en situaciones de estrés celular (por ejemplo, hipoxia, inflamación, cambios metabólicos o procesos fisiológicos asociados a enfermedades), la liberación de ATP al espacio extracelular y su rápida degradación conducen a un aumento significativo en los niveles de Ado, actuando como señal de alerta para el organismo. Este incremento, que puede alcanzar concentraciones en el rango micromolar, es detectado en muestras de secreciones respiratorias de individuos afectados por la FQ [96,97].

Los RAs son GPCRs y presentan 7 dominios transmembrana. El extremo amino está ubicado en el espacio extracelular, mientras que el extremo carboxilo está orientado intracelularmente y está asociado a una proteína G (Figura 8A). Se han identificado cuatro subtipos de RAs: A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R. Cada uno de estos subtipos se acopla a una proteína G específica (Figura 8B), ejerciendo un efecto regulador, ya sea positivo o negativo, en la actividad de la AC y, por consecuencia, en los niveles de AMPc y en la actividad de la CFTR.

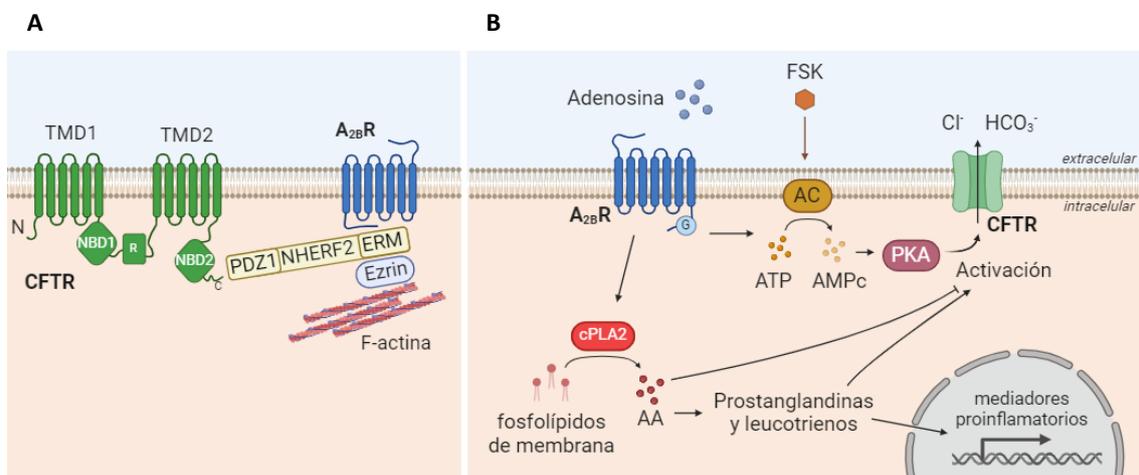


**Figura 8. Efectos en la función de la AC en respuesta a la estimulación de los distintos RAs y la expresión tisular de estos.** (A) La estimulación de A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R mediante la acción de la proteína G (G) específica provoca la activación del adenilato ciclasa (AC), mientras que A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R tienen un efecto inhibitorio. (B) Se indica qué tipo de proteína G está acoplada a cada subtipo de RAs y los cuatro tejidos con mayor expresión de cada uno de ellos. Sistema nervioso central (SNC); tracto gastrointestinal (TGI). Datos extraídos a partir de *The Human Protein Atlas*. Imagen creada con Biorender.com.

Es importante destacar que la afinidad de cada subtipo de RA por la Ado es diferente; A<sub>1</sub>R y A<sub>2A</sub>R presentan una afinidad notablemente alta, mientras que A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R muestran una afinidad relativamente menor [99,100]. Otra característica distintiva de cada subtipo es el patrón de expresión en los tejidos del organismo (Figura 8B). En las vías respiratorias, A<sub>2B</sub>R tiene una expresión predominante, seguida de A<sub>2A</sub>R [101]. En cambio, los subtipos A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R exhiben una baja expresión.

### 1.3.1 Activación de la CFTR mediante A<sub>2B</sub>R

En células epiteliales de las vías respiratorias, se ha demostrado que la activación de la CFTR requiere de niveles altos de AMPc, pero también de la integridad del citoesqueleto de actina. Para ello, la CFTR una vez está insertada en la membrana plasmática se asocia con otras proteínas formando el macrocomplejo CFTR-NHERF2-Ezrin-A<sub>2B</sub>R (Figura 9A). La CFTR en su extremo carboxilo presenta regiones PDZ1 con las que interacciona con NHERF2 (de sus siglas en inglés, *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor isoform 2*) [102,103]. NHERF2, a su vez, se une a Ezrin a través de las regiones ERM, que se encuentran en su extremo opuesto. Ezrin actúa como enlace con el citoesqueleto de actina, contribuyendo a la estabilización de la CFTR en la superficie celular y previniendo su endocitosis [104,105]. Además, se ha confirmado que Ezrin sirve como plataforma que facilita la interacción entre la PKA y CFTR durante la activación del canal [106]. Por otra parte, NHERF2 puede unirse simultáneamente a A<sub>2B</sub>R para contribuir al aumento localizado del AMPc. Esta asociación se ve favorecida tras la estimulación por Ado [107]. Este mecanismo *in vitro* ha resultado ser más eficiente en la estimulación de la secreción de Cl<sup>-</sup> mediada por CFTR que la propia FSK [108]. Sin embargo, estos resultados podrían deberse a la participación de otras vías reguladas por A<sub>2B</sub>R y podrían actuar de manera sinérgica con la vía A<sub>2B</sub>R-AC-PKA-CFTR (Figura 9B).



**Figura 9. Interacción entre CFTR y A<sub>2B</sub>R y su regulación funcional a través de la activación de A<sub>2B</sub>R.** (A) La CFTR cuando está insertada en la membrana plasmática interacciona con la proteína NHERF2 a través de las regiones PDZ1 en su extremo C-terminal. Simultáneamente, NHERF2 se une a Ezrin mediante la región ERM, lo que contribuye a la estabilización de CFTR al vincularse con las fibras de actina a través de Ezrin. NHERF2, también conocida como E3KARP o SLC9A3R2, interacciona con A<sub>2B</sub>R. (B) Representación de la cascada de señalización desencadenada por la estimulación de A<sub>2B</sub>R a través de la Ado. Imagen creada con Biorender.com.

La estimulación de A<sub>2B</sub>R se ha observado que conduce a la activación de la enzima fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2), que libera ácido araquidónico (AA) de las membranas celulares. De hecho, se ha observado que los niveles de AA están aumentados en FQ [109,110]. El AA tiene funciones contrapuestas en la regulación de la CFTR. Por un lado, puede inhibir la actividad del canal al introducirse directamente en su poro [111,112]. Por otro lado, uno de sus metabolitos, las prostaglandinas, favorece la secreción de Cl<sup>-</sup> [113]. El AA también es precursor de otros metabolitos como leucotrienos y tromboxanos que, junto con las prostaglandinas, inducen una respuesta proinflamatoria. Aunque la metabolización del AA a su vez puede dar lugar a lipoxinas, resolvinas, protectinas y maresinas, que se han asociado con efectos antiinflamatorios, en la FQ estos metabolitos se encuentran disminuidos [114]. Las funciones opuestas de los metabolitos del AA podrían explicar la dualidad del papel del A<sub>2B</sub>R en la respuesta inflamatoria.

La Ado desempeña una acción antiinflamatoria y protectora de los tejidos mediante la activación de A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R durante lesiones pulmonares agudas, mientras que en enfermedades pulmonares crónicas tiene una acción proinflamatoria y dañina para los tejidos mediante la activación de los receptores A<sub>1</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R [115]. La activación de A<sub>2B</sub>R ha demostrado mejorar el aclaramiento del líquido alveolar, mantener la integridad epitelial y reducir el proceso de apoptosis [116–118]. Por el contrario, estudios con el antagonista de A<sub>2B</sub>R BAY 60-6583, así como con la simvastina han demostrado mejoras en la función pulmonar [119,120].

En conjunto, la correcta inserción de la proteína CFTR en la membrana plasmática y la regulación de su función dependen no solo de la secuencia genética precisa del *CFTR*, sino también de la influencia de genes moduladores, interacciones con otras proteínas y de señales inducidas por la estimulación de otros receptores, como los RAs. El desarrollo de fármacos destinados a potenciar o reducir la señalización de los RAs podría ser una estrategia para mejorar la funcionalidad de la CFTR, que se ve comprometida en las personas afectadas por la FQ. Esta aproximación podría resultar especialmente beneficiosa en aquellos individuos que no responden adecuadamente a los moduladores. Para avanzar en esta dirección, el uso de modelos celulares derivados de individuos afectados, como son los organoides intestinales, permite evaluar cómo la modulación de los RAs influye en el transporte de aniones mediado por la CFTR.



## **II – Hipótesis y objetivos**



## HIPÓTESIS

La activación de la CFTR depende de los niveles de AMPc. La modulación de los receptores adenosinérgicos podría aumentar los niveles de AMPc, incrementando así la funcionalidad de la CFTR. Esta modulación se podría conseguir mediante el uso de agonistas y/o antagonistas de los distintos receptores adenosinérgicos y, por lo tanto, el uso de estos compuestos podría suponer una nueva estrategia terapéutica complementaria para la FQ.

## OBJETIVOS

**Objetivo 1.** Determinar la expresión de los subtipos de receptores adenosinérgicos en organoides intestinales y comparar los resultados obtenidos entre muestras de individuos control (no FQ) y de personas afectadas por la FQ.

**Objetivo 2.** Establecer un ensayo funcional para estudiar la implicación de la vía de los receptores adenosinérgicos en la activación de la CFTR en organoides intestinales.

**Objetivo 3.** Estudiar el efecto de agonistas y antagonistas de los distintos receptores adenosinérgicos en la función de la CFTR en organoides intestinales.



### **III – Material y métodos**



### 3.1 SUJETOS DE ESTUDIO

El proyecto presente fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), el cual se recoge en el documento PR(AG)11/2022. Todos los participantes o representantes legales de los participantes firmaron los consentimientos informados. Los individuos participantes que no presentan FQ (individuos control o WT) fueron pacientes del HUVH que requerían una intervención quirúrgica intestinal como tratamiento a otra patología intestinal previa y distinta a la FQ. En total se estudiaron 8 individuos control y 8 individuos afectados por la FQ (Tabla 1). Los individuos FQ fueron seleccionados para participar en el estudio según su genotipo (Tabla 2).

Código	Sexo	Edad
WT1	M	72
WT2	M	68
WT3	M	53
WT4	M	65
WT5	H	79
WT6	H	82
WT7	H	85
WT8	M	94
FQ1	H	15
FQ2	H	21
FQ3	M	12
FQ4	H	7
FQ5	H	15
FQ6	H	15
FQ7	H	16
FQ8	H	12

**Tabla 1. Código asignado, edad y sexo de los participantes.** WT = participantes control, que no presentan FQ; FQ = participantes afectados por la FQ; H = Hombre; M = Mujer; Edad = edad del participante en el momento de la extracción de la muestra.

Código	Genotipo	Clase	SP	FEV <sub>1</sub>	BQ	CoIC
FQ1	F508del/F508del (H)	II / II	No	112	No	No
FQ2	F508del/F508del (H)	II / II	No	80	Si	No
FQ3	F508del/L206W (M)	II / IV	Sí	112	No	No
FQ4	F508del/G542X (H)	II / I	No	90	No	No
FQ5	F508del/K684fs (H)	II / I	No	45	Sí	No
FQ6	G542X/K668X (H)	I / I	No	70	Sí	Sí
FQ7	G542X/G542X (H)	I / I	No	80	Si	Si
FQ8	S589N/1812-1G>A (H)	III/I	No	61	Si	Si

**Tabla 2. Información y características clínicas de los participantes FQ.** Las variantes se describen con la nomenclatura tradicional. Ningún sujeto está emparentado con otro participante del estudio; SP = suficiencia pancreática; FEV<sub>1</sub> = volumen espiratorio forzado en el primer segundo; BQ = bronquiectasias; CoIC = colonización crónica.

### 3.2 LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron dos líneas celulares inmortalizadas. La línea epitelial Caco-2, cedida por el grupo de investigación de Patología Mitocondrial del VHIR, deriva de un adenocarcinoma colorrectal humano. La otra línea epitelial fue Calu-3, derivada de un adenocarcinoma pulmonar humano.

#### 3.2.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	ATCC	30-2003
DMEM (1X)	ThermoFisher	1965-092
Suero bovino fetal ( <i>FBS, fetal bovine serum</i> )	ThermoFisher	10270106
Penicilina-estreptomicina (Pen/Strep)	ThermoFisher	15140122
D-PBS (1X) w/o Ca <sup>+</sup> Mg <sup>+</sup>	ThermoFisher	14190144
Tripsina (0,25%)	ThermoFisher	25050014

#### 3.2.2 Medios

- Medio de cultivo de Caco-2: DMEM + 20% FBS + 1% Pen/Strep.
- Medio de cultivo de Calu-3: EMEM + 10% FBS + 1% Pen/Strep.

#### 3.2.3 Protocolo de cultivo

Ambas líneas celulares se cultivaron en flascos T25 al inicio de su expansión y, posteriormente, en flascos T75. Cada línea se cultivó utilizando su medio específico (ver apartado 3.2.2). De forma rutinaria se cambió el medio cada 2-3 días, añadiendo 5 ml para los flascos T25 y 10 ml para los T75.

Cuando la confluencia alcanzó el 85-90%, se procedió a realizar un pase. Para ello, se retiró el medio de cultivo del flascón, se hicieron un par de lavados con D-PBS y se añadió tripsina para favorecer que las células se despegaran del flascón. En el caso de los flascos T25 se añadió 3 ml de tripsina, mientras que para los T75 se utilizaron 5 ml. A continuación, los flascos se introdujeron en el incubador durante 10-15 min a 37 °C. Con la ayuda de un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100), se comprobó que las células se hubiesen despegado. La tripsina, que también contenía las células de Caco-2 o Calu-3, se colocó en un tubo de 15 ml y se añadió suficiente D-PBS + 20% FBS hasta alcanzar un volumen de 15 ml para neutralizar la tripsina. Se centrifugó a 1.000 rpm durante 4 min a 22 °C.

El sobrenadante resultante fue descartado y el pellet se resuspendió en 1 ml del medio de cultivo específico de la línea celular con la que se estuviera trabajando. Tras hacer el conteo celular, se sembraron las células a la densidad adecuada en un nuevo flascón T25 o T75, que ya tuviese medio celular. De forma rutinaria, se cambió el medio cada 2-3 días.

### **3.3 ORGANOIDES INTESTINALES**

#### **3.3.1 Obtención de biopsias intestinales y rectales**

Las muestras biológicas de los individuos control fueron obtenidas del colon derecho durante un procedimiento quirúrgico intestinal en el HUVH. Posteriormente, fueron trasladadas al servicio de Anatomía Patológica del HUVH, donde el personal especializado se encargó de separar la parte sana de la muestra, es decir, la que no estuviese afectada por la patología por la cual el individuo fue ingresado. Esta parte sana fue procesada en el Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR) para la obtención de organoides intestinales.

Las muestras de los individuos FQ fueron obtenidas mediante biopsias rectales llevadas a cabo por el personal médico del Departamento de Cirugía Pediátrica del HUVH y dentro de la Unitat de Fibrosis Quística de HUVH. Para ello primero fue necesario la aplicación de un enema para limpiar la zona. Seguidamente, mediante succión se obtuvieron las biopsias rectales. Este procedimiento, aunque puede resultar incómodo, es indoloro, no requiere anestesia y dura aproximadamente 10 min. Se obtuvieron 4-5 biopsias de cada individuo de unos 3 mm de diámetro. Por último, se hizo un seguimiento de entre 30-60 min del paciente para observar si padecía algún efecto secundario a la extracción de la biopsia, como pudiera ser un pequeño sangrado rectal. En los casos llevados a cabo, ningún individuo presentó ningún efecto adverso.

#### **3.3.2 Procesamiento y cultivo de los organoides intestinales**

El protocolo seguido para el cultivo primario de organoides intestinales fue el mismo para todas las muestras, independientemente del procedimiento seguido para su obtención. Dicho protocolo se basa en procedimientos publicados anteriormente que han sido adaptados y ligeramente modificados [45].

### 3.3.2.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Advanced DMEM/F12	ThermoFisher	12634010
Cell Recovery Solution	Corning	354253
D-PBS (1X) w/o Ca <sup>+</sup> Mg <sup>+</sup>	ThermoFisher	14190144
EDTA (0,5 M)	ThermoFisher	AM9260G
GlutaMAX	ThermoFisher	35050038
HEPES (1M)	ThermoFisher	15630056
IntestiCult - medio de cultivo de organoides intestinales humanos	Stem Cell	6010
Matrigel Basement Membrane Matrix LDEV-free	Corning	354234
Normocin	Invivogen	ant-rp-1
Penicilina-estreptomicina (Pen/Strep)	ThermoFisher	15140122
Y-27632, inhibidor ROCK	Stem Cell	72304

### 3.3.2.2 Medios

- Medio de disección: D-PBS + 1% Pen/Strep + 1:250 Normocin.
- Medio basal: Advanced DMEM/F12 + 1% Pen/Strep + 1% HEPES + 1% GlutaMAX.
- Medio desinfectante: medio basal + 1:250 Normocin.
- Medio de extracción: D-PBS + 1% Pen/Strep + 0,02% EDTA.
- Medio de cultivo completo: Intesticult + 1% Pen/Strep.

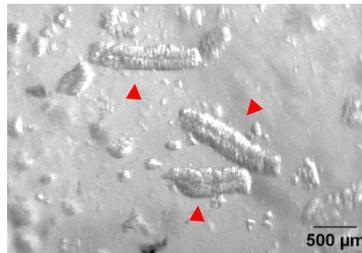
### 3.3.2.3 Protocolos

#### *3.3.2.3.1 Recepción de las biopsias y extracción de las criptas*

Las biopsias (tanto intestinales como rectales) fueron recogidas en un tubo Falcon de 50 ml con 10 ml de medio de disección frío. Se resuspendieron varias veces con una pipeta de vidrio y se dejó que sedimentaran en el fondo del tubo para luego poder retirar el sobrenadante y añadir nuevo medio de disección frío. Este procedimiento se repitió un par de veces más para terminar de limpiar bien las muestras. Seguidamente, se retiró el medio de disección y se añadieron 10 ml de medio desinfectante, dejándolo toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se procedió a la extracción de las criptas intestinales. Fue necesario que los medios estuvieran fríos y en hielo para mantener la temperatura. Primero, se retiró el medio desinfectante que contenía el tubo para poder resuspender las biopsias en 2 ml de medio de extracción. A continuación, se colocó el medio con las muestras en una placa de Petri para poder trocearlas con la ayuda de un bisturí. Los pequeños fragmentos se recogieron en un nuevo tubo Falcon de 15 ml.

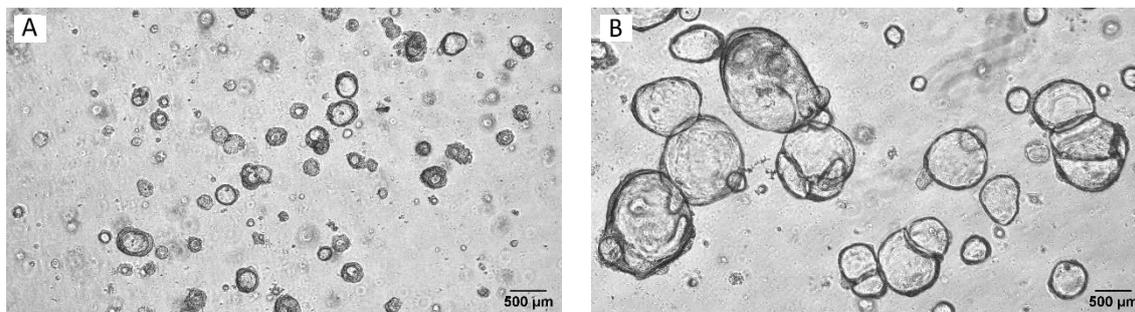
Con la ayuda de más medio de extracción, se lavó la placa Petri para acabar de recuperar los restos que pudieran quedar en esta. Se añadió más medio de extracción para llegar a tener 10 ml y se incubó durante 30 min a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó el tubo a 1.400 rpm durante 4 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 4 ml de medio de extracción, y se agitó el tubo de forma manual para poder extraer las criptas de las biopsias. En este paso, las criptas quedaron en el sobrenadante (Figura 10) y los grandes restos celulares de la biopsia (restos de mucosa y de músculo intestinal) sedimentaron en el fondo del tubo. Para que los restos sedimentaran se dejó unos segundos y, a continuación, se trasladó el sobrenadante a un nuevo tubo Falcon de 15 ml previamente humedecido con medio basal. Es importante humedecer el nuevo tubo para facilitar el deslizamiento de las criptas al fondo del tubo y evitar que puedan quedar adheridas en las paredes.



**Figura 10. Criptas extraídas de una biopsia intestinal.** Imagen obtenida con un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100) a un aumento de 4X.

Para poder extraer el máximo número de criptas, se volvió a añadir 4 ml de medio de extracción al tubo con todos los restos celulares y se agitó nuevamente de forma manual. Se traspasó el sobrenadante al mismo tubo donde se recogieron las criptas anteriores. Terminado este paso, se centrifugó el tubo a 1.400 rpm durante 4 min a 4°C, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con Matrigel y medio basal en una proporción 1:1 para realizar a continuación la siembra. La placa de 24 pocillos donde se realiza la siembra es importante que esté previamente calentada a 37°C durante un mínimo de 24 h para facilitar el proceso de solidificación del Matrigel. Se realizó primero la siembra de una gota de 10 µl para comprobar en el microscopio que la concentración de organoides sembrados no fuera muy alta, es decir, que hubiese suficiente espacio entre ellos. En caso contrario, se añadió más Matrigel 1:1 al pellet para disminuir la concentración. Se terminó de sembrar todo el pellet en gotas de 10 µl y, posteriormente, se incubó la placa 10 min a 37°C. Pasado este tiempo, se añadieron 550 µl de medio de cultivo completo + 1:250 Normocin + 10 µM Y-27632. A los dos días, se cambió el medio y se añadió únicamente medio de cultivo. De forma rutinaria, se cambió el medio de cultivo cada 2-3 días.

Aproximadamente cada 7-10 días es necesario renovar el Matrigel. Para ello se lleva a cabo el "protocolo de pase", detallado en el siguiente apartado. En los casos en que, aunque no haya transcurrido este tiempo, se observa unos organoides de grandes dimensiones, también es necesario realizar este protocolo para garantizar el buen crecimiento de los organoides y que dispongan del espacio suficiente dentro de la gota de Matrigel (Figura 11).



**Figura 11. Organoides intestinales control en cultivo.** (A) Organoides con un tamaño idóneo. (B) Organoides con un tamaño excesivamente grande, indicativo de la necesidad de realizar el protocolo de pase. Imágenes obtenidas con un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100) a un aumento de 4X.

#### 3.3.2.3.2 Protocolo de pase

Todo el procedimiento se debe de realizar con los medios en frío y siempre en hielo. El protocolo se inició con la retirada del medio de cultivo del pocillo para añadir 300  $\mu$ l de *Cell Recovery Solution* (en el caso de que la placa fuese de 24 pocillos). Este producto ayuda a la disgregación del Matrigel. Se dejó la placa 30 min a 4°C sobre un agitador horizontal a 25 rpm.

Seguidamente, se colocó el *Cell Recovery Solution* (que contiene los organoides y los restos de Matrigel) en un tubo Falcon de 15 ml previamente humedecido con medio basal. En este punto, se utilizó más medio basal para terminar de trasladar los organoides que hubieran podido quedar en el pocillo. Seguidamente, se centrifugó el tubo a 1.400 rpm durante 4 min a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Se añadieron entre 200-300  $\mu$ l de medio basal al tubo y con una pipeta de 200 se disgregaron los organoides pipeteando arriba y abajo el tiempo necesario hasta conseguir reducir el tamaño de los organoides. Para hacer un control de la disgregación, es necesario ir comprobando el tamaño de organoides mediante un microscopio óptico invertido. Al alcanzar el tamaño idóneo (como el que se muestra en la Figura 11A, o incluso un poco más pequeños), se añadió más medio basal hasta alcanzar los 3 ml y se volvió a centrifugar el tubo.

El pellet resultante fue resuspendido con Matrigel y medio basal (1:1) para su siembra en gotas de 10 µl en una placa previamente calentada.

En este caso, el tamaño de la placa dependió de la cantidad de organoides que se tuviese, pudiendo utilizarse placas de 24, 12 y 6 pocillos. Se incubó la placa 10 min a 37°C y se añadieron 550 µl, 750 µl o 2 ml de medio de cultivo completo + 10 µM Y-27632, dependiendo del tipo de placa utilizada. Pasados dos días, se cambió el medio y se añadió únicamente medio de cultivo. De forma rutinaria, se cambió el medio cada 2-3 días.

### 3.3.3 Ensayo funcional *in vitro* de los organoides intestinales

El ensayo funcional empleado en este proyecto para estudiar la funcionalidad de la CFTR es una adaptación del ensayo FIS, ampliamente utilizado en organoides intestinales en el campo de la FQ [121]. Este ensayo se basa en la activación directa de la AC mediante la adición de FSK. Como consecuencia, se produce un aumento de los niveles de AMPc que conducen a la activación de la CFTR. De manera que, se produce un transporte de aniones mediado por la CFTR hacia el interior del organoide, lo que provoca un cambio de tamaño y visualmente los organoides aumentan. Este cambio es cuantificable mediante la captura de imágenes de los organoides por microscopía a lo largo del tiempo después de la adición de la FSK, tras lo cual se analiza el área de los mismos, como se detalla en el apartado 3.3.3.3.

#### 3.3.3.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Advanced DMEM/F12	ThermoFisher	12634010
Calceína verde	BD Bioscience	564061
CFTR Inh-172	Merck	219670
Compuestos PBF (Palobiofarma S.L.)	-	-
Dimetilsulfóxido (DMSO)	ThermoFisher	D12345
Forskolina (FSK)	Merck	F6886-10MG
GlutaMAX	ThermoFisher	35050038
HEPES (1M)	ThermoFisher	15630056
IntestiCult - medio de cultivo de organoides intestinales humanos	Stem Cell	6010
5'-(N-Ethylcarboxamida)adenosina (NECA)	Sigma	E2387
Penicilina-estreptomicina (Pen/Strep)	ThermoFisher	15140122
VX-445	Selleckchem	S8851
VX-661	Selleckchem	S7059
VX-770	Selleckchem	S1144

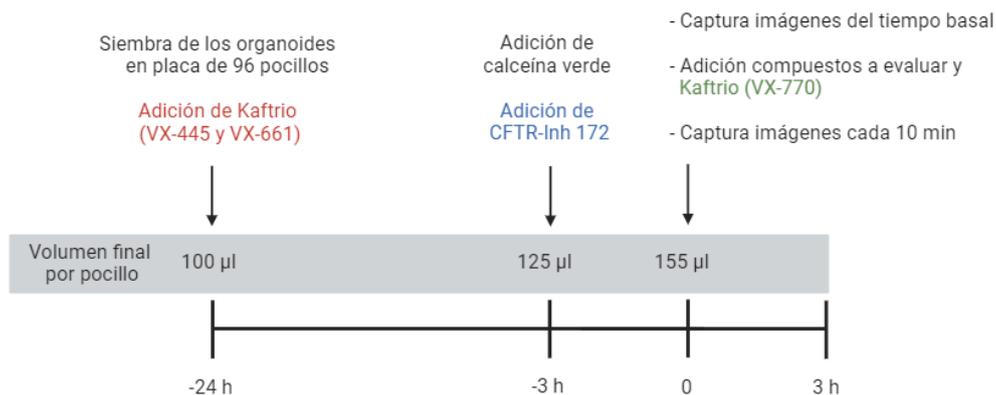
### 3.3.3.2 Protocolo

Para llevar a cabo el experimento funcional, los organoides deben estar en cultivo durante un período mínimo de un mes y habiendo realizado entre 3-4 protocolos de pases. Veinticuatro horas antes de iniciar el ensayo, los organoides se sembraron en una placa de 96 pocillos, siguiendo los mismos pasos detallados en el protocolo de pase (ver apartado 3.3.2.3.2), con un par de modificaciones.

La primera variación afecta al tiempo de incubación para calentar la placa antes de la siembra, reduciéndolo a 2h. Hemos observado que esta reducción facilita que un mayor número de organoides se ubiquen en un mismo plano dentro de la gota de Matrigel, mejorando así su visualización por microscopía y su posterior análisis. La segunda modificación consiste en sembrar un volumen menor de la dilución de organoides en Matrigel. En lugar de sembrar 10  $\mu$ l, se utilizaron 3  $\mu$ l. Además, la placa utilizada para la siembra fue de 96 pocillos, lo que permite estudiar un mayor número de condiciones en un solo ensayo. Para cada condición, se realizaron dos réplicas, es decir, se emplearon dos pocillos. De esta manera, en una única placa de 96 fue posible estudiar hasta 48 condiciones.

Los procedimientos seguidos durante la preparación del ensayo funcional varían según el tipo de condición (Figura 12). En términos generales:

- Tras la siembra de los organoides, se agregaron 100  $\mu$ l de medio de cultivo completo a cada pocillo. En los pocillos destinados a evaluar la condición con Kaftrio (compuesto por VX-445, VX-661 y VX-770) fue necesario disolver los correctores (VX-445 y VX-661 a 3  $\mu$ M cada uno) en estos 100  $\mu$ l.
- En el caso de utilizar el inhibidor CFTR (CFTR Inh-172), 3h antes de iniciar el ensayo funcional se agregaron 25  $\mu$ l de este inhibidor, en medio de cultivo completo, para obtener una concentración final de 50  $\mu$ M (volumen final de 125  $\mu$ l).
- Para la visualización de los organoides y su análisis, se empleó un marcador citoplasmático de células vivas, conocido como calceína verde. Aproximadamente 30 min antes de iniciar el ensayo funcional, se añadieron 5  $\mu$ l de calceína verde a todos los pocillos, para obtener una concentración final de 2  $\mu$ M, independientemente de la condición a evaluar, y se incubó la placa a 37°C.



**Figura 12. Esquema cronológico del ensayo funcional *in vitro* con organoides intestinales.** Se indica cuándo se sembraron los organoides y se añadieron los compuestos de cada condición en referencia al tiempo basal (T0), correspondiente al momento en que se realizó la primera ronda de captura de imágenes de los pocillos. Esta primera ronda sirvió para determinar el tamaño basal de los organoides. El inhibidor de CFTR (en azul) fue necesario añadirlo 3h antes del T0. Los correctores que forman parte de la combinación Kaftrio (VX-445 y VX-661, en rojo) se debieron añadir 24h antes de T0, mientras que el potenciador VX-770 (en verde) se añadió junto con los compuestos que se evaluaron, justo después de la captura de imágenes del T0.

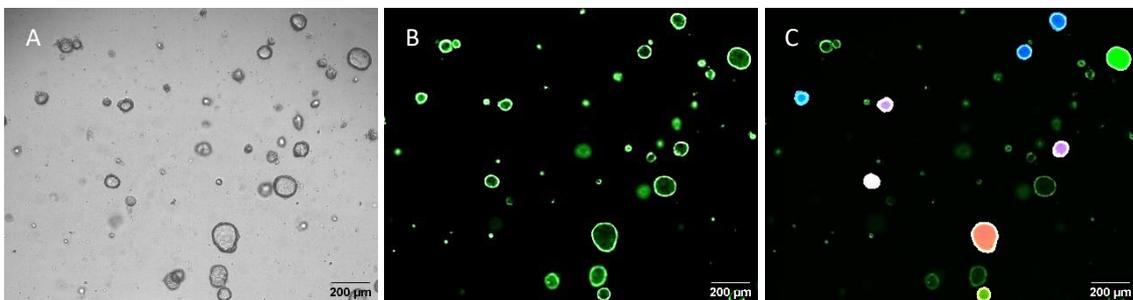
Pasados los 30 min de incubación de la calceína verde, se insertó la placa en la platina del microscopio, se alineó y se seleccionaron los campos de interés. El microscopio utilizado para este ensayo funcional fue el microscopio multidimensional *widefield Thunder Imager 3D cell culture* de la casa comercial Leica. Para las condiciones de ensayo, el microscopio debía mantener una temperatura constante de 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Se empleó el objetivo 5X, con una resolución de 2048x2048 píxeles y 16 bits. De cada pocillo se capturaron dos tipos de imágenes: una en campo claro y otra en emisión de fluorescencia para detectar la calceína verde (475 nm de excitación y 506-532 nm de emisión). Ambas imágenes corresponden a un único y mismo plano del eje Z.

Estas imágenes contenían entre 20-30 organoides, de manera que al realizar 2 réplicas por condición se estudiaron entre 40-60 organoides por condición. Una vez seleccionados los campos de interés de cada pocillo, se realizó una primera ronda de capturas, denominada tiempo basal (T0). A continuación, se añadieron los 50 µl de los compuestos a evaluar (DMSO, FSK, NECA, compuestos Palobiofarma) así como el potenciador de Kaftrio (VX-770), y se realizaron varias rondas de captación. Estas rondas se realizaron cada 10 min (T10, T20, T30, etc.) hasta alcanzar las 3h (un total de 19 capturas por pocillo) en los mismos campos previamente seleccionados para el T0.

### 3.3.3.3 Análisis de las imágenes

Para el análisis de las imágenes obtenidas durante el ensayo funcional, se utilizó el *software* ImageJ/FIJI-64 [122]. Las áreas de los organoides se calcularon automáticamente mediante una herramienta desarrollada para esta función por un colaborador externo al grupo (Sébastien Tosi, de Institute for Research in Biomedicine en Barcelona). Para la aplicación de esta herramienta, es necesario seleccionar previamente los organoides que se desean analizar. Posteriormente, el programa asigna automáticamente un color diferente a cada organoide seleccionado para facilitar su identificación (Figura 13). Al concluir el análisis, el programa genera una tabla de datos que indica el área de cada organoide ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada captura realizada. Estos datos se trasladaron posteriormente a una hoja de cálculo para normalizarlos: el área a T0 de cada organoide se normalizó a 100, y los valores siguientes (a T10, T20, etc.) se calcularon con respecto a su valor basal [121].

Finalmente, se calculó el área bajo la curva (AUC) con base  $Y=100$  utilizando el software GradPad Prism versión 8 (GraphPad Software, v 8.0, San Diego, CA, USA), incluyendo los picos que se encontraron por debajo del valor basal. De las AUC calculadas, se seleccionaron los valores de *net area*.



**Figura 13. Análisis automático del área de los organoides intestinales mediante la macro para el programa ImageJ/FIJI-64.** Se presenta una imagen representativa de organoides intestinales control. De cada campo seleccionado se realiza una captura en un único plano Z en campo claro (A) y en fluorescencia (B) para detectar la señal de calceína. La macro asigna una identificación colimétrica y numérica (C) de los organoides seleccionados, permitiendo el seguimiento preciso de los cambios en el área de cada organoide que pudieran experimentar cada 10 min, como consecuencia de la activación de la CFTR. Una vez que el programa finaliza la cuantificación, este indica los valores obtenidos del área de cada organoide seleccionado y en cada tiempo.

### 3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 3.4.1 Extracción de ARN y purificación

##### 3.4.1.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Advanced DMEM/F12	ThermoFisher	12634010
Agua libre de ADNasa/ARNasa	Invitrogen	10977-035
Cloroformo	VWR	22706.292
Dimetilsulfóxido (DMSO)	ThermoFisher	D12345
Etanol absoluto	VWR	20821.310
GlutaMAX	ThermoFisher	35050038
HEPES (1M)	ThermoFisher	15630056
Kit de extracción de ARN ( <i>RNeasy Mini Kit</i> )	Qiagen	74104
Kit de purificación ( <i>RNase-free DNase</i> )	Qiagen	79254
Trizol	ThermoFisher	15596026

##### 3.4.1.2 Protocolo

Los organoides se cultivaron en una placa de 6 pocillos, siguiendo los protocolos del apartado 3.3.2.3. Para la extracción de ARN se utilizó un pocillo completamente lleno. Tras disgregar el Matrigel se centrifugó a 1.400 rpm, durante 4 min a 4°C. Se añadió 1 ml de Trizol y se dejó 10 min a temperatura ambiente para lisar las células. Se colocó el contenido del tubo a un eppendorf de 1.5 ml, y se almacenaron las muestras a -80°C hasta su análisis. Una vez se obtuvieron todas las muestras que se quisieron estudiar, estas se descongelaron en hielo para iniciar el protocolo de extracción de ARN. Para ello, primero se añadió 200 µl de cloroformo por eppendorf. Se mezcló suavemente por inversión durante 15 seg y se dejó entre 2-3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1.000 rpm durante 2 min a 4°C, y se obtuvieron 3 fases diferentes: una en la parte más basal del eppendorf correspondiente a los restos celulares (proteínas); una fase intermedia correspondiente al ácido desoxirribonucleico (ADN) de la muestra; y en la parte más superior, una fase más acuosa correspondiente al ARN. Se transfirió con cuidado esta fase acuosa a un nuevo eppendorf y se añadió etanol al 70%. El volumen de etanol añadido fue el necesario para obtener una proporción 1:1 con la fase acuosa. Se mezcló durante 15 seg en un vórtex y el contenido se transfirió a una columna del kit de extracción de ARN, siguiendo el protocolo indicado para células animales. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 seg a 4°C, y se descartó el líquido eluido. Las siguientes centrifugaciones se realizaron en estas mismas condiciones, salvo que se especifique lo contrario. Las siguientes etapas de la técnica se realizaron en frío (en hielo) para evitar la degradación del ARN. Se añadieron 350 µl del buffer RW1 a la columna, se centrifugó y se descartó el eluido.

En otro eppendorf se mezclaron 10 µl de ADNasa I y 70 µl del buffer RDD. Se mezcló por inversión lentamente y se añadieron los 80 µl a la columna. Se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente. Este paso sirvió para eliminar los posibles restos de ADN que pudieran contener las muestras de ARN de los organoides. Pasado el tiempo de incubación, se añadieron 350 µl de buffer RW1, se centrifugó y se descartó el eluido. Se añadieron 500 µl de buffer RPE, se centrifugó y se descartó el eluido. Se volvió a añadir 500 µl de buffer RPE y se centrifugó, esta vez a 12.000 rpm durante 15 seg a 4°C. Se descartó el eppendorf y se incorporó a la columna un nuevo eppendorf. Se volvió a centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min para eliminar cualquier residuo en la columna. Se volvió a cambiar el eppendorf, se añadieron 30 µl de agua libre de ADNasa/ARNasa a la columna y se centrifugó a 12.000 rpm durante 1 min y a 4°C. Por último, se recogió el eluido para estudiar la integridad y pureza del ARN con un espectrofotómetro de microvolumen Nanodrop-2000 uV-Vis (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Las muestras de ARN con ratios de  $A_{260}/A_{280}$  entre 1.8 y 2.1 fueron consideradas aceptables para la síntesis de ADN complementario (ADNc).

### 3.4.2 Síntesis de ADN complementario

#### 3.4.2.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Agua libre de ADNasa/ARNasa	Invitrogen	10977-035
Kit de transcripción reversa ( <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription</i> )	ThermoFisher	4374966

#### 3.4.2.1 Protocolo

La síntesis de ADNc se realizó inmediatamente después de la extracción de ARN para evitar su posible degradación debido a la congelación/descongelación. Durante todo el procedimiento, las muestras se mantuvieron en frío (en hielo). Se preparó la *master mix* con los componentes disponibles en el kit de transcripción reversa, siguiendo el protocolo del fabricante: 2 µl de 10X RT buffer + 0.8 µl de 25X dNTP mix + 2 µl de 10X RT cebadores aleatorios (*random primers*) + 1 µl de enzima transcriptasa inversa + 1 µl de inhibidor de ARNasa + 3.2 µl de agua libre de nucleasas. Se diluyeron 10 µl de cada muestra, a una concentración de 180 ng/µl, en 10 µl de *master mix* en tubos para PCR. La retrotranscripción se realizó en un termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™) de 96 pocillos (20 µl por pocillo) y se programó con los siguientes parámetros: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C y 5 min a 85°C. Una vez finalizado el proceso, las muestras amplificadas se almacenaron a -20°C hasta el día siguiente, momento en el que se realizó la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

### 3.4.3 RT-qPCR

#### 3.4.3.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Agua libre de ADNasa/ARNasa	Invitrogen	10977-035
TaqMan Assay para <i>PPIA</i>	ThermoFisher	Hs99999904_m1
TaqMan Assay para <i>A<sub>1</sub>R (ADORA1)</i>	ThermoFisher	Hs00181231_m1
TaqMan Assay para <i>A<sub>2A</sub>R (ADORA2A)</i>	ThermoFisher	Hs00169123_m1
TaqMan Assay para <i>A<sub>2B</sub>R (ADORA2B)</i>	ThermoFisher	Hs00386497_m1
TaqMan Assay para <i>A<sub>3</sub>R (ADORA3)</i>	ThermoFisher	Hs00181232_m1
TaqMan Fast Advanced Master Mix	ThermoFisher	4444556

#### 3.4.3.2 Protocolo

Se prepararon las diluciones específicas para la detección de cada gen, como se indica en la guía de ensayos de expresión genética TaqMan (ThermoFisher) para una placa de 384 pocillos: 5 µl de TaqMan Fast Advanced Master Mix + 0,5 µl de TaqMan Assay + 3,5 µl Agua libre de ADNasa/ARNasa + 1 µl de la muestra (ADNc). En total fueron 10 µl por pocillo.

Se realizaron 3 réplicas por cada condición. Se utilizó el termociclador LightCycler480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics) con los siguientes parámetros:

Fase de la PCR	Preincubación	Activación de la polimerasa	40 ciclos	
			Desnaturalización	Alineamiento/extensión
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C
Tiempo	2 min	2 min	3 seg	30 seg

#### 3.4.3.3 Análisis

Para calcular la expresión génica relativa de cada gen, se utilizó el método delta-delta CT [123], utilizando como gen de referencia el *peptidil prolil isomerasa A (PPIA)*. Se consideró que un gen no estaba expresado si no se detectaba amplificación a partir del ciclo 40 (inclusive).

### 3.4.4 ELISA

#### 3.4.4.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Agua libre de ADNasa/ARNasa	Invitrogen	10977-035
Ácido clorhídrico (HCl) 1M	FisherScientific	35328
Clorhidrato de papaverina, inhibidor de PDE10A	Abcam	ab144859
Dimetilsulfóxido (DMSO)	ThermoFisher	D12345
Forskolina (FSK)	Merck	F6886-10MG
5'-(N-Ethylcarboxamida)adenosina (NECA)	Sigma	E2387
Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce	Thermofisher	23225
Kit ELISA competitivo AMPc	Cayman Chemical	581001

#### 3.4.4.2 Protocolo

Los organoides se cultivaron en una placa de 6 pocillos, siguiendo los protocolos del apartado 3.3.2.3. Para cada una de las tres condiciones (DMSO, FSK y NECA) se utilizaron dos pocillos completamente llenos.

Tras disgregar el Matrigel, se traspasaron los organoides a un tubo Falcon de 15ml (uno por cada condición, en total tres). Se centrifugaron a 1.400 rpm, durante 4 min a 4°C y se retiró el sobrenadante. A cada tubo se añadió 150 µM de clorhidrato de papaverina disueltos en 10 ml de medio basal (descrito en el apartado 3.3.2.2) y se incubaron 1h a 37 °C.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1.400 rpm, durante 4 min a 22°C y se retiró el sobrenadante. A cada tubo se añadió 150 µM de clorhidrato de papaverina disueltos en 5 ml, junto con DMSO (<0,01%), FSK (10 µM) o NECA (10 µM) según la condición a testar, y se dejaron incubar los tubos durante 15 min a 37°C. Seguidamente, se volvieron a centrifugar a 1.400 rpm, durante 4 min a 22°C para después retirar el sobrenadante y añadir 1 ml de HCl al 0,1 M a cada tubo. Tras una incubación de 20 min a temperatura ambiente, se volvió a centrifugar a 1.000 rpm, durante 5 min a 22°C y el sobrenadante se traspasó a un eppendorf. Seguidamente, se diluyó el sobrenadante de cada eppendorf a 1:1 con el tampón específico del kit del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el Kit de Ensayo de Proteínas BCA de Pierce. Tras normalizar la cantidad de proteínas para que todas las condiciones tuvieran la misma concentración, se siguieron las instrucciones del kit para la realización del ELISA. En este caso, las muestras y las diluciones estándares fueron acetiladas, según estipulaba el protocolo, para poder llegar a detectar bajas concentraciones de AMPc. Finalmente, se utilizó el lector de microplacas Varioskan LUX para medir la absorbancia a 412 nm.

#### 3.4.4.3 Análisis

Los valores de absorbancia fueron corregidos según las indicaciones del kit. A partir de los valores de absorbancia de las diluciones estándar se obtuvo la recta patrón con la que se pudo calcular la concentración de AMPc (pmol/ml) de las condiciones estudiadas.

### **3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los ensayos estadísticos de comparación entre condiciones se realizaron mediante un test Two-way ANOVA. Se consideran significativos aquellos p-valores que fuesen  $< 0.05$ . El rango de significancia se indicó mediante asteriscos, siendo: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



## **IV – Resultados**

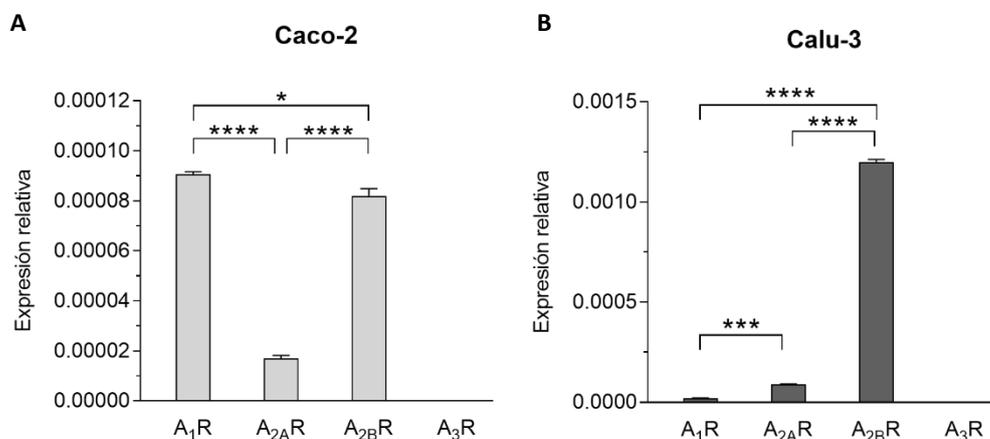


## 4.1 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS EN ORGANOIDES INTESTINALES

### 4.1.1 Análisis de expresión de los RAs en líneas celulares inmortalizadas

Para el análisis de la expresión de los cuatro subtipos de RAs: A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R se utilizó la técnica de RT-qPCR y se validaron las sondas comerciales disponibles. Para ello se utilizaron dos líneas celulares inmortalizadas comerciales: Caco-2 (derivada de un adenocarcinoma colorrectal humano) y Calu-3 (derivada de un adenocarcinoma pulmonar humano).

En la Figura 14, se observa como Caco-2 y Calu-3 presentaron distintos patrones de expresión de los RAs. En el caso de Caco-2, el subtipo A<sub>1</sub>R fue el predominante (Figura 14A). A<sub>2B</sub>R fue el segundo subtipo con mayor expresión, con una expresión un 9,05% menor respecto a A<sub>1</sub>R (p-valor = 0,0274). A<sub>2A</sub>R presentó una expresión 5 veces menor que a A<sub>1</sub>R mientras que A<sub>3</sub>R no se detectó. En cambio, en Calu-3 el RA predominante fue A<sub>2B</sub>R mientras que el segundo subtipo fue A<sub>2A</sub>R (Figura 14B). A<sub>1</sub>R fue el tercer subtipo con mayor expresión. Por el contrario, el A<sub>3</sub>R no presentó ninguna señal.

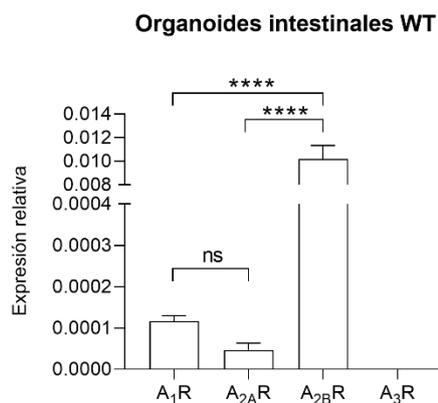


**Figura 14. Expresión génica de los distintos subtipos de RAs en las líneas celulares Caco-2 y Calu-3. (A)** Niveles de expresión de los cuatro subtipos de RAs en la línea celular intestinal Caco-2 (n=3). **(B)** Niveles de expresión de los cuatro subtipos de RAs en la línea celular respiratoria Calu-3 (n=3). Los niveles de expresión de A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R se determinaron mediante la normalización con la expresión del gen de referencia *PPIA*. La barra de cada columna representa el error estándar de la media (SEM) y el nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001.

#### 4.1.2 Análisis de expresión de los RAs en organoides intestinales control

Una vez puesto a punto y validado el método de estudio de expresión de los RAs en las líneas celulares, se realizó el análisis de expresión de los distintos subtipos de RAs en organoides intestinales generados a partir de biopsias intestinales de individuos WT (ver apartado 3.3).

A<sub>2B</sub>R fue el receptor con mayor expresión mientras que A<sub>1</sub>R presentó una expresión génica 87 veces menor (Figura 15). A<sub>2A</sub>R fue el tercer receptor por orden de expresión y no presentó diferencias significativas respecto a A<sub>1</sub>R (p-valor = 0,6128). Por el contrario, no se detectó expresión de A<sub>3</sub>R.

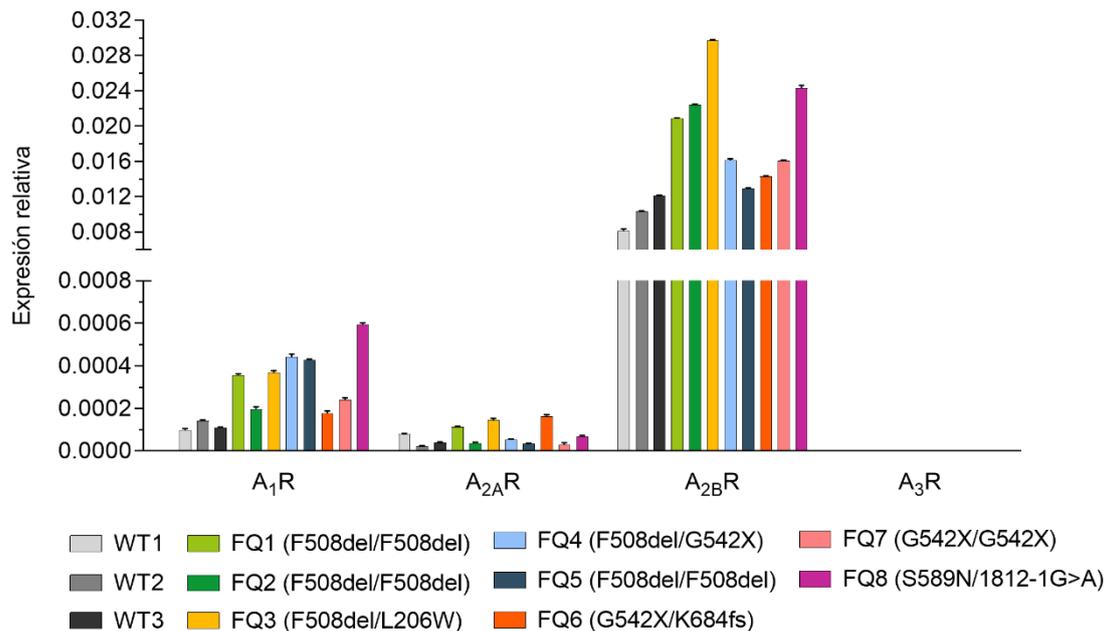


**Figura 15. Expresión génica de los distintos subtipos de RAs en organoides intestinales derivados de individuos WT.** Los niveles de expresión de A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R se determinaron mediante la normalización con la expresión del gen de referencia *PPIA*. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=3).

#### 4.1.3 Expresión de los RAs en organoides intestinales FQ

Se analizó el perfil de expresión de los RAs en organoides intestinales FQ. Se generaron organoides intestinales a partir de biopsias rectales de 8 personas afectadas por la FQ de la Unidad Pediátrica de Fibrosis Quística del HUVH. Estos individuos presentaban diferentes genotipos, como se indica en la Tabla 2 (ver apartado 3.1). En todos ellos, el subtipo de RAs con mayor expresión fue A<sub>2B</sub>R (Figura 16). Sin embargo, se observó una variabilidad de expresión significativa entre los distintos individuos estudiados, a excepción de FQ4 (F508del/G542X) y FQ7 (G542X/G542X), que presentaron niveles de A<sub>2B</sub>R similares. Esta variabilidad incluso se observó en individuos con el mismo genotipo (FQ1 y FQ2, homocigotos de F508del-*CFTR*) con un p-valor de <0,0001.

### Organoides intestinales WT y FQ



**Figura 16. Expresión génica de los distintos RAs en organoides intestinales derivados de individuos WT y FQ.** Se estudiaron tres individuos control y ocho individuos afectados por la FQ con los genotipos F508del/F508del (FQ1 y FQ2), F508del/L206W (FQ3), F508del/G542X (FQ4), F508del/K684fs (FQ5), G542X/K668X (FQ6), G542X/G542X (FQ7) y S589N/1812-1G>A (FQ8). Los niveles de expresión de A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R se determinaron mediante la normalización con la expresión del gen de referencia *PPIA*. La barra de cada columna representa el SEM y el nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001. (WT n=3; FQ n=8).

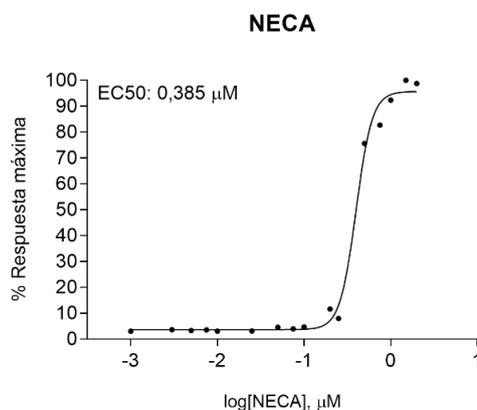
Al comparar la expresión génica de A<sub>2B</sub>R en cada individuo FQ respecto al promedio obtenido en los organoides intestinales WT, se observó que la expresión en los individuos FQ fue significativamente mayor (con un p-valor en cada una de las comparaciones de <0,0001).

A<sub>1</sub>R fue el segundo receptor con mayor expresión. Al comparar el individuo con mayor expresión (FQ8), con los cuatro individuos FQ con menor expresión (FQ2, FQ6 y FQ7) se detectaron diferencias significativas (p-valores = 0,0146; 0,0203; 0,0081 y 0,0450, respectivamente). Al comparar el valor promedio de la expresión génica de A<sub>1</sub>R en organoides WT con la expresión obtenida en cada individuo FQ, se observó una menor expresión de A<sub>1</sub>R en los organoides WT, pero sin diferencia significativa en ningún caso.

El tercer receptor con mayor expresión fue  $A_{2A}R$ , del que no se observaron diferencias significativas entre los individuos FQ estudiados (en todos los casos el p-valor fue mayor a 0,9497). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas al comparar los valores de expresión de  $A_{2A}R$  obtenidos de cada individuo FQ con el promedio obtenido en WT. Por último, no se detectaron niveles de expresión génica de  $A_3R$  en ninguno de los individuos FQ estudiados. En la Figura A1 de los Anexos (ver apartado 9.1) se detalla el perfil de expresión de los cuatro subtipos de RAs de cada individuo WT y FQ estudiados.

#### 4.1.4 Adaptación del ensayo funcional FIS para estudiar la respuesta de la CFTR tras la activación de los RAs en organoides intestinales control

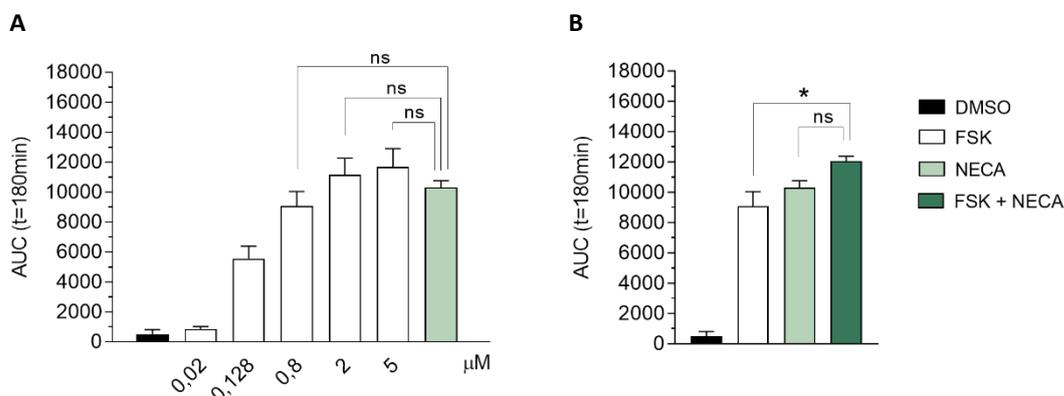
Con el objetivo de expandir el alcance del ensayo FIS y poder evaluar la respuesta de la CFTR tras la activación de los RAs (ver apartado 3.3.3), se decidió emplear NECA, un agonista no selectivo de los cuatro subtipos de RAs, como sustituto a la FSK, ya que el objetivo era activar los RAs que supondrían una activación posterior de la AC y no activar directamente la AC. Se optimizó el método y para ello se determinó la concentración efectiva (EC50) de NECA en organoides intestinales WT. El valor obtenido fue de 0,385  $\mu\text{M}$ , como se muestra en la Figura 17.



**Figura 17. Estudio de la EC50 de NECA en organoides intestinales WT.** Se utilizaron 16 concentraciones de NECA (0,001/0,003/0,005/0,0075/0,01/0,025/0,05/0,075/0,1/0,2/0,25/0,5/0,75/1/1,5/2  $\mu\text{M}$ ). El efecto de NECA en los organoides se cuantificó mediante la medición de los cambios en el área de cada organoide estudiado tras realizar el ensayo funcional FIS (ver apartado 3.3.3). Se estudiaron entre 40-60 organoides intestinales en cada concentración derivados de cada uno de los cuatro individuos WT estudiados. Los cambios de área fueron normalizados en relación con su área inicial, antes de la incubación con NECA. Seguidamente, se calculó el área bajo la curva (AUC) a tiempo 180 min. Con el fin de facilitar su representación gráfica, los valores de AUC se normalizaron nuevamente respecto al valor máximo obtenido, que se observó a una concentración de NECA de 1,5  $\mu\text{M}$ , para así poder indicar la respuesta en porcentaje. (n=4).

Con el fin de saber a qué nivel de respuesta de FSK equivale la respuesta obtenida con NECA a 0,385  $\mu\text{M}$  en organoides intestinales WT, se realizó un ensayo funcional donde se comparó la respuesta inducida por NECA  $\mu\text{M}$  a 0,385  $\mu\text{M}$  con cinco concentraciones distintas de FSK (Figura 18A). El valor promedio de la respuesta con NECA (AUC = 10.323,1) se encontró entre la respuesta obtenida con FSK a 0,8  $\mu\text{M}$  (AUC = 9.089,2) y con FSK a 2  $\mu\text{M}$  (11.145,4). Al comparar estadísticamente estas respuestas de FSK con la de NECA, no dio significativo (p-valor = 0,8943 y 0,9859). Además, dado que la respuesta de FSK a 5  $\mu\text{M}$  no fue significativamente mayor a la obtenida a FSK 2  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,9979), tampoco dio significancia cuando se comparó la respuesta obtenida en los organoides tras el uso de FSK 5  $\mu\text{M}$  con el de NECA a 0,385  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,7009).

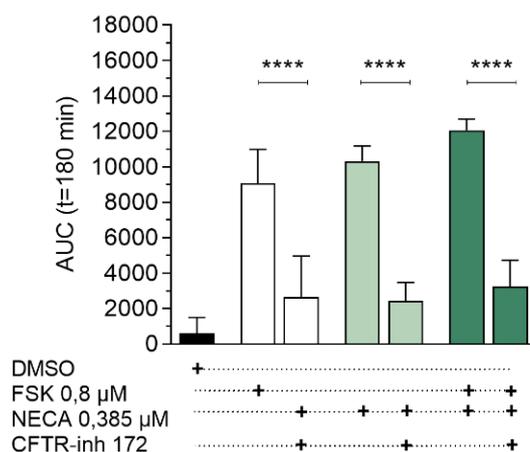
Del mismo modo, también se quiso determinar si existía un efecto sinérgico entre FSK y NECA (Figura 18B). Al combinar FSK a 0,8  $\mu\text{M}$  y NECA a 0,385  $\mu\text{M}$  la respuesta media de los organoides (AUC = 12.070,1) fue superior a la obtenida con FSK a 0,8  $\mu\text{M}$  (AUC = 9.089,2) y NECA 0,385  $\mu\text{M}$  (AUC = 10.323,1), sin combinarlas. La respuesta combinada dio significación únicamente al compararla con FSK 0,8  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,0282).



**Figura 18. Comparación de las respuestas producidas por FSK y NECA en organoides intestinales WT.**

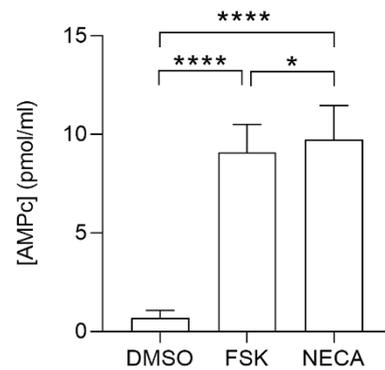
(A) Se evaluó el efecto que producían diferentes concentraciones de FSK (0,02/0,128/0,8/2/5  $\mu\text{M}$ ) y de NECA (0,385  $\mu\text{M}$ ) en organoides intestinales derivados de individuos WT (n=4). (B) Comparación de la respuesta observada en organoides intestinales derivados de individuos WT ante la combinación de FSK a 0,8  $\mu\text{M}$  y NECA 0,385  $\mu\text{M}$  y el uso de estos compuestos en las mismas concentraciones por separado, es decir, de forma individual (n=4). Como control negativo se utilizó DMSO (a <0,001%). En ambas figuras, el efecto de los compuestos utilizados se cuantificó en base a los cambios de área de los organoides intestinales y normalizados respecto a su área antes de añadir los compuestos. Seguidamente, se calculó las AUC a tiempo 180 min. Por cada individuo estudiado y condición se evaluaron entre 40-60 organoides. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo.

Con el objetivo de atribuir los cambios observados en el área de los organoides intestinales WT a una activación específica de la CFTR, se llevó a cabo un estudio funcional en el que se inhibió de forma selectiva la función del canal (Figura 19). En presencia del inhibidor de la CFTR (CFTR-Inh172), la respuesta observada tras la incubación con NECA disminuyó significativamente en comparación con la respuesta obtenida sin el inhibidor ( $p$ -valor =  $<0,0001$ ). Este efecto inhibitorio se confirmó mediante el uso de FSK como control positivo, ya que la disminución observada también fue significativa ( $p$ -valor =  $<0,0001$ ). La inhibición de la CFTR también provocó una disminución de la respuesta de los organoides intestinales en el uso combinado de FSK y NECA ( $p$ -valor =  $<0,0001$ ). A pesar del uso del inhibidor, se detectaron cambios en el área de los organoides tanto con FSK, con NECA y con la combinación de ambos, aunque no fueron significativos al compararlo con el control negativo ( $p$ -valor =  $>0,9999$  en los tres casos).



**Figura 19. Respuestas producidas por FSK y NECA tras la inhibición de la CFTR en organoides intestinales WT.** Los organoides intestinales fueron incubados con FSK 0,8 μM, NECA 0,385 μM o con la combinación de ambos compuestos. Estos mismos compuestos también se testaron tras la inhibición previa de la CFTR, mediante la incubación de los organoides durante 3h con CFTR-inh172. Como control negativo se utilizó DMSO (a  $<0,001\%$ ). Las respuestas funcionales de la CFTR fueron cuantificadas en base a los cambios de área de los organoides intestinales y normalizados respecto a su área antes de añadir los compuestos. Seguidamente, se calculó las AUC a tiempo 180 min. Por cada individuo estudiado y condición se evaluaron entre 40-60 organoides. La barra de cada columna representa el SEM y el nivel de significancia se indica como \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ , \*\*\*\*  $p<0,0001$ . (n=4).

Con el propósito de determinar si la activación de la CFTR después de la estimulación de los RAs ocurre debido a un incremento en los niveles intracelulares de AMPc, se llevó a cabo un ELISA. Se compararon los niveles de AMPc en organoides intestinales WT tras la incubación con DMSO, FSK o NECA. Como se aprecia en la Figura 20, tanto el uso de FSK como de NECA indujeron un aumento significativo en la concentración de AMPc en comparación con el control negativo (DMSO), incrementándose en más de 10 veces. Además, se observó que el uso de NECA provocó una mayor producción de AMPc que con FSK, la cual fue estadísticamente significativa ( $p$ -valor = 0,0218).

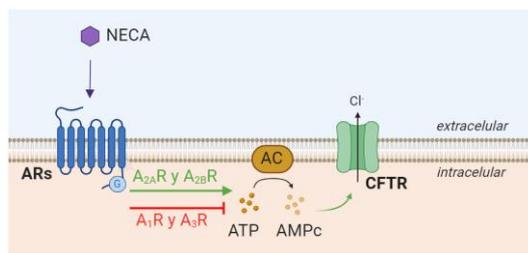


**Figura 20. Niveles de AMPc tras la estimulación de los organoides intestinales WT con FSK y NECA.** Los organoides intestinales fueron incubados con DMSO (<0,001%), FSK (10  $\mu$ M) o NECA (10  $\mu$ M). Posteriormente, se cuantificaron los niveles de AMPc intracelular mediante ELISA. La barra de cada columna representa el SEM y el nivel de significancia se indica como \*  $p$ <0,05, \*\*  $p$ <0,01, \*\*\*  $p$ <0,001, \*\*\*\*  $p$ <0,0001. (n=3).

## 4.2 ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LOS RAs EN LA FUNCIÓN DE LA CFTR EN ORGANOIDES CONTROL

### 4.2.1 Cribado de antagonistas de los RAs

Después de confirmar la implicación de los RAs en la activación de la CFTR mediante el aumento de AMPc en organoides intestinales WT, se procedió a estudiar cómo la activación o la inhibición de estos receptores podría afectar a la función de la CFTR en organoides intestinales WT. La estimulación de  $A_{2A}R$  y  $A_{2B}R$  mediante NECA provoca la activación del adenilato ciclasa (AC), lo que resulta en un aumento de AMPc y la consecuente activación de la CFTR (Figura 21). En cambio, la activación de  $A_1R$  y  $A_3R$  inhiben la AC, por lo que no hay un aumento de los niveles de AMPc y la activación de la CFTR no tiene lugar.

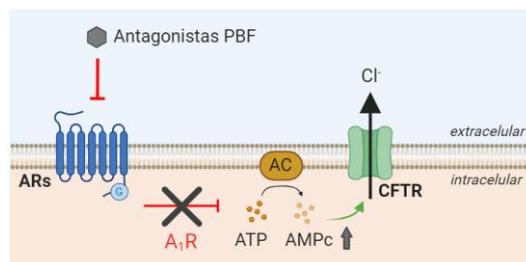


**Figura 21. Esquema simplificado de la respuesta esperada de la CFTR tras el uso de NECA.**

Se llevó a cabo un primer cribado ciego donde se estudiaron, mediante el ensayo FIS previamente adaptado y validado, 20 compuestos antagonistas de los RAs de la empresa Palobiofarma, S.L. El objetivo final de ello fue determinar qué subtipo de RA sería el más eficaz modular para obtener una mayor respuesta de la CFTR. Cada fármaco (PBF-nº) se evaluó a las concentraciones de 1 y 10  $\mu M$  en combinación con NECA (a 1  $\mu M$ ) para confirmar su efecto inhibitorio. Cada uno de los 20 compuestos PBF presenta un valor específico de concentración inhibitoria media (IC50) para cada uno de los cuatro subtipos de RAs. Por ello, es importante destacar que estos compuestos no están dirigidos exclusivamente a un subtipo de RA, pero sí que muestran en cada caso una mayor afinidad hacia un subtipo en particular. Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, los compuestos PBF se clasificaron según el receptor hacia el cual mostraban una mayor capacidad inhibitoria, determinada por un valor menor de IC50.

#### 4.2.1.1 Antagonistas de A<sub>1</sub>R

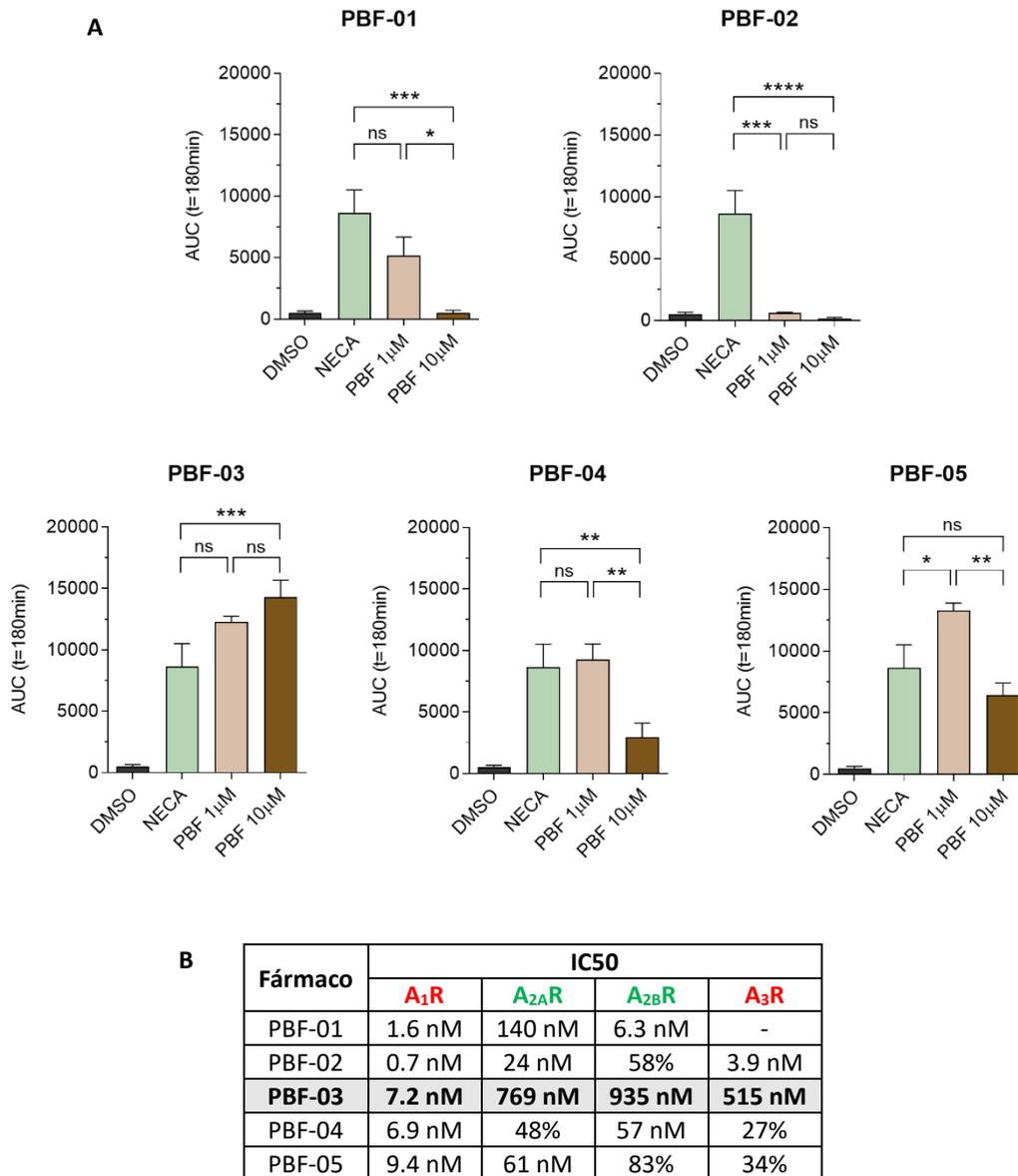
A<sub>1</sub>R inhibe a la AC, por lo tanto, el uso de antagonistas de A<sub>1</sub>R detendría esta represión y resultaría en un efecto positivo en la función de la CFTR (Figura 22). Por lo tanto, el aumento del flujo de iones en los organoides intestinales hacia el lumen, mediado por la CFTR, conduciría a un incremento de su área.



**Figura 22. Esquema conceptual de la implicación de la inhibición de A<sub>1</sub>R en la activación de la CFTR mediante antagonistas.**

En la Figura 23, se recogen los cinco compuestos de Palobiofarma, S.L cuyo efecto antagonista, en base a los valores de IC<sub>50</sub>, es principalmente hacia A<sub>1</sub>R: PBF-01, PBF-02, PBF-03, PBF-04 y PBF-05.

Los compuestos PBF-01 y PBF-02, a una concentración de 1  $\mu$ M, mostraron una respuesta menor que la obtenida al utilizar NECA sola. En el caso de PBF-01, esta reducción no fue significativa (p-valor = 0,1499), mientras que sí lo fue con PBF-02 (p-valor < 0,0001), alcanzando valores similares a los obtenidos con DMSO (AUC de PBF-02 a 1  $\mu$ M = 588,39; AUC de DMSO = 501,59). Tanto PBF-01 como PBF-02 a una concentración de 10  $\mu$ M mostraron valores de AUC todavía más bajos (AUC de PBF-01= 503,68; AUC de PBF-02 = 130,04) que a 1  $\mu$ M. Por el contrario, los compuestos PBF-03, PBF-04 y PBF-05 mostraron un incremento mayor del área al utilizarlos a 1  $\mu$ M en comparación con NECA, aunque solo fue significativo en el caso de PBF-05 (p-valor = 0,0311). Sin embargo, a una concentración de 10  $\mu$ M, tanto PBF-04 como PBF-05 mostraron niveles de AUC significativamente menores que los obtenidos a 1  $\mu$ M (p-valor = 0,007 y 0,0016, respectivamente), e incluso inferiores a la respuesta inducida por NECA. PBF-03 fue el único compuesto que, en ambas concentraciones testadas (1 y 10  $\mu$ M), presentó una respuesta superior a la obtenida únicamente con NECA (con un incremento del 41,91% y 65,41%, respectivamente), aunque esta diferencia solo fue significativa al comparar NECA con PBF-03 a 10  $\mu$ M (p-valor = 0,0076).



**Figura 23. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de compuestos principalmente antagonistas de A<sub>1</sub>R en organoides intestinales WT.** (A) Mediante el ensayo funcional FIS, se evaluaron los fármacos PBF-01, PBF-02, PBF-03, PBF-04 y PBF-05 a 1 y 10 µM en combinación con NECA (1 µM). DMSO (<0,001%) se utilizó como control negativo, mientras que NECA sirvió como control positivo. Las AUC fueron calculadas a tiempo 180 min. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=4). (B) La tabla indica los valores de la concentración inhibitoria media (IC50) específica en nM de cada compuesto de Palobiofarma S.L para cada uno de los cuatro subtipos de RAs. El % indica el porcentaje de unión a 1 µM por el subtipo de RA específico, lo que es indicativo de una baja afinidad por dicho receptor. En verde están marcados A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R, que en situación fisiológica normal activan la producción de AMPc, mientras que A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R están marcados en rojo al tener un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc. En gris se marca el antagonista más selectivo de A<sub>1</sub>R al comparar únicamente los valores de IC50 de este grupo.

#### 4.2.1.2 Antagonistas de A<sub>2A</sub>R

La estimulación de A<sub>2A</sub>R provoca un aumento de la producción de AMPc, lo que permite la activación de la CFTR. Por el contrario, la inhibición de este receptor evitaría la activación de la AC, y consecuentemente la activación de la CFTR no se produciría (Figura 24). De manera que, la CFTR permanecería cerrada, el transporte de iones no tendría lugar y no se observaría un incremento del área de los organoides.

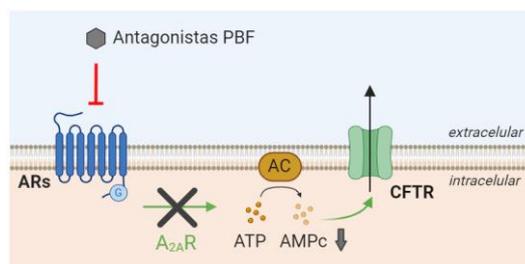
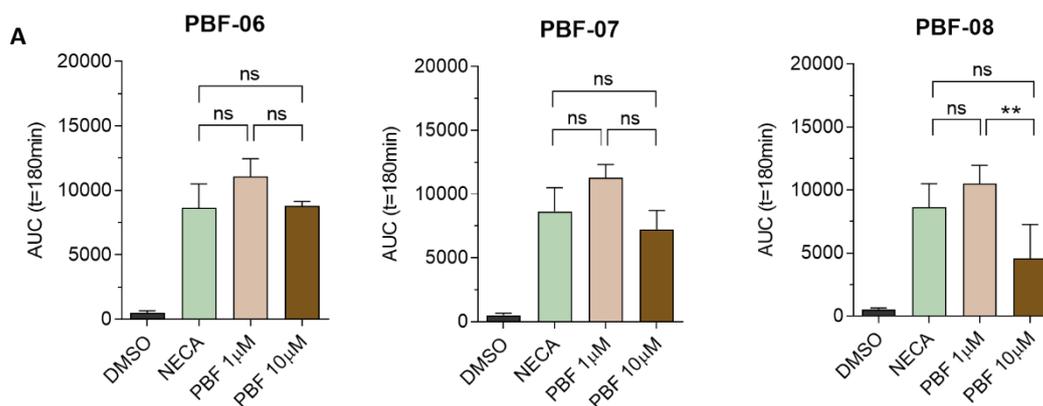


Figura 24. Esquema conceptual de la implicación de la inhibición de A<sub>2A</sub>R en la activación de la CFTR mediante antagonistas.

En la Figura 25, se recogen los tres compuestos de Palobiofarma, S.L cuyo efecto antagonista, en base a los valores de IC<sub>50</sub>, es principalmente hacia A<sub>2A</sub>R: PBF-06, PBF-07 y PBF-08.



**B**

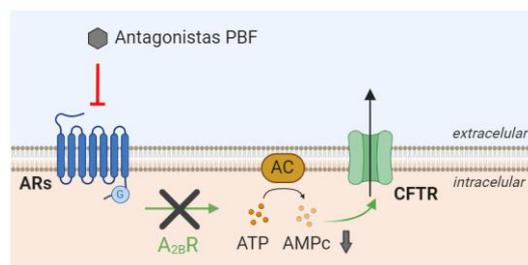
Fármaco	IC <sub>50</sub>			
	A <sub>1</sub> R	A <sub>2A</sub> R	A <sub>2B</sub> R	A <sub>3</sub> R
PBF-06	2245 nM	12.3 nM	912 nM	4612 nM
PBF-07	30 %	378 nM	14 %	5 %
PBF-08	28 %	7 nM	31 nM	52 %

**Figura 25. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso de compuestos principalmente antagonistas de A<sub>2A</sub>R en organoides intestinales WT.** (A) Mediante el ensayo funcional FIS, se evaluaron los fármacos PBF-06, PBF-07 y PBF-08 a 1 y 10  $\mu$ M en combinación con NECA (1  $\mu$ M). DMSO (<0,001%) se utilizó como control negativo, mientras que NECA sirvió como control positivo. Las AUC fueron calculadas a tiempo 180 min. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; y "ns" para no significativo. (n=4) (B) La tabla indica los valores de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) específica en nM de cada compuesto de Palobiofarma S.L para cada uno de los cuatro subtipos de RAs. El % indica el porcentaje de unión a 1  $\mu$ M por el subtipo de RA específico, lo que es indicativo de una baja afinidad por dicho receptor. En verde están marcados A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R, que en situación fisiológica normal activan la producción de AMPc, mientras que A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R están marcados en rojo al tener un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc. En gris se marca el antagonista más selectivo de A<sub>2A</sub>R al comparar únicamente los valores de IC<sub>50</sub> de este grupo.

Los tres compuestos, a una concentración de 1  $\mu$ M, generaron una respuesta mayor en los organoides que la obtenida únicamente con NECA, aunque no alcanzó significancia en ningún caso ( $p$ -valor = 0,4243, 0,3575 y 0,6281, respectivamente). Al aumentar la concentración a 10  $\mu$ M, el compuesto PBF-08 mostró una respuesta más reducida que la obtenida con PBF-06 y PBF-07. Sin embargo, no fue una reducción significativa al compararla con la respuesta obtenida con NECA ( $p$ -valor = 0,0785).

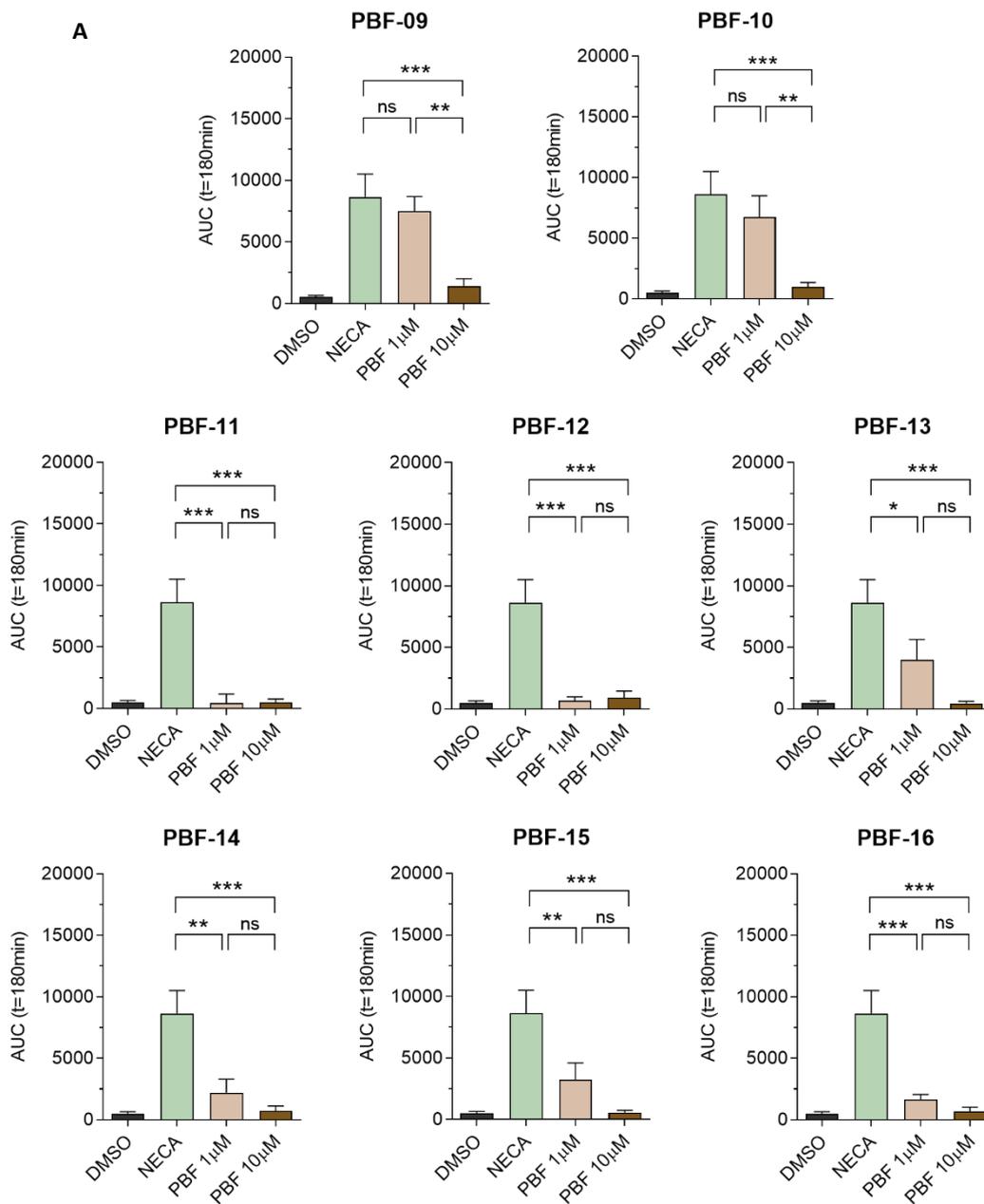
#### 4.2.1.3 Antagonistas de A<sub>2B</sub>R

Dado que este receptor actúa de manera similar a A<sub>2A</sub>R, el uso de antagonistas de A<sub>2B</sub>R también evitaría la estimulación de la AC con lo que no se produciría el aumento de AMPc y no habría una mayor activación de la CFTR (Figura 26). Por lo tanto, tras el uso de los antagonistas de este grupo no se esperarían cambios en el área de los organoides.



**Figura 26. Esquema conceptual de la implicación de la inhibición de A<sub>2B</sub>R en la activación de la CFTR mediante antagonistas.**

En la Figura 27, se recogen los ocho compuestos de Palobiofarma, S.L cuyo efecto antagonista, en base a los valores de IC50, es principalmente hacia A<sub>2B</sub>R: PBF-09, PBF-10, PBF-11, PBF-12, PBF-13, PBF-14, PBF-15 y PBF-16.



**B**

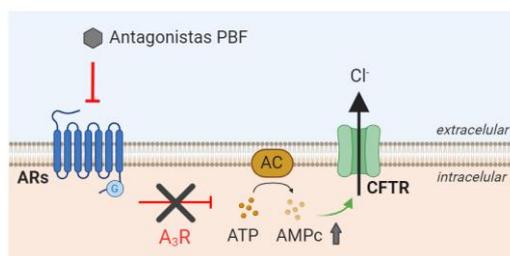
Fármaco	IC50			
	A <sub>1</sub> R	A <sub>2A</sub> R	A <sub>2B</sub> R	A <sub>3</sub> R
PBF-09	1044 nM	3976 nM	27,7 nM	1 %
PBF-10	25 %	1 %	6 nM	1 %
PBF-11	6,6 nM	55 %	4 nM	38 nM
PBF-12	3,1 nM	65 nM	1 nM	43 %
<b>PBF-13</b>	<b>27 %</b>	<b>13 %</b>	<b>4 nM</b>	<b>8 %</b>
PBF-14	1 %	4 nM	0,99 nM	7 %
PBF-15	12,3 nM	72 %	2 nM	57 %
PBF-16	4,6 nM	37 nM	2 nM	18,9 nM

**Figura 27. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso de compuestos principalmente antagonistas de A<sub>2B</sub>R en organoides intestinales WT.** (A) Mediante el ensayo funcional FIS, se evaluaron los fármacos PBF-09, PBF-10, PBF-11, PBF-12, PBF-13, PBF-14, PBF-15 y PBF-16 a 1 y 10  $\mu$ M en combinación con NECA (1  $\mu$ M). DMSO (<0,001%) se utilizó como control negativo, mientras que NECA sirvió como control positivo. Las AUC fueron calculadas a tiempo 180 min. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; y "ns" para no significativo. (n=4). (B) La tabla indica los valores de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) específica en nM de cada compuesto de Palbiofarma S.L para cada uno de los cuatro subtipos de RAs. El % indica el porcentaje de unión a 1  $\mu$ M por el subtipo de RA específico, lo que es indicativo de una baja afinidad por dicho receptor. En verde están marcados A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R, que en situación fisiológica normal activan la producción de AMPc, mientras que A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R están marcados en rojo al tener un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc. En gris se marca el antagonista más selectivo de A<sub>2B</sub>R al comparar únicamente los valores de IC<sub>50</sub> de este grupo.

En todos los compuestos de este grupo, excepto con PBF-09 y PBF-10, al utilizar la concentración de 1  $\mu$ M la respuesta obtenida fue significativamente menor que la observada con NECA (PBF-11 p-valor = 0,0001; PBF-12 p-valor = 0,0001; PBF-13 p-valor = 0,0175; PBF-14 p-valor = 0,0013; PBF-15 p-valor = 0,0066; PBF-16 p-valor = 0,006). La mayor reducción respecto a NECA se produjo con el compuesto PBF-11 (reducción del 94,79%), seguido de PBF-12 (reducción del 92,26%). Por el contrario, al emplear la concentración de 10  $\mu$ M con cada compuesto, se observó en todos los casos una reducción significativa, con una disminución promedio del 90,93 % (SD  $\pm$  3,46). PBF-13 a 10  $\mu$ M mostró la mayor reducción, alcanzando un 94,64 %.

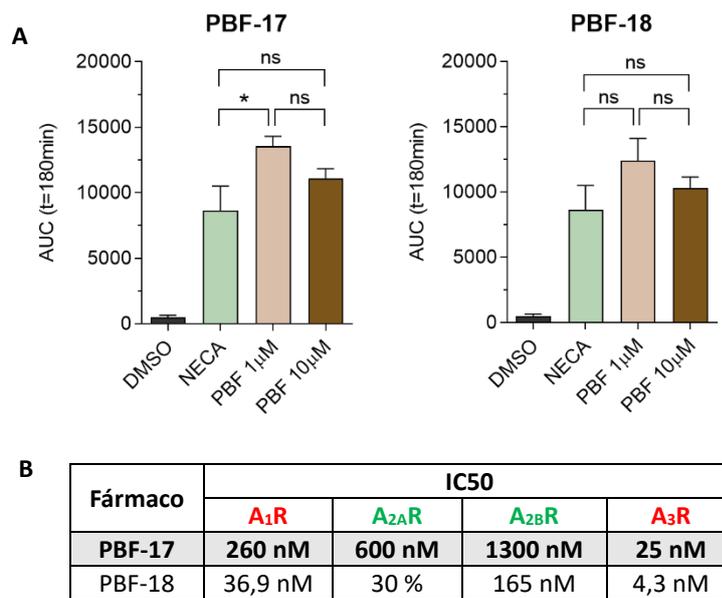
#### 4.2.1.4 Antagonistas de A<sub>3</sub>R

El uso de antagonistas de A<sub>3</sub>R debería traducirse en un efecto positivo en la activación de la CFTR, dado que se neutraliza el efecto inhibitorio que este receptor ejerce sobre la AC (Figura 28). Por lo tanto, se esperaría observar un aumento del área de los organoides como resultado del flujo de Cl<sup>-</sup> mediado por la CFTR.



**Figura 28. Esquema conceptual de la implicación de la inhibición de A<sub>3</sub>R en la activación de la CFTR mediante antagonistas.**

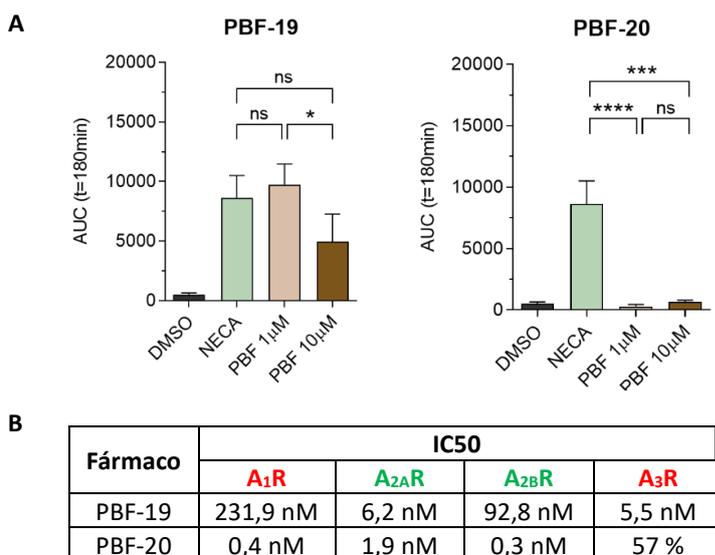
Las respuestas funcionales de la CFTR tras el uso de los dos compuestos con mayor afinidad hacia el A<sub>3</sub>R, PBF-17 y PBF-18, se muestran en la Figura 29. En ambos casos, el uso del compuesto a 1  $\mu$ M provocó una respuesta mayor que la obtenida con NECA. Sin embargo, este incremento solo fue significativo con PBF-17 ( $p$ -valor = 0,284). Ambos compuestos a una concentración de 10  $\mu$ M también mostraron una respuesta mayor que la obtenida con NECA, aunque no fue tan pronunciada con la obtenida al emplear la concentración de 1  $\mu$ M del compuesto y no resultó significativa en ningún caso.



**Figura 29. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso de compuestos principalmente antagonistas de A<sub>3</sub>R en organoides intestinales WT.** (A) Mediante el ensayo funcional FIS, se evaluaron los fármacos PBF-17 y PBF-18 a 1 y 10  $\mu$ M en combinación con NECA (1  $\mu$ M). DMSO (<0,001%) se utilizó como control negativo, mientras que NECA sirvió como control positivo. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \*  $p$ <0,05, \*\*  $p$ <0,01, \*\*\*  $p$ <0,001, \*\*\*\*  $p$ <0,0001; y "ns" para no significativo. ( $n$ =5). (B) La tabla indica los valores de la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) específica en nM de cada compuesto de Palobiofarma S.L para cada uno de los cuatro subtipos de RAs. El % indica el porcentaje de unión a 1  $\mu$ M por el subtipo de RA específico, lo que es indicativo de una baja afinidad por dicho receptor. En verde están marcados A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R, que en situación fisiológica normal activan la producción de AMPc, mientras que A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R están marcados en rojo al tener un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc. En gris se marca el antagonista más selectivo de A<sub>3</sub>R al comparar únicamente los valores de IC<sub>50</sub> de este grupo.

#### 4.2.1.5 Antagonistas de dos RAs distintos

Por último, dentro del cribado de los 20 compuestos, se identificaron dos compuestos que presentaron valores de IC50 muy similares entre dos RAs con funciones opuestas (Figura 30B). En el caso del PBF-19, los valores de IC50 indicaron una afinidad muy similar tanto por A<sub>3</sub>R como por A<sub>2A</sub>R (5,5 nM y 6,2 nM, respectivamente). Los resultados del ensayo funcional de PBF-19 a 1 µM mostraron un aumento de los valores de AUC respecto a NECA, aunque no fue significativo (p-valor = 0,8560). Por el contrario, el uso este compuesto a 10 µM provocó una respuesta menor que la obtenida con NECA, sin ser una diferencia significativa (p-valor = 0,0772). Los valores de IC50 de PBF-20 indicaron una capacidad de inhibición mayor sobre A<sub>2B</sub>R (0,3 nM) pero a la vez muy similar a la ejercida sobre A<sub>1</sub>R (0,4 nM). En este caso, se observó una disminución significativa de la función de la CFTR al utilizar el fármaco tanto a 1 y 10 µM en comparación con NECA. De hecho, los valores de AUC obtenidos a ambas concentraciones (AUC a 1 µM = 293,887 y AUC a 10 µM = 665,438) fueron similares al del control negativo (AUC DMSO = 501,588).



**Figura 30. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso de PBF-443 y PBF-1615 organoides intestinales WT. (A)** Mediante el ensayo funcional FIS, se evaluaron los fármacos PBF-19 y PBF-20 a 1 y 10 µM en combinación con NECA (1 µM). DMSO (<0,001%) se utilizó como control negativo, mientras que NECA sirvió como control positivo. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=4). **(B)** La tabla presenta los valores de la concentración inhibitoria media (IC50) específica en nM de cada compuesto de Palobiofarma S.L para cada uno de los cuatro subtipos de RAs. El % indica el porcentaje de unión a 1 µM en este subtipo de RA, lo que es indicativo de una baja afinidad por dicho receptor. En verde están marcados A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R, que en situación fisiológica normal activan la producción de AMPc, mientras que A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R están marcados en rojo al tener un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc.

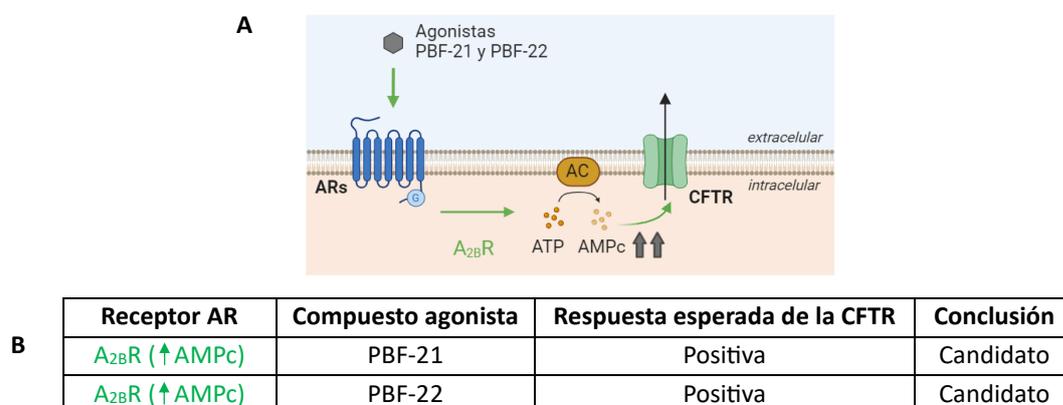
#### 4.2.2 Fármacos candidatos

De cada uno de los cuatro grupos de antagonistas estudiados en el apartado anterior, se seleccionaron los compuestos que mostraron una mayor selectividad por el receptor en cuestión (en base a los valores de IC50): PBF-03, PBF-07, PBF-13 y PBF-17 (Tabla 3).

Receptor AR	Compuesto antagonista	Respuesta de la CFTR	Conclusión
A <sub>1</sub> R (↓AMPc)	PBF-03	Positiva	Candidato
A <sub>2A</sub> R (↑AMPc)	PBF-07	Negativa	No apto
A <sub>2B</sub> R (↑AMPc)	PBF-13	Negativa	No apto
A <sub>3</sub> R (↓AMPc)	PBF-17	Positiva	Candidato

**Tabla 3. Resumen de los antagonistas de los RAs seleccionados después del cribado de los 20 compuestos de Palbiofarma, S.L.** De los compuestos seleccionados, PBF-03, PBF-07, PBF-13 y PBF-17, se detalla sobre qué subtipo de RA ejerce principalmente la inhibición. En verde están marcados A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R, que en situación fisiológica normal activan la producción de AMPc, mientras que A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R están marcados en rojo y tienen un efecto inhibitorio sobre la producción de AMPc. Además, se indica cuál fue la respuesta de la CFTR observada tras los ensayos funcionales realizados (Fig. 24, 26, 28 y 30, respectivamente): negativa si fue menor a la obtenida con NECA o positiva si fue mayor. En base a eso, se indica si el compuesto fue un buen candidato para activar la respuesta de la CFTR o si, por el contrario, no fue apto.

Los antagonistas PBF-03 y PBF-17 se postularon como posibles candidatos para testar su efecto en organoides intestinales derivados de individuos afectados por la FQ. Por el contrario, el uso de antagonistas de A<sub>2B</sub>R no provocó la estimulación de la CFTR, por lo que en este caso sería más conveniente utilizar agonistas de este receptor, como fueron el caso de PBF-21 y PBF-22 (Figura 31).

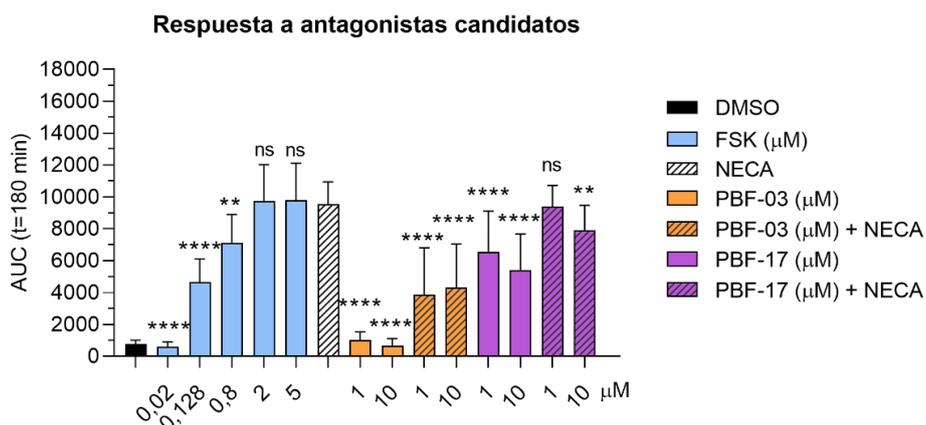


**Figura 31. Agonistas candidatos de A<sub>2B</sub>R.** (A) Esquema conceptual de la implicación de la activación de A<sub>2B</sub>R para promover la activación de la CFTR mediante agonistas. (B) Los compuestos PBF-21 y PBF-22 de Palbiofarma, S.L se presentaron como candidatos para estimular la activación de la CFTR tras la estimulación de A<sub>2B</sub>R.

**4.2.2.1 Antagonistas candidatos: PBF-03 y PBF-17**

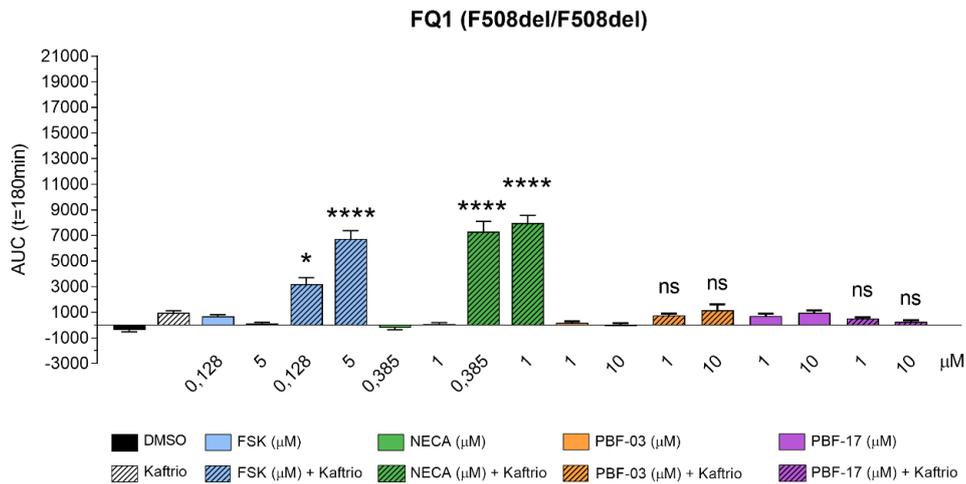
Se procedió a evaluar nuevamente la respuesta de la CFTR en organoides intestinales WT utilizando los compuestos PBF-03 (antagonista de A<sub>1</sub>R) y PBF-17 (antagonista de A<sub>3</sub>R) mediante el ensayo FIS. Sin embargo, en esta ocasión, los compuestos también se estudiaron sin combinarlos con NECA, con el objetivo de determinar cuál era el efecto individual de cada antagonista.

Como se puede apreciar en la Figura 32, el empleo de PBF-17 de forma individual en las dos concentraciones evaluadas (1 μM y 10 μM) no indujo una activación de la CFTR al mismo nivel que con NECA a 0,385 μM; de hecho, fue significativamente inferior (p-valor = <0,001 en ambas concentraciones). Únicamente la respuesta obtenida con PBF-17 a 1 μM en combinación con NECA fue comparable a la respuesta obtenida con NECA, ya que no se observaron diferencias significativas (p-valor = >0,999). En cuanto a PBF-03, tanto su uso solo como en combinación con NECA no logró alcanzar la misma respuesta obtenida con NECA.



**Figura 32. Respuesta de la CFTR ante la estimulación de PBF-03 y PBF-17.** Mediante el ensayo funcional FIS, se evaluaron los fármacos PBF-03 y PBF-17, antagonistas de A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R, respectivamente, a 1 y 10 μM o en combinación con NECA a 0,385 μM. DMSO (<0,001%) se utilizó como control negativo, mientras que FSK (a 0,02/0,128/0,8/2/5 μM) y NECA (a 0,385 μM) sirvieron como controles positivos. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de los compuestos PBF en relación con la obtenida con NECA. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=4).

Para confirmar la falta de respuesta de la CFTR tras el uso de los antagonistas PBF-03 y PBF-17, se realizó un ensayo funcional con estos dos antagonistas en los organoides intestinales derivados de FQ1 (F508del/F508del) como una prueba conceptual del tipo de respuesta esperada en FQ (Figura 33).



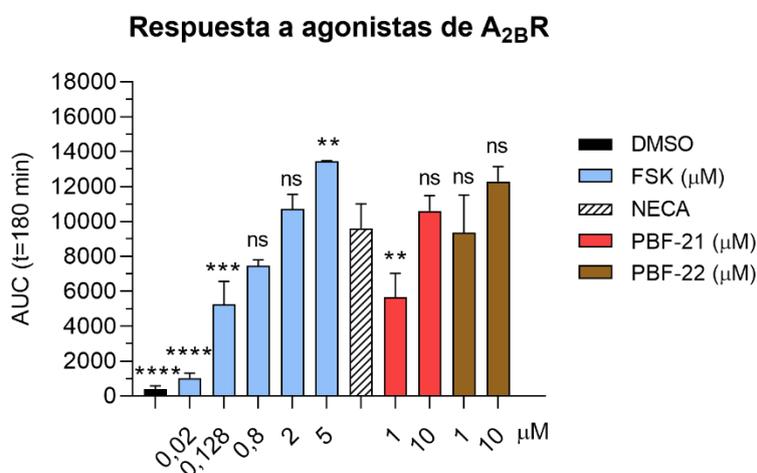
**Figura 33. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de los antagonistas PBF-03 y PBF-17 en organoides intestinales derivados de FQ1 (F508del/F508del).** (A) Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación por FSK (a 0,128 y 5  $\mu$ M) o por NECA (a 0,385 y 1  $\mu$ M). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de las condiciones testadas en relación con la obtenida con Kaftrio solo. Se evaluó el uso de los compuestos PBF-03 (a 1 y 1  $\mu$ M) o PBF-17 (a 1 y 10  $\mu$ M) solo (barras lisas) o en combinación con Kaftrio (barras rayadas). Se utilizó DMSO (<0,001%) y la incubación de individual de Kaftrio como controles. Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Las barras en los gráficos representan el SEM. Los niveles de significancia se indican como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; y “ns” para no significativo. (n=1).

En este caso, ninguno de los compuestos PBF indujo una respuesta de la CFTR. Tanto PBF-03 como PBF-17 al combinarlos con el modulador Kaftrio tampoco dieron lugar a la activación del canal. Dado estos resultados, se decidió descartar los antagonistas PBF-03 y PBF-17 como estrategia para potenciar la función de la CFTR en los organoides intestinales FQ mediante la modulación de A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R, respectivamente.

#### 4.2.2.2 Agonistas candidatos de A<sub>2B</sub>R: PBF-21 y PBF-22

Se evaluó la respuesta de la CFTR en organoides intestinales WT utilizando los compuestos PBF-21 y PBF-22, ambos agonistas de A<sub>2B</sub>R, mediante el ensayo FIS. En este caso, la estimulación de A<sub>2B</sub>R, al ser un regulador positivo de la producción de AMPc, debería de activar la función de la CFTR y se esperaba observar un incremento en el área de los organoides (Figura 31A).

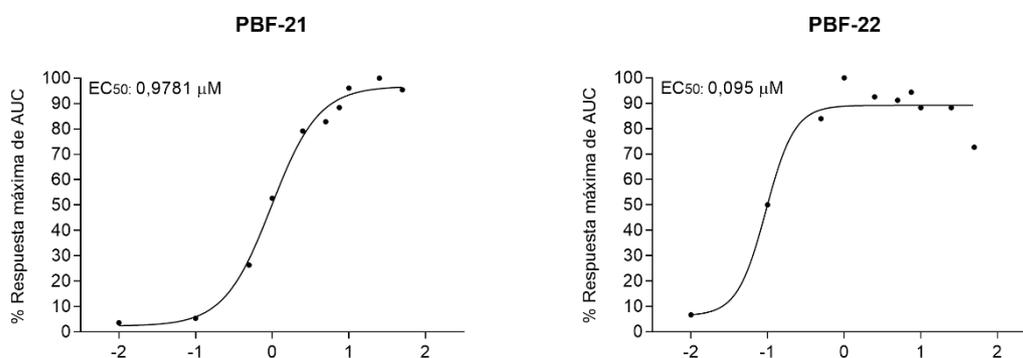
Como se muestra en la Figura 34, tras la activación de A<sub>2B</sub>R mediante los compuestos agonistas se observó una respuesta de la CFTR similar a la obtenida con NECA, a excepción de cuando se utilizó PBF-21 a 1 μM. Al comparar las respuestas de ambos compuestos, se observó que PBF-22 a 1 μM produjo una respuesta un 65% mayor que la obtenida con PBF-21 a la misma concentración. De hecho, la respuesta obtenida con PBF-22 a 1 μM no mostró diferencias significativas en comparación con la observada con PBF-21 a 10 μM (p-valor = 0,9724). Por otro lado, al comparar la respuesta de ambas dosis de PBF-21, se observó una respuesta significativamente mayor con la dosis más elevada (p-valor = <0,0001). En cambio, en el caso de PBF-22 no se observaron diferencias significativas (p-valor = 0,0907).



**Figura 34. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de agonistas de A<sub>2B</sub>R en organoides intestinales WT.** Mediante el ensayo funcional FIS, se evaluaron los fármacos PBF-21 y PBF-22, agonistas de A<sub>2B</sub>R, a 1 y 10 μM. DMSO (<0,001%) se utilizó como control negativo, mientras que FSK a (0,02/0,128/0,8/2/5 μM) y NECA (a 0,385 μM) sirvieron como controles positivos. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de los compuestos PBF en relación con la obtenida con NECA. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=3).

Estos resultados indican que los agonistas PBF-21 y PBF-22 se presentaron como buenos candidatos para ser evaluados en organoides intestinales derivados de personas afectadas por la FQ. Sin embargo, antes de ello, se estudió la EC<sub>50</sub> de cada uno de ellos.

Como se observa en la Figura 35, el valor de EC<sub>50</sub> de PBF-22 (0,095  $\mu$ M) fue diez veces menor que el obtenido con PBF-21 (0,9781  $\mu$ M). Esto demuestra que el agonista PBF-22 fue cuantitativamente más efectivo que PBF-21. En base a estos resultados, se decidió utilizar PBF-21 a 1  $\mu$ M en los ensayos funcionales con organoides intestinales FQ, mientras que en el caso de PBF-22 la concentración escogida fue 0,1  $\mu$ M.

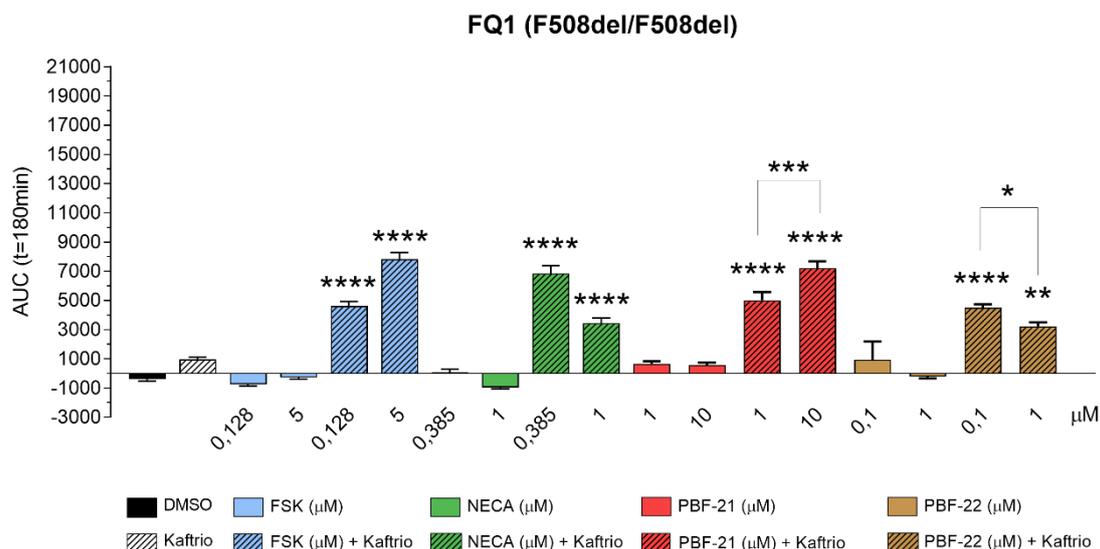


**Figura 35. Estudio de la EC<sub>50</sub> de PBF-21 y PBF-22 en organoides intestinales WT.** Se utilizaron 10 concentraciones de cada compuesto (0,01/0,1/0,5/1/2,5/5/7,5/10/25/50  $\mu$ M). El efecto de PBF-21 y PBF-22 en los organoides se cuantificó mediante la medición de los cambios en el área de cada organoide estudiado tras realizar el ensayo funcional FIS (ver apartado 3.3.3). Se estudiaron entre 40-60 organoides intestinales en cada concentración derivados de cada uno de los individuos estudiados. Los cambios de área fueron normalizados en relación con su área inicial, antes de la incubación con cada compuesto. Seguidamente, se calculó las AUC a tiempo 180 min. Con el fin de facilitar su representación gráfica, los valores de AUC se normalizaron nuevamente respecto al valor máximo obtenido (con PBF-21 a 25  $\mu$ M y PBF-22 a 1  $\mu$ M), para así observar la respuesta en porcentaje. (n=3).

### 4.3 EVALUACIÓN DEL USO DE AGONISTAS DE A<sub>2B</sub>R EN LA FUNCIÓN DE LA CFTR EN ORGANOIDES INTESTINALES FQ

Se procedió a estudiar el efecto del uso de los dos agonistas de A<sub>2B</sub>R, PBF-21 y PBF-22, en organoides intestinales obtenidos de los siguientes individuos afectados por la FQ: FQ1, FQ2, FQ3, FQ4 y FQ5.

En la Figura 36 se presentan los resultados del ensayo funcional realizado con organoides intestinales derivados del individuo FQ1, cuyo genotipo es F508del/F508del. En primer lugar, se evaluó la función basal de la CFTR de este individuo mediante el uso de FSK o NECA, cada uno a dos concentraciones. En la Figura A2 de los Anexos se muestra la respuesta de la CFTR tras el uso de distintas concentraciones de FSK.



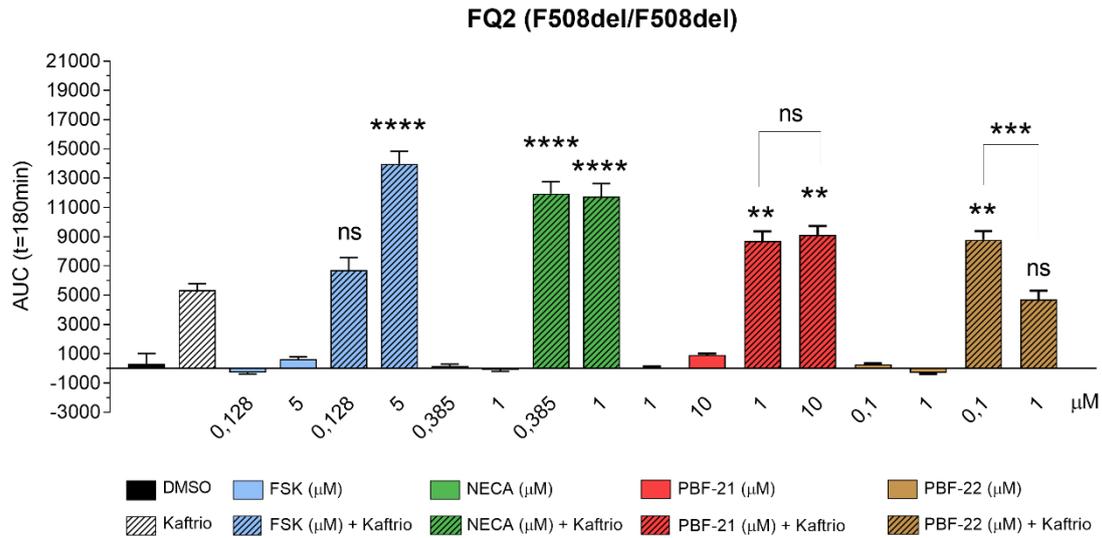
**Figura 36. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de agonistas de A<sub>2B</sub>R en organoides intestinales derivados de FQ1 (F508del/F508del).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,128/5 μM) o con NECA (a 0,385 y 1 μM). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. También se evaluaron los agonistas PBF-21 (a 1 y 10 μM) y PBF-22 (a 0,1 y 1 μM) de forma individual (columnas lisas) o en combinación con Kaftrio (columnas rayadas). Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de los compuestos PBF en relación con la obtenida con Kaftrio individual. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=1).

Los resultados revelaron una falta de respuesta de la CFTR tras la estimulación con FSK y con NECA. Sin embargo, cuando se combinaron tanto FSK como NECA con Kaftrio, se detectaron cambios significativos del área de los organoides. En el caso de FSK, a mayor dosis de FSK combinada con Kaftrio, se observó una mayor respuesta. En cambio, la concentración más elevada de NECA (1  $\mu\text{M}$ ) mostró una respuesta significativamente menor que al emplear 0,385  $\mu\text{M}$ , concretamente un 49,86% menos.

El empleo de los agonistas de  $A_{2B}R$  mostró un patrón similar al observado en el estudio de la respuesta basal de la CFTR: cuando se utilizaron los agonistas de manera individual, no se obtuvo una respuesta significativa al compararla con el control negativo. Sin embargo, al combinarlos con Kaftrio, se observó una respuesta significativamente mayor, tanto con PBF-21 como con PBF-22, en comparación con la obtenida al utilizar el compuesto solo (p-valor =  $<0,0001$  en todos los casos). Entrando en detalle, se observó una respuesta dosis-dependiente significativa con PBF-21, obteniendo un valor de AUC mayor pero no significativa al utilizar 10  $\mu\text{M}$  (p-valor = 0,0031). En cambio, PBF-22 a 1  $\mu\text{M}$  provocó una respuesta significativamente menor (en un 28,1 %, p-valor = 0,0007) que la obtenida a 0,1  $\mu\text{M}$ .

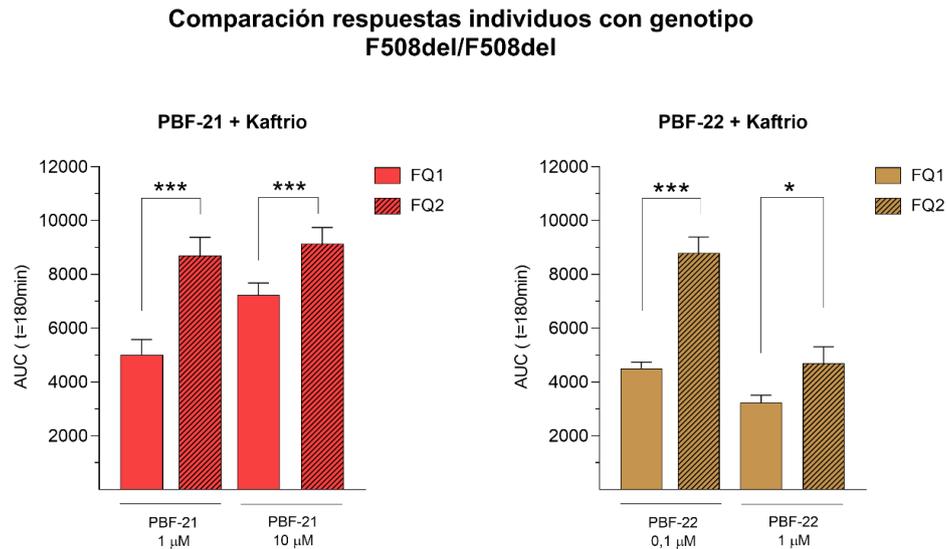
En la Figura 37 se muestran los resultados del mismo ensayo realizado con los organoides derivados de FQ2, también homocigoto para la variante F508del-*CFTR*. En la Figura A3 de los Anexos se muestra la respuesta de la CFTR tras el uso de distintas concentraciones de FSK. El perfil de la respuesta basal de la CFTR fue similar al de FQ1: únicamente se observó función de la CFTR al combinar FSK o NECA con Kaftrio. Cabe destacar que, en este caso, y al igual que lo observado con FQ1, no se detectó una mayor respuesta de la CFTR al aumentar la dosis de NECA a 10  $\mu\text{M}$  y combinarlo con Kaftrio.

El uso de los agonistas PBF-21 y PBF-22 de forma individual, sin la combinación con Kaftrio, tampoco produjo respuesta. Fue necesario la combinación con Kaftrio para observar una respuesta significativa en los organoides. La respuesta observada con PBF-22 a 0,1  $\mu\text{M}$  + Kaftrio dio valores significativamente similares a los obtenidos con PBF-21 a 10  $\mu\text{M}$  + Kaftrio (p-valor = 0,6932). Entrando en detalle, al comparar las respuestas obtenidas al utilizar las dos concentraciones de PBF-21 + Kaftrio, se pudo observar una mayor función de la CFTR al utilizar la dosis más alta de PBF-21. Sin embargo, este incremento no fue significativo (p-valor = 0,6342). Por el contrario, en el caso de PBF-22 el uso de 1  $\mu\text{M}$  + Kaftrio dio una respuesta significativamente menor que la obtenida con 0,1  $\mu\text{M}$  + Kaftrio (p-valor =  $<0,0001$ ).



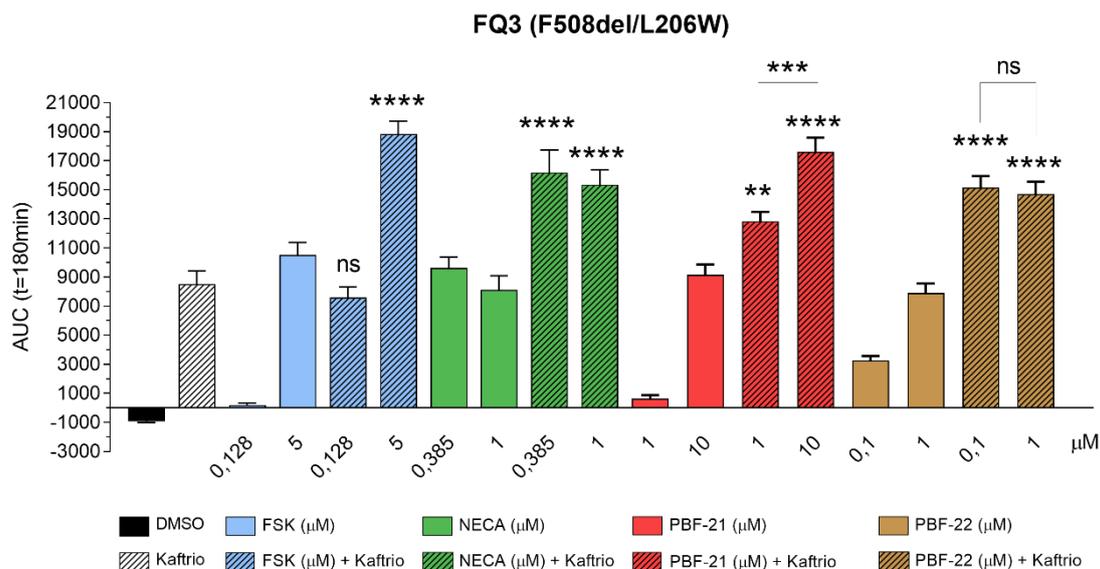
**Figura 37. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de agonistas de A<sub>2B</sub>R en organoides intestinales derivados de FQ2 (F508del/F508del).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,128/5 μM) o con NECA (a 0,385 y 1 μM). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. También se evaluaron los agonistas PBF-21 (a 1 y 10 μM) y PBF-22 (a 0,1 y 1 μM) de forma individual (columnas lisas) o en combinación con Kaftrio (columnas rayadas). Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de los compuestos PBF en relación con la obtenida con Kaftrio individual. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=1).

Dado que se disponía de organoides derivados de dos individuos con el mismo genotipo (FQ1 y FQ2, F508del/F508del), se compararon las respuestas de ambos tras el uso de los agonistas en combinación con Kaftrio (Figura 38). Se observó que el uso de PBF-21 provocó una respuesta significativamente mayor en FQ2 que en FQ1, tanto a 1 μM (p-valor = 0,0005) como a 10 μM (p-valor = 0,0160). En el caso de PBF-22, también se observó una función significativamente mayor en FQ2 que en FQ1 en las dos concentraciones utilizadas (a 0,1 μM p-valor = <0,0001; a 1 μM p-valor = 0,0162).



**Figura 38. Comparación de las respuestas obtenidas en organoides intestinales derivados de dos individuos con las variantes patogénicas F508del/F508del.** Se compararon las respuestas funcionales de la CFTR a tiempo 180 min de los individuos FQ1 (barras lisas) y FQ2 (barras rayadas). Los organoides intestinales de FQ1 y FQ2 se trataron con Kaftrio y se estimuló la activación de la CFTR mediante el uso del agonista  $A_{2B}R$  PBF-21 y PBF-22. En cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Las barras en los gráficos representan el SEM. Los niveles de significancia se indican como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; y "ns" para no significativo. (n=2).

La respuesta basal de la CFTR, así como la respuesta tras el uso de los agonistas de  $A_{2B}R$  en organoides intestinales de FQ3 (F508del/L206W) se muestran en la Figura 39. En este caso, aunque no se detectó función de la CFTR con FSK a  $0,128 \mu M$  sí que se observó a  $5 \mu M$ . En la Figura A4 de los Anexos se muestra la respuesta de la CFTR tras el uso de distintas concentraciones de FSK. El empleo de NECA también indujo un aumento del área de los organoides, tanto a  $0,385 \mu M$  como a  $1 \mu M$ . Además, esta respuesta se vio incrementada en combinación con Kaftrio. La respuesta ante el uso de Kaftrio de forma individual (AUC= 8499,08) fue similar a la obtenida con FSK 2 (AUC = 8337,9).

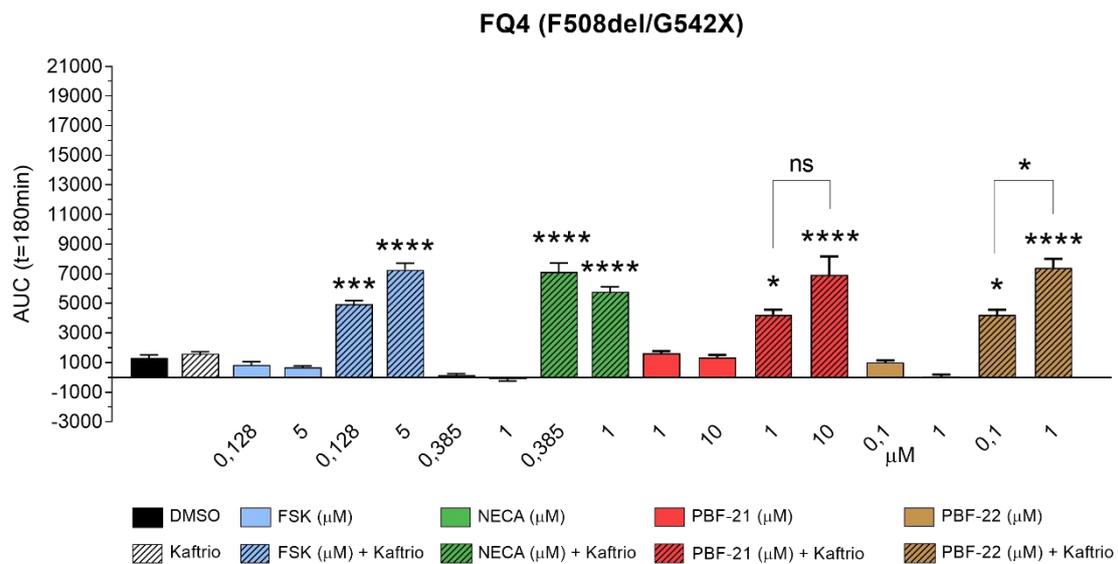


**Figura 39. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de agonistas de A<sub>2B</sub>R en organoides intestinales derivados de FQ3 (F508del/L206W).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,128/5 μM) o con NECA (a 0,385 y 1 μM). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. También se evaluaron los agonistas PBF-21 (a 1 y 10 μM) y PBF-22 (a 0,1 y 1 μM) de forma individual (columnas lisas) o en combinación con Kaftrio (columnas rayadas). Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de los compuestos PBF en relación con la obtenida con Kaftrio individual. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=1).

A diferencia de lo observado en los homocigotos F508del-CFTR previamente comentados, tras el uso de PBF-21 a 10 μM y PBF-22 a 1 μM en organoides derivados de FQ3 la respuesta observada fue mayor. Esta respuesta, en ambos casos, fue similar a la obtenida al utilizar únicamente Kaftrio (PBF-21 p-valor = 0,9923; PBF-22 p-valor = 0,9932). Al comparar la respuesta observada con Kaftrio con la obtenida al combinar Kaftrio con PBF-21 (a 1 y 10 μM), se aprecia un incremento significativo del 51% y 107,6%, respectivamente. Cabe destacar que la respuesta entre las dosis de PBF-21, tanto en su empleo de forma individual como en combinación con Kaftrio, fue mayor al utilizar la dosis más alta. Concretamente, la respuesta de PBF-21 a 10 μM+Kaftrio fue un 37,27% mayor que la registrada con 1 μM+Kaftrio. En el caso de PBF-22, al utilizar el compuesto solo, también se detectó una mayor respuesta con la concentración más alta. Sin embargo, cuando se combinó con Kaftrio se observó una disminución, aunque no fue significativa (p-valor = >0,999).

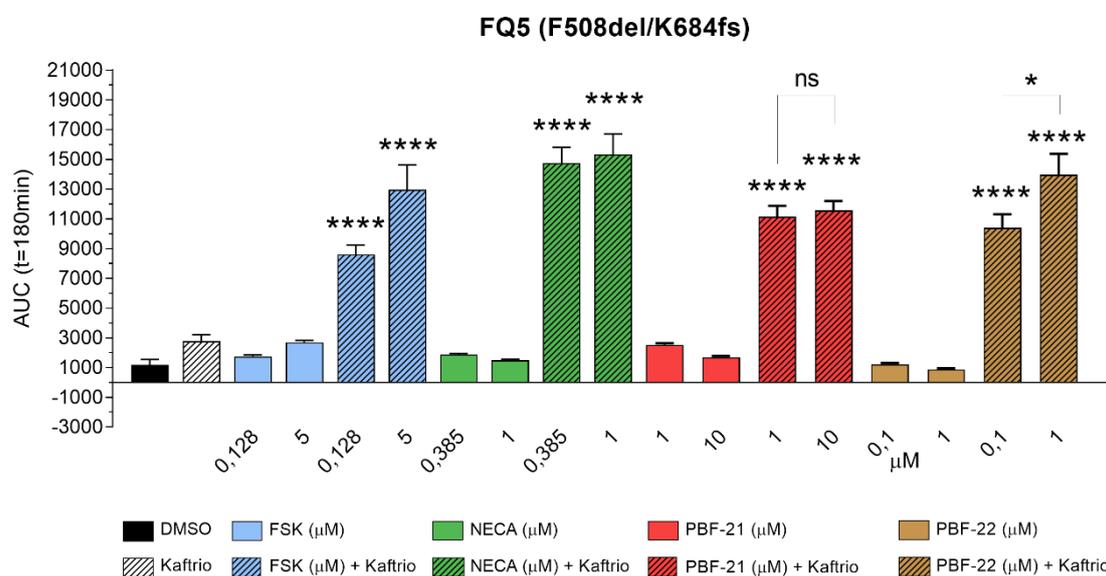
La combinación de PBF-22 con Kaftrio, en las dos concentraciones testadas, dio lugar a una respuesta significativamente mayor que al utilizar el agonista solo (p-valor = <0,0001). De hecho, esta respuesta fue un 78,12% (a 0,1  $\mu$ M) y 72,88% (a 1  $\mu$ M) mayor que la obtenida con el Kaftrio solo.

En la Figura 40 se muestran los resultados del ensayo realizado con los organoides derivados de FQ4, con genotipo F508del/G542X. En la Figura A5 de los Anexos se detalla la respuesta de la CFTR tras el uso de distintas concentraciones de FSK. No se obtuvieron cambios significativos en el área de los organoides tras el uso de FSK o NECA de forma individual, mientras que al combinar cada compuesto con Kaftrio se pudo detectar un incremento de la función de la CFTR. Del mismo modo, el uso de agonistas del  $A_{2B}R$  no indujo un aumento del área de los organoides y, sin embargo, en combinación con Kaftrio sí que hubo una respuesta mayor de la CFTR. En ambos casos, la combinación de cada compuesto con Kaftrio mostró un comportamiento dosis dependiente, aunque únicamente significativo en el caso de PBF-22 (p-valor = <0,0001).



**Figura 40. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de agonistas de  $A_{2B}R$  en organoides intestinales derivados de FQ4 (F508del/G542X).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,128/5  $\mu$ M) o con NECA (a 0,385 y 1  $\mu$ M). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. También se evaluaron los agonistas PBF-21 (a 1 y 10  $\mu$ M) y PBF-22 (a 0,1 y 1  $\mu$ M) de forma individual (columnas lisas) o en combinación con Kaftrio (columnas rayadas). Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de los compuestos PBF en relación con la obtenida con Kaftrio individual. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001; y "ns" para no significativo. (n=1).

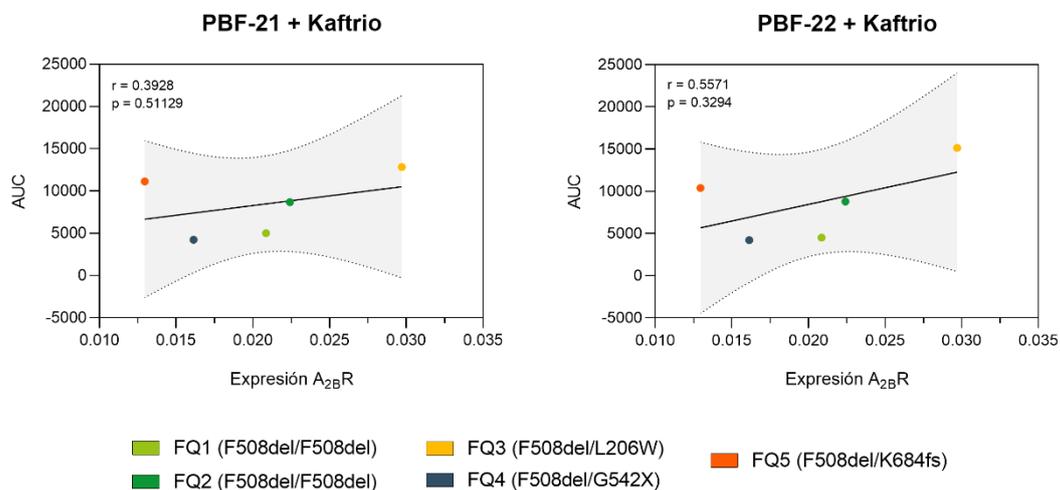
En la Figura 41 se muestran los resultados de los organoides intestinales de FQ5 (F508del/K684fs). En la Figura A6 de los Anexos, se detalla la respuesta de la CFTR tras el uso de distintas concentraciones de FSK. Al igual que en los casos anteriormente descritos, no se observó respuesta ante el uso de FSK o NECA de forma individual. Sin embargo, cuando se combinó con Kaftrio la respuesta fue significativa. Este patrón también se observó con el uso de los agonistas: únicamente el uso de los agonistas PBF-21 y PBF-22 provocó una respuesta significativa cuando los organoides se incubaron con Kaftrio. Además, se pudo determinar que este incremento fue dosis-dependiente tanto con PBF-21 como con PBF-22, aunque únicamente dio significativo con ese último ( $p$ -valor = 0,0478).



**Figura 41. Estudio de la funcionalidad de la CFTR tras el uso de agonistas de A<sub>2b</sub>R en organoides intestinales derivados de FQ5 (F508del/K684fs).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,128/5 μM) o con NECA (a 0,385 y 1 μM). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. También se evaluaron los agonistas PBF-21 (a 1 y 10 μM) y PBF-22 (a 0,1 y 1 μM) de forma individual (columnas lisas) o en combinación con Kaftrio (columnas rayadas). Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de los compuestos PBF en relación con la obtenida con Kaftrio individual. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; y "ns" para no significativo. (n=1).

Por último, se analizó si el nivel de respuesta de la CFTR observado tras el uso de los agonistas de A<sub>2B</sub>R, PBF-21 y PBF-22, se relacionaba con el nivel de expresión del A<sub>2B</sub>R. Para ello, se llevó a cabo un estudio de correlación comparando i) los valores de AUC de cada individuo FQ de sus respectivos ensayos funcionales, previamente mencionados, al emplear PBF-21 1 μM + Kaftrio o PBF-22 0,1 μM + Kaftrio y ii) los valores de expresión de A<sub>2B</sub>R de los estos mismos individuos FQ, según se muestra en la Figura 16.

Los resultados, mostrados en la Figura 42, indicaron la ausencia de correlación entre el nivel de expresión de A<sub>2B</sub>R y la respuesta de la CFTR tras el uso de los agonistas PBF-21 y PBF-22 en combinación con Kaftrio.



**Figura 42. Estudio de correlación entre expresión de A<sub>2B</sub>R en organoides intestinales derivados de individuos FQ con la respuesta de la CFTR tras el uso de los agonistas de A<sub>2B</sub>R.** Se estudiaron cinco individuos afectados por la FQ con los genotipos F508del/F508del (FQ1 y FQ2), F508del/L206W (FQ3), F508del/G542X (FQ4) y F508del/K684fs (FQ5). Se compararon las respuestas de la CFTR de los organoides intestinales de cada individuo tras el empleo de los agonistas de A<sub>2B</sub>R PBF-21 (a 1 μM) o PBF-22 (a 0,1 μM) en combinación con Kaftrio con la expresión génica de A<sub>2B</sub>R de cada individuo. Se utilizaron los valores de los ensayos funcionales de las Figuras 36, 37, 39, 40, 41 y los valores de expresión génica mostrados en la Figura 16 (n=5).



## **V – Discusión**



La FQ es la enfermedad autosómica recesiva más prevalente en la población caucásica. El amplio espectro de variantes patogénicas del gen *CFTR* actualmente descritas se asocia con una diversidad en la afectación de la conformación y función de la proteína, lo que está directamente relacionado con la severidad de los síntomas. Además, la expresión del *CFTR* en diversos tejidos epiteliales caracteriza a la FQ como una enfermedad multisistémica, siendo los aparatos respiratorio y digestivo los más afectados. La FQ ha sido históricamente una enfermedad cuyas terapias han sido dirigidas a tratar las consecuencias fisiopatológicas causadas por la disfunción o ausencia de la *CFTR*, mediante broncodilatadores, antibióticos o con un soporte nutricional, entre otras estrategias. Sin embargo, desde que se disponen de los compuestos moduladores, dirigidos específicamente a corregir la estructura y/o mejorar la función de la *CFTR*, la calidad de vida de muchos individuos afectados por la FQ ha mejorado notablemente. Los moduladores se clasifican entre correctores, si permiten mejorar la conformación proteica, o potenciadores, si tienen el objetivo de mejorar la función del canal. Sin embargo, estos compuestos están aprobados para variantes del *CFTR* específicas [124], lo que limita su utilidad a un determinado grupo de personas afectadas por la FQ. Además, existen evidencias que demuestran una variabilidad de respuesta al tratamiento incluso entre individuos con el mismo genotipo [31,45], sugiriendo la participación de factores genéticos y no genéticos [50,125]. Este contexto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas líneas terapéuticas más específicas y eficaces, que tengan en cuenta el contexto genético y fenotípico de cada individuo.

En enfermedades como la FQ, la medicina personalizada cobra especial importancia, siendo necesario prever cómo responderá cada individuo a cada tipo de modulador para poder seleccionar el tratamiento más adecuado. El uso de modelos primarios, como son los organoides intestinales, pueden ser una herramienta de investigación con la que explorar vías alternativas que permitan mejorar la función de la *CFTR*. En esta línea, este proyecto se ha centrado en el estudio de la modulación de los RAs como posible tratamiento complementario para la FQ, dado que la activación de la *CFTR* se inicia por un incremento de AMPc.

La actividad de los RAs tiene un impacto directo en la función de la enzima AC y, como consecuencia, en la producción de AMPc. Específicamente,  $A_{2A}R$  y  $A_{2B}R$  activan la enzima, promoviendo el incremento de los niveles de AMPc intracelular, mientras que  $A_{1}R$  y  $A_{3}R$  la inhiben, afectando negativamente a la producción de AMPc. La activación de la *CFTR* requiere ciertos niveles de AMPc, por lo que la relación entre los RAs y la *CFTR* ha sido de interés en la investigación de la FQ [126].

Sin embargo, a pesar del gran auge del uso de los organoides intestinales en la investigación de la FQ, llegando a convertirse en el modelo "*gold standard*" [127], nunca antes se había explorado la influencia de los RAs en la función de la CFTR en organoides intestinales. Por este motivo, en este proyecto fue necesario inicialmente caracterizar la expresión de los cuatro subtipos de RAs en organoides intestinales, tanto derivados de individuos WT como de individuos FQ.

Para ello, se procedió primero a la validación del método de análisis de la expresión génica utilizando las líneas inmortalizadas Caco-2 y Calu-3. La selección de estas líneas celulares se basó en tres razones principales. En primer lugar, a diferencia de los organoides intestinales, Caco-2 y Calu-3 representan un modelo celular cultivado en 2D, que es fácil de cultivar y con una rápida expansión celular. Estas características facilitaron y agilizaron el proceso de validación. En segundo lugar, la expresión de los RAs en ambas líneas celulares ha sido previamente caracterizada, lo que proporcionó una base de comparación de los resultados obtenidos, aumentando así la fiabilidad de la metodología utilizada. Por último, tanto Caco-2 como Calu-3 son líneas celulares ampliamente utilizadas en el estudio de la FQ, ya que provienen de tejidos que están afectados por esta enfermedad [128–130]. Caco-2 deriva de un adenocarcinoma colorrectal humano, por lo que su uso en este proyecto adquirió especial relevancia dado que posteriormente se analizaría la expresión de los RAs en organoides intestinales. Por otro lado, Calu-3 al derivar de un adenocarcinoma pulmonar humano se utilizó como representación del tejido más comprometido en FQ y como herramienta adicional para la validación del método.

El perfil de expresión génica de los RAs obtenido en ambas líneas celulares fue acorde con los resultados publicados [98,113,131], mostrando una predominancia del subtipo A<sub>1</sub>R en Caco-2 y A<sub>2B</sub>R en Calu-3. En ninguna de las líneas se detectó la expresión de A<sub>3</sub>R, lo cual concuerda con lo esperado. Posteriormente, se evaluó la expresión de los RAs en organoides intestinales derivados de tres individuos WT. A diferencia de lo observado en Caco-2, en los organoides intestinales WT, el subtipo A<sub>2B</sub>R mostró una expresión significativamente mayor que los otros receptores. Este hallazgo cobra especial importancia ya que A<sub>1</sub>R y A<sub>2B</sub>R tienen efectos opuestos en la producción de AMPc y activación de la CFTR, lo que implica la necesidad de adoptar un enfoque diferente en la modulación de ambos receptores. Este resultado subraya la importancia de emplear modelos celulares derivados de individuos en el estudio de la FQ, ya que las diferencias entre estos modelos y las líneas celulares inmortalizadas pueden influir en los resultados de la investigación.

Una vez caracterizada la expresión de los RAs en organoides WT, se procedió a estudiar la expresión de estos receptores en organoides intestinales derivados de ocho individuos afectados por la FQ, quienes presentaban distintos genotipos: F508del/F508del (FQ1 y FQ2), F508del/L206W (FQ3), F508del/G542X (FQ4), F508del/K684fs (FQ5), G542X/K668X (FQ6), G542X/G542X (FQ7) y S589N/1812-1G>A (FQ8). En todos los casos analizados, se observó que el subtipo A<sub>2B</sub>R fue el predominante. Además, se encontró que los organoides FQ presentaban niveles superiores de A<sub>2B</sub>R en comparación con los de WT.

Es importante destacar que el origen de las biopsias utilizadas para generar los organoides intestinales fue diferente entre los grupos estudiados, limitada propiamente por la disponibilidad de obtención de cada tipo de biopsias. En el grupo de individuos WT, se aprovechó la intervención quirúrgica intestinal a la que debían someterse por una enfermedad ajena a la FQ para así obtener biopsias de tejido sano del colon derecho. Para la generación de organoides intestinales de individuo FQ, se optó por realizar biopsias rectales, ya que es una metodología menos invasiva.

El diferente nivel de expresión de los RAs observado entre el grupo WT y FQ podría deberse a que A<sub>2B</sub>R podría tener una expresión distinta en colon derecho en comparación con la del recto. La propia expresión del *CFTR* es un ejemplo de ello, ya disminuye a lo largo del eje proximal-distal del tracto gastrointestinal [7]. Sin embargo, también podría deberse a variaciones en el nivel de expresión del gen de referencia utilizado para la RT-qPCR (*PPIA*). Aunque se ha descrito que el *PPIA* es un buen gen de referencia en el colon debido a su alta estabilidad [132], aún no se ha evaluado si esta expresión es equivalente entre las regiones del colon y el recto. Por tanto, sería aconsejable ampliar el número de muestras analizadas y disponer de biopsias rectales de individuos WT con las que generar organoides intestinales. De esta manera, se podría verificar si la expresión de *PPIA* y de los RAs en los organoides intestinales depende de la región intestinal de la cual derivan. En el caso que la expresión de los RAs no se viera afectada por la localización de la biopsia, los resultados obtenidos en este proyecto podrían sugerir la existencia de algún mecanismo que induce el aumento de la expresión de A<sub>2B</sub>R en organoides intestinales FQ. Este incremento no sería un hecho aislado de la FQ, dado que también se ha descrito que sucede en enfermedades intestinales, como la colitis [133,134], y pulmonares, como la FQ [135,136].

Al estudiar en detalle la expresión de A<sub>2B</sub>R en los organoides intestinales FQ, se observó una notable variabilidad entre los distintos genotipos analizados, incluso entre individuos con el mismo genotipo (FQ1 y FQ2 con F508del/F508del).

Las diferencias significativas obtenidas podrían ser el resultado de la variabilidad intrínseca entre los individuos debido a su contexto genético, aunque sería necesario estudiar a un mayor número de individuos para obtener una evidencia más concluyente.

Para investigar el efecto de los RAs en la función de la CFTR, se adaptó el ensayo funcional FIS, el cual se ha consolidado como una herramienta ampliamente validada y utilizada para estudiar la función del canal CFTR en organoides intestinales [77,78,87]. Este método se basa en la activación de la CFTR a través de la FSK, una sustancia que activa directamente la AC, lo que resulta en un aumento de los niveles de AMPc intracelular. Este aumento permite la activación de la CFTR, que media el flujo de Cl<sup>-</sup> hacia la luz de los organoides, causando un incremento de su volumen. Este fenómeno puede cuantificarse a lo largo del tiempo mediante la adquisición de imágenes y comparando los cambios en el área observada en cada intervalo de tiempo respecto a su estado basal, es decir, antes de la adición de la FSK.

Para la estimulación de los RAs se utilizó NECA, un análogo de la Ado y agonista no selectivo de los RAs. NECA permite la estimulación de los cuatro subtipos de RAs, aunque presenta diferentes niveles de afinidad para cada uno de ellos, siendo  $A_3R > A_1R > A_{2A}R > A_{2B}R$  [137]. Aunque NECA ha sido utilizada previamente como estimulador de los RAs en líneas celulares inmortalizadas [113] y en células epiteliales bronquiales humanas [138] para estudiar el flujo de iones mediado por la CFTR, esta es la primera vez que se emplea en organoides intestinales. Por lo tanto, fue necesario evaluar primero la EC50 de NECA en este modelo utilizando el ensayo FIS. Posteriormente, se comparó la respuesta funcional producida por esta concentración de NECA con la respuesta obtenida al emplear las concentraciones de FSK comúnmente utilizadas en el ensayo FIS. Los resultados revelaron que la respuesta con NECA fue similar a la obtenida con las dosis más elevadas de FSK, sugiriendo que la estimulación de los RAs es más eficiente en la activación de la CFTR que la estimulación directa de la AC por FSK. Se ha demostrado que la CFTR y el  $A_{2B}R$  forman parte de un macrocomplejo en la membrana plasmática [139], cuya proximidad física aumenta la producción de AMPc estimulada por  $A_{2B}R$  en comparación con FSK [107]. Este hecho, junto con la reubicación de  $A_{2B}R$  en la membrana plasmática observada tras el uso de Ado, la cual es dependiente de la presencia de la CFTR [107], podría explicar por qué se ha obtenido una mejor respuesta en los organoides intestinales WT al ser estimulados con NECA en comparación con FSK. La combinación de NECA con FSK mostró una respuesta sinérgica, aunque no significativa, lo que sugiere una posible saturación funcional del canal.

Con el propósito de relacionar los cambios observados en el área de los organoides tras la estimulación de los RAs con el flujo de iones a través de la CFTR, se llevó a cabo un ensayo funcional en el cual los organoides intestinales WT fueron tratados con un inhibidor específico de la CFTR y posteriormente fueron estimulados con NECA. La aplicación del inhibidor provocó una disminución significativa de la función de la CFTR en los organoides tratados en comparación con los no inhibidos, lo que indica la participación de la CFTR en el aumento del área de los organoides. Sin embargo, a pesar de la inhibición de la CFTR, se observó cierto incremento de los organoides, lo que sugiere la existencia de vías independientes a la CFTR que contribuyen al flujo de iones en los organoides intestinales. Un ejemplo de ello podría ser el transportador TMEM16A, también conocido como ANO1, que media el flujo de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$  y es dependiente de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [140,141]. Los receptores  $\text{A}_1\text{R}$  y  $\text{A}_3\text{R}$ , además de inhibir la AC a través de la proteína  $\text{G}_i$ , también activan la fosfolipasa C (PLC) mediante una proteína G diferente, la  $\text{G}_q$ . La PLC, a su vez, induce el aumento de los niveles de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Seguidamente, IP3 favorece la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, aumentando los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y favoreciendo la activación de TMEM16A. Por consiguiente, el uso de NECA podría estar estimulando a TMEM16A, lo que explicaría el incremento en el tamaño de los organoides a pesar de la inhibición de la CFTR.

Por último, se confirmó que la estimulación de la CFTR en los organoides intestinales, tras la exposición a NECA, ocurre mediante el aumento de AMPc, tal como se ha observado en líneas inmortalizadas [107,113]. Además, se observó que dicho aumento de AMPc fue significativamente superior que el obtenido al emplear FSK a la misma concentración, lo que indica que NECA presenta una mayor eficacia en la producción de AMPc. El incremento de los niveles de AMPc generado por la estimulación de NECA de los  $\text{A}_{2A}\text{R}$  y  $\text{A}_{2B}\text{R}$  podría activar también a SLC26A3. Esta proteína se expresa en el tracto gastrointestinal actuando de forma ligeramente diferente dependiendo de la región en la que se encuentra [141]. Específicamente, en el tramo que concierne el colon derecho (de donde se obtuvieron las biopsias empleadas para generar los organoides intestinales WT) actúa como intercambiador entre la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  hacia el espacio luminal y la absorción de ácidos grasos de cadena corta [142,143]. De manera que, la secreción de  $\text{HCO}_3^-$  mediada por SLC26A3 también podría explicar el aumento del área de los organoides observado a pesar de la inhibición de la CFTR.

Una vez caracterizada la expresión de los RAs y demostrada su implicación en la función de la CFTR mediante el aumento de AMPc, se investigó cuál sería el mejor subtipo de RA para modular su función con el fin de potenciar la respuesta de la CFTR. El aumento de los niveles de AMPc registrado tras el uso de NECA fue indicativo de una mayor implicación de los receptores  $\text{A}_{2A}\text{R}$  y  $\text{A}_{2B}\text{R}$ , dado que activan la función de la AC.

Este hecho, sumado a los resultados de la expresión génica de los RAs, sugirió que la función de la CFTR tras la estimulación con NECA podría ser principalmente a través de A<sub>2B</sub>R. Sin embargo, es importante recordar que A<sub>2B</sub>R presenta una menor afinidad por NECA que el resto de los RAs [144], debido a la existencia de un bucle extracelular que afecta a la selectividad del ligando y a la estabilidad de las conformaciones activas del receptor [145]. La baja afinidad de A<sub>2B</sub>R podría indicar que la modulación de dicho receptor no sea tan efectiva como lo sería actuar sobre A<sub>1</sub>R o A<sub>2A</sub>R. Por esta razón, se optó por evaluar diferentes antagonistas para los cuatro subtipos de RA con el fin de determinar cuál de ellos sería el mejor candidato para modular su actividad e inducir así una mayor actividad de la CFTR.

Se evaluó el efecto que producían 20 compuestos (PBF) antagonistas de la empresa Palobiofarma, S.L en la función de la CFTR mediante el ensayo FIS en organoides intestinales WT. Dado que en el momento en que se realizaron los ensayos no se disponía de los valores de afinidad de cada compuesto (IC<sub>50</sub>), se decidió combinar cada uno de ellos con NECA para discernir su efecto antagonista al comparar su respuesta con la obtenida únicamente con NECA. Se decidió utilizar una concentración de NECA mayor que el valor de EC<sub>50</sub> obtenido previamente, es decir, 1 μM en lugar de 0,385 μM, con el objetivo de evitar que los resultados se vieran afectados por la concentración de NECA.

Los valores de IC<sub>50</sub> de cada compuesto se obtuvieron después de realizar los estudios funcionales, por lo que el uso de estos antagonistas fue un ensayo ciego. Cada compuesto presentaba cierta afinidad para cada uno de los cuatro subtipos de RA. Para facilitar su análisis, las respuestas funcionales de los 20 antagonistas se agruparon en cuatro grupos distintos, basados en los valores de IC<sub>50</sub> que indicaban la mayor selectividad hacia uno de los RAs (A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R o A<sub>3</sub>R). Sin embargo, los compuestos PBF-19 y PBF-20 presentaron valores de IC<sub>50</sub> similares hacia dos subtipos de RAs opuestos, por lo que se agruparon en un quinto grupo. De cada uno de los cuatro grupos, se seleccionó el compuesto más selectivo de cada receptor como representante de la acción que producía la inhibición de cada subtipo de RA en la función de la CFTR. Los compuestos seleccionados fueron: PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R), PBF-07 (antag. A<sub>2A</sub>R), PBF-13 (antag. A<sub>2B</sub>R) y PBF-17 (antag. A<sub>3</sub>R).

PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R) y PBF-17 (antag. A<sub>3</sub>R) mostraron la respuesta esperada, al inducir una función de la CFTR superior a la obtenida únicamente con NECA. Por el contrario, PBF-07 (antag. A<sub>2A</sub>R), PBF-13 (antag. A<sub>2B</sub>R) también produjeron el efecto esperado, inhibiendo la respuesta de la CFTR.

Estos resultados sugieren que el uso de los antagonistas de A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R podrían ser una buena estrategia para incrementar la función de la CFTR mientras que sería necesario emplear agonistas de A<sub>2A</sub>R y A<sub>2B</sub>R para producir el mismo efecto positivo en la CFTR. En base a estos resultados, se decidió utilizar PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R) y PBF-17 (antag. A<sub>3</sub>R) en organoides FQ.

Al comparar las respuestas funcionales obtenidas con PBF-07 (antag. A<sub>2A</sub>R) y PBF-13 (antag. A<sub>2B</sub>R), se observó que la inhibición fue más significativa con el antagonista de A<sub>2B</sub>R, posiblemente debido a la mayor expresión de este receptor en los organoides intestinales. En base a estos resultados, se decidió utilizar dos agonistas de A<sub>2B</sub>R, PBF-21 y PBF-22, para evaluar su efecto en organoides FQ.

Si bien en los ensayos funcionales de cribado de los compuestos antagonistas estos fueron combinados con NECA (1 µM), se consideró evaluar también el efecto aislado, en ausencia de NECA, de los compuestos PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R), PBF-17 (antag. A<sub>3</sub>R), PBF-21 (ag. A<sub>2B</sub>R) y PBF-22 (ag. A<sub>2B</sub>R) en organoides WT.

El uso de PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R) no indujo una respuesta significativa en la función de CFTR, al contrario de lo observado al utilizar otros antagonistas de A<sub>1</sub>R en línea pancreática CPAC [146]. El uso combinado de PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R) con NECA sí que dio lugar a un cambio en el área de los organoides. En este caso, se empleó una concentración de NECA menor a la utilizada en los ensayos funcionales del cribado (0,385 µM en vez de a 1 µM) para evitar una posible saturación de la función de la CFTR y poder observar mejor los posibles efectos del antagonista. Estos resultados sugieren que compuesto PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R) afecta negativamente a la función del CFTR, aunque se desconoce el mecanismo por el cual sucede.

El compuesto PBF-17 (antag. A<sub>3</sub>R) provocó un aumento del área de los organoides, aunque por debajo de la respuesta observada al utilizar únicamente NECA. Este resultado no fue el esperado, ya que no se detectó la expresión génica de A<sub>3</sub>R mediante RT-qPCR. En este caso, la respuesta observada podría deberse a la inhibición sobre A<sub>1</sub>R, el segundo subtipo de RA por el que el compuesto PBF-17 presenta una mayor afinidad.

Con el objeto de verificar si el efecto de los antagonistas PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R) y PBF-17 (antag. A<sub>3</sub>R) observado en organoides WT era similar en organoides FQ, se emplearon organoides derivados del individuo FQ1, cuyo genotipo F508del/F508del es el más prevalente en la FQ y, por ello, se utiliza como referencia [29,30]. Los resultados del ensayo confirmaron lo observado con PBF-03 en organoides WT, ya que no se observó una respuesta en los organoides FQ, como tampoco se observó en este caso con PBF-17.

La presencia de la variante F508del-*CFTR* afecta al tráfico de la *CFTR*, lo que resulta en una menor cantidad de la proteína que finalmente llega a la membrana. Además, la *CFTR* que consigue insertarse en la membrana plasmática presenta problemas de funcionalidad. La falta de respuesta de la *CFTR* en los organoides de FQ1 tras el tratamiento con PBF-03 y PBF-17 podría estar relacionada con los problemas intrínsecos causados por la variante patogénica del *CFTR* en lugar de la ineficacia de estos compuestos. La ausencia de respuesta basal ante el uso de FSK también respalda esta hipótesis y pone de manifiesto la necesidad de utilizar moduladores para corregir y potenciar la *CFTR* antes de inducir la activación del canal mediante los compuestos PBF. Entre los moduladores disponibles, se seleccionó Kaftrio, cuyo uso clínico está aprobado para individuos que presenten al menos una variante F508del-*CFTR* [59]. A diferencia de los resultados obtenidos al combinar FSK y NECA con Kaftrio, las combinaciones de PBF-03 (antag. A<sub>1</sub>R) o PBF-17 (antag. A<sub>3</sub>R) con Kaftrio no indujeron un aumento del área de los organoides de FQ1. Estos resultados sugieren que el uso de PBF-03 o PBF-17 no es una estrategia farmacológica efectiva para la FQ.

Los resultados obtenidos con los antagonistas de A<sub>1</sub>R y A<sub>3</sub>R en conjunto con la expresión predominante de A<sub>2B</sub>R sugieren que la utilización de los agonistas de A<sub>2B</sub>R PBF-21 y PBF-22 podrían ser buenos candidatos para potenciar la función de la *CFTR* en FQ. Como en el caso anterior, primero se emplearon ambos agonistas en organoides intestinales WT. Los resultados fueron consistentes con lo esperado, ya que se observaron respuestas similares a las obtenidas con NECA (utilizada como control positivo), indicando la estimulación de la *CFTR*. Tanto PBF-21 como PBF-22 mostraron una respuesta dosis-dependiente, siendo más potente en el caso de PBF-22. El análisis de la EC<sub>50</sub> de ambos compuestos confirmó que PBF-22 presenta una afinidad diez veces mayor por A<sub>2B</sub>R que PBF-21.

Posteriormente, se evaluaron PBF-21 y PBF-22 en organoides intestinales derivados de los individuos FQ1, FQ2, FQ3, FQ4 y FQ5. Estos individuos fueron seleccionados debido a que todos presentan al menos una variante F508del-*CFTR* y es posible utilizar Kaftrio en todos ellos. FSK, NECA, PBF-21 y PBF-22 se evaluaron de forma individual y en combinación con Kaftrio. Las variantes patogénicas de FQ1 (F508del/F508del), FQ2 (F508del/F508del), FQ4 (F508del/G542X) y FQ5 (F508del/K684fs) están clasificadas como de función mínima, por lo que la ausencia de una respuesta significativa ante el uso de FSK o NECA era esperada. En cambio, FQ3 (F508del/L206W) fue el único que mostró una función basal residual, ya que presenta la variante L206W-*CFTR* está clasificada como variante de función residual. En los cinco casos estudiados, el uso combinado de FSK o NECA con Kaftrio potenció la función de la *CFTR*, que fue mayor que la obtenida al emplear únicamente Kaftrio.

Esto demuestra que no solo es necesario mejorar la conformación de la proteína, sino que el uso combinado de un activador y un modulador permite potenciar la función basal de la CFTR. El uso individual de PBF-21 y PBF-22 no indujo una respuesta de la CFTR en los organoides FQ, excepto en FQ3, como era de esperar, ya que este individuo presentaba función residual. En organoides con dos variantes *CFTR* de función mínima únicamente se detectó respuesta de la CFTR al emplear PBF-21 o PBF-22 en combinación con Kaftrio. Es importante destacar que la combinación de PBF-21 con Kaftrio mostró una relación dosis-dependiente, aunque esta solo fue significativa en FQ1 y FQ3. Por otro lado, PBF-22 exhibió un comportamiento diferente y dependiente del genotipo. En FQ1, FQ2 y FQ3 se observó una disminución en la función de la CFTR al emplear dosis más altas del agonista (y en combinación con Kaftrio). Sin embargo, en FQ4 y FQ5, los cuales presentan una variante STOP, esta respuesta fue dosis-dependiente. Estos hallazgos sugieren que la presencia de una variante STOP puede influir en la tolerancia de PBF-22.

Al comparar las respuestas de los individuos FQ1 y FQ2, que comparten el mismo genotipo (F508del/F508del), se evidenció una variabilidad intrínseca entre ellos. Esto subraya nuevamente la importancia de emplear modelos derivados de pacientes para evaluar de forma personalizada la respuesta a nuevos fármacos.

Por último, se quiso estudiar si el nivel de expresión de  $A_{2B}R$  estaba relacionado con la respuesta observada en los organoides intestinales FQ tras la estimulación de los agonistas de  $A_{2B}R$  PBF-21 o PBF-22. Sin embargo, no se evidenció una correlación entre dichas variables, aunque sería necesario aumentar el número de individuos estudiados para incrementar la robustez del estudio.

En conjunto, los resultados de los ensayos funcionales en organoides intestinales FQ indican que el uso combinado de Kaftrio con los agonistas de  $A_{2B}R$ , en concreto con PBF-21 o PBF-22, podría ser una buena estrategia para mejorar la función de la CFTR en individuos afectados por la FQ. Los RAs no son el único tipo de GPCRs que están siendo evaluados con esta finalidad. Un ejemplo son los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, que mediante el uso de agonistas se ha demostrado que es posible inducir la secreción de  $Cl^-$  mediada por la CFTR tanto en organoides intestinales [147] como nasales [148].

Los  $A_{2B}R$  tienen un papel evidente en la inflamación, suponiendo un reto el desarrollo de terapias farmacológicas basadas en su modulación. La activación de  $A_{2B}R$  en las células intestinales desencadena la liberación de citoquinas como la IL-6, que contribuyen y amplifican el curso de la inflamación intestinal [149].

Sin embargo, también se ha visto que A<sub>2B</sub>R tiene un efecto protector en la fase de inflamación aguda de la colitis, mediante la inducción de la expresión de IL-10 [134]. Este papel dual de A<sub>2B</sub>R también se ha descrito en el sistema respiratorio. Varios estudios con modelos de ratón *knockout* del gen que codifica para el A<sub>2B</sub>R (*ADORA2B*) demostraron su papel antiinflamatorio y protector [150]. Por el contrario, ratones modificados genéticamente para mantener niveles altos de Ado (siendo deficientes de la enzima adenosina desaminasa, encargada de la metabolización de Ado) desarrollaron inflamación y daño pulmonar progresivos asociados a la activación del A<sub>2B</sub>R [151]. Este mismo modelo de ratón bajo el tratamiento de un antagonista de A<sub>2B</sub>R fue capaz de mostrar signos de mejora pulmonar [152], lo que indica la contribución de A<sub>2B</sub>R en la lesión pulmonar.

Es necesario estudiar la implicación que supondría el empleo de los agonistas de A<sub>2B</sub>R, como PBF-21 o PBF-22, tanto el tracto intestinal como en el sistema respiratorio. Además, es importante tener en cuenta que la vía A<sub>2B</sub>R se ha asociado con problemas cardiovasculares [153,154]. La administración del compuesto en forma de aerosol y la modificación de la molécula para promover su degradación en plasma no solo dirigirían la acción de los agonistas al sistema respiratorio, sino que también evitarían efectos secundarios sistémicos.

En conclusión, esta tesis doctoral ha logrado caracterizar por primera vez la expresión de los RAs en organoides intestinales WT y FQ. La optimización y validación del ensayo funcional FIS para estudiar la función de la CFTR tras la estimulación de los RA ha permitido analizar más de 20 compuestos moduladores de los distintos RAs de la empresa Palobiofarma, S.L. Los resultados destacan a A<sub>2B</sub>R como el mejor candidato para potenciar la función de la CFTR en organoides intestinales FQ mediante los agonistas PBF-21 y PBF-22.

## **VI – Conclusiones**



De este trabajo de tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Con la puesta a punto del método de RT-qPCR se ha estudiado la expresión de receptores adenosinérgicos (RAs) en líneas inmortalizadas de intestino (Caco-2) y pulmón (Calu-3) y en organoides intestinales de individuos control y afectados por la FQ, observándose un patrón de expresión distinto dependiendo del modelo celular y de su origen, intestinal o respiratorio.
- 2) El análisis de la expresión de los RAs en organoides intestinales WT indicó que  $A_{2B}R$  es el subtipo con mayor expresión en este modelo, seguido de  $A_{1R}$  y  $A_{2A}R$ . No ha sido posible detectar la expresión de  $A_{3R}$ . Este orden de expresión se mantiene en organoides intestinales FQ, independientemente de las variantes patogénicas del *CFTR*.
- 3) Por primera vez, se ha adaptado el ensayo funcional FIS en organoides intestinales utilizando NECA para evaluar cómo afecta la modulación de los RAs en el tamaño de los organoides intestinales, optimizando la concentración de NECA utilizada para estos ensayos.
- 4) Se ha demostrado que los efectos observados en el cambio de tamaño en los organoides intestinales control tras el uso de NECA se deben principalmente a la función de la proteína CFTR, que media el flujo de iones hacia el interior de los organoides provocando el aumento de su tamaño.
- 5) Se ha confirmado que el uso de NECA en organoides intestinales control induce el aumento de los niveles de AMPc, tal como está descrito en otros modelos celulares. Por lo tanto, el uso de NECA activa la función de la proteína CFTR mediante el incremento de AMPc.
- 6) Del cribado de 20 compuestos antagonistas de los RAs disponibles para uso experimental, utilizando el ensayo FIS, se seleccionaron los compuestos PBF-03 y PBF-17, antagonistas de  $A_{1R}$  y  $A_{3R}$  respectivamente, como candidatos para potenciar la función de la CFTR en organoides intestinales FQ. Se descartó el empleo de antagonistas de  $A_{2B}R$  dado que producían una inhibición significativa de la función de la CFTR.
- 7) Los antagonistas PBF-03 y PBF-17 no demostraron activar la función de la CFTR en organoides intestinales FQ con genotipo F508del/F508del, incluso cuando se combinaron dichos compuestos con el modulador del CFTR Kaftrio.

- 8) Se evaluó la capacidad de los agonistas de A<sub>2B</sub>R PBF-21 y PBF-22 para activar la función de la CFTR mediante el ensayo FIS en organoides intestinales control. Al comparar ambos compuestos, se observó una mayor respuesta de PBF-22, siendo hasta diez veces más potente que PBF-21.
- 9) Así mismo, los agonistas PBF-21 y PBF-22 fueron ineficaces en la activación de la CFTR en organoides intestinales FQ con genotipo F508del/F508del o con al menos una variante F508del-CFTR. Cuando se combinó alguno de estos agonistas con el modulador Kaftrio se observó una mayor respuesta que con el uso individual de Kaftrio sugiriendo un efecto sinérgico, dado que estos compuestos experimentalmente incrementan el efecto de los fármacos moduladores.
- 10) Los organoides intestinales de los dos individuos con genotipo F508del/F508del tras el uso combinado de PBF-21 o PBF-22 con Kaftrio presentaron distinta respuesta, poniendo de manifiesto la importancia de emplear modelos derivados de cada paciente para evaluar de forma personalizada la respuesta a estos fármacos.
- 11) En conjunto, estos resultados indican que los fármacos agonistas de A<sub>2B</sub>R pueden ser investigados para aplicarlos como complemento a las terapias actuales de la FQ.

## **VII – Futuras líneas de investigación**



Debido a la dificultad para obtener biopsias intestinales y rectales, a partir de las cuales generar organoides intestinales, este proyecto se ha visto limitado por el reducido número de participantes tanto en el grupo WT como en el FQ. Con el fin de incrementar la robustez de los resultados obtenidos en este proyecto, sería necesario disponer en un futuro de un mayor número de individuos, tanto WT como FQ. Además, sería necesario disponer de biopsias rectales WT para poder comparar los niveles de expresión de los RAs con los obtenidos con individuos FQ.

Los organoides intestinales son el modelo celular de referencia en la investigación de la FQ, sin embargo, es importante tener en cuenta que representan un modelo intestinal y no respiratorio, el órgano principal afectado en esta enfermedad. Por lo tanto, sería interesante investigar el efecto de los agonistas de  $A_{2B}R$ , PBF-21 y PBF-22, en un modelo respiratorio. Previamente, nuestro grupo de investigación validó y optimizó el protocolo de nasoesferas como herramienta para evaluar la respuesta de la CFTR en el epitelio respiratorio nasal de individuos FQ [76]. Con el fin de poder caracterizar la expresión génica de los RAs en células epiteliales nasales, utilizando el método validado en este proyecto, se procedió a la realización de raspados nasales de varios individuos WT. Sin embargo, el material celular obtenido mediante este procedimiento fue limitado e insuficiente para poder realizar el análisis.

Con el objetivo de obtener un número mayor de células nasales de las que poder extraer el ARN y analizar la expresión de los RAs, en el último tramo de este proyecto se utilizó un método que permite expandir y diferenciar las células epiteliales nasales (detallado en Anexos). El procedimiento se extiende a lo largo de 35 días desde el momento de la extracción nasal y presenta diversos puntos críticos que dificultan su llegada a término: i) la obtención de la muestra, la cual si es escasa impide la correcta expansión de las células epiteliales nasales, ii) la falta de diferenciación a pesar de obtener un buen número de células expandidas y iii) el riesgo de contaminación debido a la duración del protocolo y al limitado uso de antibióticos que es necesario para no interferir en los procesos de expansión y diferenciación. Debido a ello, únicamente se consiguió expandir y diferenciar una única muestra de células nasales WT con la que poder realizar el estudio de expresión de los RAs. Los resultados de su análisis se muestran en Anexos (Figura A7) y, al igual que lo observado con la línea celular inmortalizada Calu-3,  $A_{2B}R$  fue el receptor predominante. La obtención de un mayor número de muestras nasales con las que estudiar la expresión de los RAs tras la aplicación del protocolo de expansión y diferenciación, permitirían corroborar este resultado preliminar. Del mismo modo, posteriormente sería interesante poder evaluar el efecto de los agonistas de  $A_{2B}R$ , PBF-21 y PBF-22 en nasoesferas.

Dado el conocimiento sobre la implicación de los agonistas de  $A_{2B}R$  en la inflamación, es fundamental evaluar los efectos de los compuestos PBF-21 y PBF-22 tanto en organoides intestinales como en modelos respiratorios determinando, por ejemplo, la producción de agentes proinflamatorios mediante la cuantificación de citoquinas y moléculas pro y antiinflamatorias. Estos resultados ayudarían a determinar si estos compuestos agonistas podrían llegar a mejorar o exacerbar el proceso inflamatorio asociado a la FQ. Finalmente, se debería investigar la posible aplicación clínica de los agonistas  $A_{2B}R$  como una terapia complementaria a los moduladores existentes.

## **VIII – Bibliografía**



1. Guo, J., Garratt, A., & Hill, A. (2022). Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 21(3), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.01.009>
2. Guo, J., Garratt, A., & Hill, A. (2022). Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 21(3), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.01.009>
3. ECFS Patient Registry Annual Report 2021, Zolin A, Orenti A, Jung A, van Rens J et al, 2023.
4. Kerem, B., Rommens, J. M., Buchanan, J. A., Markiewicz, D., Cox, T. K., Chakravarti, A., Buchwald, M., & Tsui, L. C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 245(4922), 1073–1080. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>
5. Kreda, S. M., Mall, M., Mengos, A., Rochelle, L., Yankaskas, J., Riordan, J. R., & Boucher, R. C. (2005). Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Molecular biology of the cell*, 16(5), 2154–2167. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-1010>
6. Sheppard, D. N., & Welsh, M. J. (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological reviews*, 79(1 Suppl), S23–S45. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.1.S23>
7. Tissue Expression of CFTR - Summary - The Human Protein Atlas Available online: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000001626-CFTR/tissue> (accessed on 9 February 2024).
8. Cebotaru, L., Rapino, D., Cebotaru, V., & Guggino, W. B. (2014). Correcting the cystic fibrosis disease mutant, A455E CFTR. *PloS one*, 9(1), e85183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085183>
9. Sharma, M., Pampinella, F., Nemes, C., Benharouga, M., So, J., Du, K., Bache, K. G., Papsin, B., Zerangue, N., Stenmark, H., & Lukacs, G. L. (2004). Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *The Journal of cell biology*, 164(6), 923–933. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312018>
10. Estabrooks, S., & Brodsky, J. L. (2020). Regulation of CFTR Biogenesis by the Proteostatic Network and Pharmacological Modulators. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 452. <https://doi.org/10.3390/ijms21020452>
11. Ward, C. L., Omura, S., & Kopito, R. R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, 83(1), 121–127. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90240-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90240-6)
12. Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M., & Cyr, D. M. (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nature cell biology*, 3(1), 100–105. <https://doi.org/10.1038/35050509>

13. Ahner, A., Gong, X., Schmidt, B. Z., Peters, K. W., Rabeh, W. M., Thibodeau, P. H., Lukacs, G. L., & Frizzell, R. A. (2013). Small heat shock proteins target mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator for degradation via a small ubiquitin-like modifier-dependent pathway. *Molecular biology of the cell*, 24(2), 74–84. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-09-0678>
14. Gong, X., Ahner, A., Roldan, A., Lukacs, G. L., Thibodeau, P. H., & Frizzell, R. A. (2016). Non-native conformers of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator NBD1 are recognized by Hsp27 and conjugated to SUMO-2 for degradation. *The Journal of biological chemistry*, 291(4), 2004–2017. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.685628>
15. Ahner, A., Gong, X., & Frizzell, R. A. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation: cross-talk between the ubiquitylation and SUMOylation pathways. *The FEBS journal*, 280(18), 4430–4438. <https://doi.org/10.1111/febs.12415>
16. Ameen, N., Silvis, M., & Bradbury, N. A. (2007). Endocytic trafficking of CFTR in health and disease. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2006.09.002>
17. Farinha, C. M., Matos, P., & Amaral, M. D. (2013). Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *The FEBS journal*, 280(18), 4396–4406. <https://doi.org/10.1111/febs.12392>
18. Cheng, S. H., Rich, D. P., Marshall, J., Gregory, R. J., Welsh, M. J., & Smith, A. E. (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*, 66(5), 1027–1036. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90446-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90446-6)
19. Liu, F., Zhang, Z., Csanády, L., Gadsby, D. C., & Chen, J. (2017). molecular structure of the human cftr ion channel. *Cell*, 169(1), 85–95.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.024>
20. Koschinski, A., & Zaccolo, M. (2017). Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Scientific reports*, 7(1), 14090. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13021-y>
21. Aleksandrov, L. A., Fay, J. F., & Riordan, J. R. (2018). R-domain phosphorylation by protein kinase A stimulates dissociation of unhydrolyzed ATP from the first nucleotide-binding site of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry*, 57(34), 5073–5075. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00646>
22. Csanády, L., Vergani, P., & Gadsby, D. C. (2010). Strict coupling between CFTR's catalytic cycle and gating of its Cl<sup>-</sup> ion pore revealed by distributions of open channel burst durations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(3), 1241–1246. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911061107>
23. Welcome to CFTR2 | CFTR2 Available online: <https://cftr2.org/> (accessed on 9 February 2024).
24. Veit, G., Avramescu, R. G., Chiang, A. N., Houck, S. A., Cai, Z., Peters, K. W., Hong, J. S., Pollard, H. B., Guggino, W. B., Balch, W. E., Skach, W. R., Cutting, G. R., Frizzell, R. A., Sheppard, D. N., Cyr, D. M., Sorscher, E. J., Brodsky, J. L., & Lukacs, G. L. (2016). From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Molecular biology of the cell*, 27(3), 424–433. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0935>

25. Wilschanski M. (2012). Class 1 CF Mutations. *Frontiers in pharmacology*, 3, 117. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00117>
26. Yeh, J. T., & Hwang, T. C. (2020). Positional effects of premature termination codons on the biochemical and biophysical properties of CFTR. *The Journal of physiology*, 598(3), 517–541. <https://doi.org/10.1113/JP278418>
27. De Boeck, K., & Amaral, M. D. (2016). Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet. Respiratory medicine*, 4(8), 662–674. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00023-0)
28. Denning, G. M., Anderson, M. P., Amara, J. F., Marshall, J., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*, 358(6389), 761–764. <https://doi.org/10.1038/358761a0>
29. Rabeh, W. M., Bossard, F., Xu, H., Okiyoneda, T., Bagdany, M., Mulvihill, C. M., Du, K., di Bernardo, S., Liu, Y., Konermann, L., Roldan, A., & Lukacs, G. L. (2012). Correction of both NBD1 energetics and domain interface is required to restore  $\Delta F508$  CFTR folding and function. *Cell*, 148(1-2), 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.024>
30. Thibodeau, P. H., Richardson, J. M., 3rd, Wang, W., Millen, L., Watson, J., Mendoza, J. L., Du, K., Fischman, S., Senderowitz, H., Lukacs, G. L., Kirk, K., & Thomas, P. J. (2010). The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 285(46), 35825–35835. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131623>
31. Clancy, J. P., Cotton, C. U., Donaldson, S. H., Solomon, G. M., VanDevanter, D. R., Boyle, M. P., Gentsch, M., Nick, J. A., Illek, B., Wallenburg, J. C., Sorscher, E. J., Amaral, M. D., Beekman, J. M., Naren, A. P., Bridges, R. J., Thomas, P. J., Cutting, G., Rowe, S., Durmowicz, A. G., Mense, M., ... Tuggle, K. L. (2019). CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 18(1), 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.05.004>
32. Farrell, P. M., Rosenstein, B. J., White, T. B., Accurso, F. J., Castellani, C., Cutting, G. R., Durie, P. R., Legrys, V. A., Massie, J., Parad, R. B., Rock, M. J., Campbell, P. W., 3rd, & Cystic Fibrosis Foundation (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *The Journal of pediatrics*, 153(2), S4–S14. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.05.005>
33. Gartner, S., Mondéjar-López, P., Asensio de la Cruz, Ó., & Grupo de Trabajo de Fibrosis Quística de la Sociedad Española de Neumología Pediátrica (2019). Protocolo de seguimiento de pacientes con fibrosis quística diagnosticados por cribado neonatal [Follow-up protocol of patients with cystic fibrosis diagnosed by newborn screening]. *Anales de pediatría*, 90(4), 251.e1–251.e10. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2018.11.009>
34. Mishra, A., Greaves, R., & Massie, J. (2005). The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *The Clinical biochemist. Reviews*, 26(4), 135–153.
35. Boucher R. C. (2007). Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annual review of medicine*, 58, 157–170. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.071905.105316>

36. Hill, D. B., Long, R. F., Kissner, W. J., Atieh, E., Garbarine, I. C., Markovetz, M. R., Fontana, N. C., Christy, M., Habibpour, M., Tarran, R., Forest, M. G., Boucher, R. C., & Button, B. (2018). Pathological mucus and impaired mucus clearance in cystic fibrosis patients result from increased concentration, not altered pH. *The European respiratory journal*, 52(6), 1801297. <https://doi.org/10.1183/13993003.01297-2018>
37. Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*, 85(2), 229–236. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81099-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81099-5)
38. Zabner, J., Smith, J. J., Karp, P. H., Widdicombe, J. H., & Welsh, M. J. (1998). Loss of CFTR chloride channels alters salt absorption by cystic fibrosis airway epithelia in vitro. *Molecular cell*, 2(3), 397–403. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80284-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80284-1)
39. Turcios N. L. (2020). Cystic Fibrosis Lung Disease: An Overview. *Respiratory care*, 65(2), 233–251. <https://doi.org/10.4187/respcare.06697>
40. Olesen, H. V., Drevinek, P., Gulmans, V. A., Hatziaorou, E., Jung, A., Mei-Zahav, M., Stojnic, N., Thomas, M., Zolin, A., & ECFSPR Steering Group (2020). Cystic fibrosis related diabetes in Europe: Prevalence, risk factors and outcome; Olesen et al. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 19(2), 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.10.009>
41. Garland, A. L., Walton, W. G., Coakley, R. D., Tan, C. D., Gilmore, R. C., Hobbs, C. A., Tripathy, A., Clunes, L. A., Bencharit, S., Stutts, M. J., Betts, L., Redinbo, M. R., & Tarran, R. (2013). Molecular basis for pH-dependent mucosal dehydration in cystic fibrosis airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 15973–15978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311999110>
42. Sathe, M., & Houwen, R. (2017). Meconium ileus in Cystic Fibrosis. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 16 Suppl 2, S32–S39. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.007>
43. Carlyle, B. E., Borowitz, D. S., & Glick, P. L. (2012). A review of pathophysiology and management of fetuses and neonates with meconium ileus for the pediatric surgeon. *Journal of pediatric surgery*, 47(4), 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.02.019>
44. Turck, D., Braegger, C. P., Colombo, C., Declercq, D., Morton, A., Pancheva, R., Robberecht, E., Stern, M., Strandvik, B., Wolfe, S., Schneider, S. M., & Wilschanski, M. (2016). ESPEN-ESPGHAN-ECFS guidelines on nutrition care for infants, children, and adults with cystic fibrosis. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 35(3), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.03.004>
45. Dekkers, J. F., Wiegerinck, C. L., de Jonge, H. R., Bronsveld, I., Janssens, H. M., de Winter-de Groot, K. M., Brandsma, A. M., de Jong, N. W., Bijvelds, M. J., Scholte, B. J., Nieuwenhuis, E. E., van den Brink, S., Clevers, H., van der Ent, C. K., Middendorp, S., & Beekman, J. M. (2013). A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nature medicine*, 19(7), 939–945. <https://doi.org/10.1038/nm.3201>
46. O'Neal, W. K., & Knowles, M. R. (2018). Cystic fibrosis disease modifiers: complex genetics defines the phenotypic diversity in a monogenic disease. *Annual review of genomics and human genetics*, 19, 201–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021329>

47. Cutting G. R. (2010). Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1214, 57–69. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05879.x>
48. Kerem, E., Corey, M., Kerem, B. S., Rommens, J., Markiewicz, D., Levison, H., Tsui, L. C., & Durie, P. (1990). The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *The New England journal of medicine*, 323(22), 1517–1522. <https://doi.org/10.1056/NEJM199011293232203>
49. Vanscoy, L. L., Blackman, S. M., Collaco, J. M., Bowers, A., Lai, T., Naughton, K., Algire, M., McWilliams, R., Beck, S., Hoover-Fong, J., Hamosh, A., Cutler, D., & Cutting, G. R. (2007). Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(10), 1036–1043. <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1164OC>
50. Butnariu, L. I., Țarcă, E., Cojocaru, E., Rusu, C., Moisă, Ș. M., Leon Constantin, M. M., Gorduza, E. V., & Trandafir, L. M. (2021). Genetic modifying factors of Cystic Fibrosis phenotype: a challenge for modern medicine. *Journal of clinical medicine*, 10(24), 5821. <https://doi.org/10.3390/jcm10245821>
51. Knowles, M. R., & Drumm, M. (2012). The influence of genetics on cystic fibrosis phenotypes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), a009548. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009548>
52. Paranjapye, A., Ruffin, M., Harris, A., & Corvol, H. (2020). Genetic variation in CFTR and modifier loci may modulate cystic fibrosis disease severity. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 19 Suppl 1(Suppl 1), S10–S14. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.11.001>
53. Raju, S. V., Jackson, P. L., Courville, C. A., McNicholas, C. M., Sloane, P. A., Sabbatini, G., Tidwell, S., Tang, L. P., Liu, B., Fortenberry, J. A., Jones, C. W., Boydston, J. A., Clancy, J. P., Bowen, L. E., Accurso, F. J., Blalock, J. E., Dransfield, M. T., & Rowe, S. M. (2013). Cigarette smoke induces systemic defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 188(11), 1321–1330. <https://doi.org/10.1164/rccm.201304-0733OC>
54. Blayac, M., Coll, P., Urbach, V., Fanen, P., Epaud, R., & Lanone, S. (2022). the impact of air pollution on the course of Cystic Fibrosis: a review. *Frontiers in physiology*, 13, 908230. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.908230>
55. Oates, G. R., & Schechter, M. S. (2022). Socioeconomic determinants of respiratory health in patients with cystic fibrosis: implications for treatment strategies. *Expert review of respiratory medicine*, 16(6), 637–650. <https://doi.org/10.1080/17476348.2022.2090928>
56. Guo, J., Wang, J., Zhang, J., Fortunak, J., & Hill, A. (2022). Current prices versus minimum costs of production for CFTR modulators. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 21(5), 866–872. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2022.04.007>
57. Somaraju, U. R. R., & Solis-Moya, A. (2020). Pancreatic enzyme replacement therapy for people with cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, 8(8), CD008227. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008227.pub4>

58. Solomon, G. M., Marshall, S. G., Ramsey, B. W., & Rowe, S. M. (2015). Breakthrough therapies: Cystic fibrosis (CF) potentiators and correctors. *Pediatric pulmonology*, 50 Suppl 40(0 40), S3–S13. <https://doi.org/10.1002/ppul.23240>
59. Kaftrio | European Medicines Agency Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kaftrio> (accessed on 9 February 2024).
60. Trikafta | US Food and Drug Administration Available online: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2021/212273s004lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2021/212273s004lbl.pdf) (accessed on 9 February 2024).
61. Meoli, A., Fainardi, V., Deolmi, M., Chiopris, G., Marinelli, F., Caminiti, C., Esposito, S., & Pisi, G. (2021). State of the art on approved cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators and triple-combination therapy. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(9), 928. <https://doi.org/10.3390/ph14090928>
62. Deletang, K., & Taulan-Cadars, M. (2022). Splicing mutations in the CFTR gene as therapeutic targets. *Gene therapy*, 29(7-8), 399–406. <https://doi.org/10.1038/s41434-022-00347-0>
63. Carlos Dos Reis, D., Dastoor, P., Santos, A. K., Sumigray, K., & Ameen, N. A. (2023). CFTR high expresser cells in cystic fibrosis and intestinal diseases. *Heliyon*, 9(3), e14568. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14568>
64. Strong, T. V., Boehm, K., & Collins, F. S. (1994). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *The Journal of clinical investigation*, 93(1), 347–354. <https://doi.org/10.1172/JCI116966>
65. Shah, V. S., Chivukula, R. R., Lin, B., Waghray, A., & Rajagopal, J. (2022). Cystic Fibrosis and the cells of the airway epithelium: What Are Ionocytes and What Do They Do?. *Annual review of pathology*, 17, 23–46. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042420-094031>
66. Montoro, D. T., Haber, A. L., Biton, M., Vinarsky, V., Lin, B., Birket, S. E., Yuan, F., Chen, S., Leung, H. M., Villoria, J., Rogel, N., Burgin, G., Tsankov, A. M., Waghray, A., Slyper, M., Waldman, J., Nguyen, L., Dionne, D., Rozenblatt-Rosen, O., Tata, P. R., ... Rajagopal, J. (2018). A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes. *Nature*, 560(7718), 319–324. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0393-7>
67. Scudieri, P., Musante, I., Venturini, A., Guidone, D., Genovese, M., Cresta, F., Caci, E., Palleschi, A., Poeta, M., Santamaria, F., Ciciriello, F., Lucidi, V., & Galletta, L. J. V. (2020). Ionocytes and CFTR chloride channel expression in normal and cystic fibrosis nasal and bronchial epithelial cells. *Cells*, 9(9), 2090. <https://doi.org/10.3390/cells9092090>
68. Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., Klein, A. M., & Jaffe, A. B. (2018). A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*, 560(7718), 377–381. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0394-6>
69. Knowles, M. R., & Boucher, R. C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *The Journal of clinical investigation*, 109(5), 571–577. <https://doi.org/10.1172/JCI15217>

70. Bustamante-Marin, X. M., & Ostrowski, L. E. (2017). Cilia and mucociliary clearance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(4), a028241. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241>
71. Billet, A., Froux, L., Hanrahan, J. W., & Becq, F. (2017). Development of Automated Patch Clamp Technique to Investigate CFTR Chloride Channel Function. *Frontiers in pharmacology*, 8, 195. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00195>
72. Ahmadi, S., Bozoky, Z., Di Paola, M., Xia, S., Li, C., Wong, A. P., Wellhauser, L., Molinski, S. V., Ip, W., Ouyang, H., Avolio, J., Forman-Kay, J. D., Ratjen, F., Hirota, J. A., Rommens, J., Rossant, J., Gonska, T., Moraes, T. J., & Bear, C. E. (2017). Phenotypic profiling of CFTR modulators in patient-derived respiratory epithelia. *NPJ genomic medicine*, 2, 12. <https://doi.org/10.1038/s41525-017-0015-6>
73. Maitra, R., Sivashanmugam, P., & Warner, K. (2013). A rapid membrane potential assay to monitor CFTR function and inhibition. *Journal of biomolecular screening*, 18(9), 1132–1137. <https://doi.org/10.1177/1087057113488420>
74. Nguyen, J. P., Bianca, M., Huff, R. D., Tiessen, N., Inman, M. D., & Hirota, J. A. (2021). Modulation of cAMP metabolism for CFTR potentiation in human airway epithelial cells. *Scientific reports*, 11(1), 904. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79555-w>
75. Gunawardena, T. N. A., Bozóky, Z., Bartlett, C., Ouyang, H., Eckford, P. D. W., Moraes, T. J., Ratjen, F., Gonska, T., & Bear, C. E. (2023). Correlation of electrophysiological and fluorescence-based measurements of modulator efficacy in nasal epithelial cultures derived from people with Cystic Fibrosis. *Cells*, 12(8), 1174. <https://doi.org/10.3390/cells12081174>
76. Calucho, M., Gartner, S., Barranco, P., Fernández-Álvarez, P., Pérez, R. G., & Tizzano, E. F. (2021). Validation of nasospheroids to assay CFTR functionality and modulator responses in cystic fibrosis. *Scientific reports*, 11(1), 15511. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94798-x>
77. Berkers, G., van Mourik, P., Vonk, A. M., Kruisselbrink, E., Dekkers, J. F., de Winter-de Groot, K. M., Arets, H. G. M., Marck-van der Wilt, R. E. P., Dijkema, J. S., Vanderschuren, M. M., Houwen, R. H. J., Heijerman, H. G. M., van de Graaf, E. A., Elias, S. G., Majoor, C. J., Koppelman, G. H., Roukema, J., Bakker, M., Janssens, H. M., van der Meer, R., ... van der Ent, C. K. (2019). Rectal organoids enable personalized treatment of Cystic Fibrosis. *Cell reports*, 26(7), 1701–1708.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.068>
78. Dekkers, J. F., Berkers, G., Kruisselbrink, E., Vonk, A., de Jonge, H. R., Janssens, H. M., Bronsveld, I., van de Graaf, E. A., Nieuwenhuis, E. E., Houwen, R. H., Vleggaar, F. P., Escher, J. C., de Rijke, Y. B., Majoor, C. J., Heijerman, H. G., de Winter-de Groot, K. M., Clevers, H., van der Ent, C. K., & Beekman, J. M. (2016). Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Science translational medicine*, 8(344), 344ra84. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8278>
79. Ponchio, L., Duma, L., Oliviero, B., Gibelli, N., Pedrazzoli, P., & Robustelli della Cuna, G. (2000). Mitomycin C as an alternative to irradiation to inhibit the feeder layer growth in long-term culture assays. *Cytotherapy*, 2(4), 281–286. <https://doi.org/10.1080/146532400539215>
80. Harcourt, J. L., & Haynes, L. M. (2013). Establishing a liquid-covered culture of polarized human airway epithelial Calu-3 cells to study host cell response to respiratory pathogens in vitro. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (72), 50157. <https://doi.org/10.3791/50157>

81. Brewington, J. J., Filbrandt, E. T., LaRosa, F. J., 3rd, Moncivaiz, J. D., Ostmann, A. J., Strecker, L. M., & Clancy, J. P. (2018). Brushed nasal epithelial cells are a surrogate for bronchial epithelial CFTR studies. *JCI insight*, 3(13), e99385. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99385>
82. Strong, T. V., Boehm, K., & Collins, F. S. (1994). Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *The Journal of clinical investigation*, 93(1), 347–354. <https://doi.org/10.1172/JCI116966>
83. Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., & Clevers, H. (2007). Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449(7165), 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/nature06196>
84. Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G., Van Es, J. H., Van den Brink, S., Van Houdt, W. J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P. D., & Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762–1772. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.050>
85. Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single *Lgr5* stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459(7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
86. Servidoni, M. F., Sousa, M., Vinagre, A. M., Cardoso, S. R., Ribeiro, M. A., Meirelles, L. R., de Carvalho, R. B., Kunzelmann, K., Ribeiro, A. F., Ribeiro, J. D., & Amaral, M. D. (2013). Rectal forceps biopsy procedure in cystic fibrosis: technical aspects and patients perspective for clinical trials feasibility. *BMC gastroenterology*, 13, 91. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-13-91>
87. de Winter-de Groot, K. M., Janssens, H. M., van Uum, R. T., Dekkers, J. F., Berkers, G., Vonk, A., Kruisselbrink, E., Oppelaar, H., Vries, R., Clevers, H., Houwen, R. H. J., Escher, J. C., Elias, S. G., de Jonge, H. R., de Rijke, Y. B., Tiddens, H. A. W. M., van der Ent, C. K., & Beekman, J. M. (2018). Stratifying infants with cystic fibrosis for disease severity using intestinal organoid swelling as a biomarker of CFTR function. *The European respiratory journal*, 52(3), 1702529. <https://doi.org/10.1183/13993003.02529-2017>
88. Kaebisch, C., Schipper, D., Babczyk, P., & Tobiasch, E. (2014). The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Computational and structural biotechnology journal*, 13, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.11.003>
89. Cavaliere, F., Donno, C., & D'Ambrosi, N. (2015). Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 211. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00211>
90. Eberhardt, N., Bergero, G., Mazzocco Mariotta, Y. L., & Aoki, M. P. (2022). Purinergic modulation of the immune response to infections. *Purinergic signalling*, 18(1), 93–113. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09838-y>
91. Eltzschig, H. K., Sitkovsky, M. V., & Robson, S. C. (2012). Purinergic signaling during inflammation. *The New England journal of medicine*, 367(24), 2322–2333. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205750>

92. Khakh, B. S., & North, R. A. (2012). Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron*, 76(1), 51–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.024>
93. Zarrinmayeh, H., & Territo, P. R. (2020). Purinergic receptors of the central nervous system: biology, PET ligands, and their applications. *Molecular imaging*, 19, 1536012120927609. <https://doi.org/10.1177/1536012120927609>
94. Burnstock G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews*, 87(2), 659–797. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2006>
95. Yegutkin G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et biophysica acta*, 1783(5), 673–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>
96. Esther, C. R., Jr, Alexis, N. E., Clas, M. L., Lazarowski, E. R., Donaldson, S. H., Ribeiro, C. M., Moore, C. G., Davis, S. D., & Boucher, R. C. (2008). Extracellular purines are biomarkers of neutrophilic airway inflammation. *The European respiratory journal*, 31(5), 949–956. <https://doi.org/10.1183/09031936.00089807>
97. Esther, C. R., Jr, Boysen, G., Olsen, B. M., Collins, L. B., Ghio, A. J., Swenberg, J. W., & Boucher, R. C. (2009). Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 296(6), L987–L993. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90512.2008>
98. The Human Protein Atlas Available online: <https://www.proteinatlas.org/> (accessed on 9 February 2024).
99. Effendi, W. I., Nagano, T., Kobayashi, K., & Nishimura, Y. (2020). Focusing on adenosine receptors as a potential targeted therapy in human diseases. *Cells*, 9(3), 785. <https://doi.org/10.3390/cells9030785>
100. Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Müller, C. E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews*, 63(1), 1–34. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>
101. Li, Y., Wang, W., Parker, W., & Clancy, J. P. (2006). Adenosine regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through prostenoids in airway epithelia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 34(5), 600–608. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0421OC>
102. Martin, E. R., Barbieri, A., Ford, R. C., & Robinson, R. C. (2020). In vivo crystals reveal critical features of the interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and the PDZ2 domain of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange cofactor NHERF1. *The Journal of biological chemistry*, 295(14), 4464–4476. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012015>
103. Raghuram, V., Mak, D. O., & Foskett, J. K. (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 1300–1305. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.1300>

104. Moyer, B. D., Duhaime, M., Shaw, C., Denton, J., Reynolds, D., Karlson, K. H., Pfeiffer, J., Wang, S., Mickle, J. E., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Li, M., & Stanton, B. A. (2000). The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*, 275(35), 27069–27074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004951200>
105. Swiatecka-Urban, A., Duhaime, M., Coutermarsh, B., Karlson, K. H., Collawn, J., Milewski, M., Cutting, G. R., Guggino, W. B., Langford, G., & Stanton, B. A. (2002). PDZ domain interaction controls the endocytic recycling of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *The Journal of biological chemistry*, 277(42), 40099–40105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206964200>
106. Sun, F., Hug, M. J., Bradbury, N. A., & Frizzell, R. A. (2000). Protein kinase A associates with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via an interaction with ezrin. *The Journal of biological chemistry*, 275(19), 14360–14366. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14360>
107. Watson, M. J., Worthington, E. N., Clunes, L. A., Rasmussen, J. E., Jones, L., & Tarran, R. (2011). Defective adenosine-stimulated cAMP production in cystic fibrosis airway epithelia: a novel role for CFTR in cell signaling. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(9), 2996–3003. <https://doi.org/10.1096/fj.11-186080>
108. Huang, P., Lazarowski, E. R., Tarran, R., Milgram, S. L., Boucher, R. C., & Stutts, M. J. (2001). Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 14120–14125. <https://doi.org/10.1073/pnas.241318498>
109. Freedman, S. D., Blanco, P. G., Zaman, M. M., Shea, J. C., Ollero, M., Hopper, I. K., Weed, D. A., Gelrud, A., Regan, M. M., Laposata, M., Alvarez, J. G., & O'Sullivan, B. P. (2004). Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *The New England journal of medicine*, 350(6), 560–569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021218>
110. Umunakwe, O. C., & Seegmiller, A. C. (2014). Abnormal n-6 fatty acid metabolism in cystic fibrosis is caused by activation of AMP-activated protein kinase. *Journal of lipid research*, 55(7), 1489–1497. <https://doi.org/10.1194/jlr.M050369>
111. Zhou, J. J., & Linsdell, P. (2007). Molecular mechanism of arachidonic acid inhibition of the CFTR chloride channel. *European journal of pharmacology*, 563(1-3), 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.048>
112. Cobb, B. R., Ruiz, F., King, C. M., Fortenberry, J., Greer, H., Kovacs, T., Sorscher, E. J., & Clancy, J. P. (2002). A(2) adenosine receptors regulate CFTR through PKA and PLA(2). *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 282(1), L12–L25. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2002.282.1.L12>
113. Li, Y., Wang, W., Parker, W., & Clancy, J. P. (2006). Adenosine regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through prostenoids in airway epithelia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 34(5), 600–608. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0421OC>

114. Nichols, D. P., & Chmiel, J. F. (2015). Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 50 Suppl 40, S39–S56. <https://doi.org/10.1002/ppul.23242>
115. Le, T. T., Berg, N. K., Harting, M. T., Li, X., Eltzschig, H. K., & Yuan, X. (2019). Purinergic Signaling in Pulmonary Inflammation. *Frontiers in immunology*, 10, 1633. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01633>
116. Wang, W., Chen, N. Y., Ren, D., Davies, J., Philip, K., Eltzschig, H. K., Blackburn, M. R., Akkanti, B., Karmouty-Quintana, H., & Weng, T. (2021). Enhancing extracellular adenosine levels restores barrier function in acute lung injury through expression of focal adhesion proteins. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 636678. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.636678>
117. Wang, M., Guo, X., Zhao, H., Lv, J., Wang, H., & An, Y. (2020). Adenosine A2B receptor activation stimulates alveolar fluid clearance through alveolar epithelial sodium channel via cAMP pathway in endotoxin-induced lung injury. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 318(4), L787–L800. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00195.2019>
118. Xu, X., Zhu, Q., Niu, F., Zhang, R., Wang, Y., Wang, W., Sun, D., Wang, X., & Wang, A. (2018). A2BAR activation attenuates acute lung injury by inhibiting alveolar epithelial cell apoptosis both in vivo and in vitro. *American journal of physiology. Cell physiology*, 315(4), C558–C570. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00294.2017>
119. Hoegl, S., Brodsky, K. S., Blackburn, M. R., Karmouty-Quintana, H., Zwissler, B., & Eltzschig, H. K. (2015). Alveolar epithelial A2B adenosine receptors in pulmonary protection during acute lung injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(4), 1815–1824. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401957>
120. Li, H. X., Liang, X. Y., Wu, J. H., Yuan, Y. P., Gao, Y., & Cai, S. H. (2021). Simvastatin attenuates acute lung injury by activation of A2B adenosine receptor. *Toxicology and applied pharmacology*, 422, 115460. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115460>
121. Vonk, A. M., van Mourik, P., Ramalho, A. S., Silva, I. A. L., Statia, M., Kruisselbrink, E., Suen, S. W. F., Dekkers, J. F., Vleggaar, F. P., Houwen, R. H. J., Mullenders, J., Boj, S. F., Vries, R., Amaral, M. D., de Boeck, K., van der Ent, C. K., & Beekman, J. M. (2020). Protocol for application, standardization and validation of the Forskolin-Induced Swelling Assay in Cystic Fibrosis human colon organoids. *STAR protocols*, 1(1), 100019. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100019>
122. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
123. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71–85.
124. CFTR Modulator Therapies | Cystic Fibrosis Foundation Available online: <https://www.cff.org/managing-cf/cftr-modulator-therapies> (accessed on 27 February 2024).

125. Schechter M. S. (2004). Non-genetic influences on CF lung disease: the role of sociodemographic characteristics, environmental exposures and healthcare interventions. *Pediatric pulmonology. Supplement*, 26, 82–85. <https://doi.org/10.1002/ppul.70061>
126. Lazarowski, E. R., & Boucher, R. C. (2021). Purinergic receptors in airway hydration. *Biochemical pharmacology*, 187, 114387. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114387>
127. de Poel, E., Lefferts, J. W., & Beekman, J. M. (2020). Intestinal organoids for Cystic Fibrosis research. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 19 Suppl 1, S60–S64. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.11.002>
128. Gruenert, D. C., Willems, M., Cassiman, J. J., & Frizzell, R. A. (2004). Established cell lines used in cystic fibrosis research. *Journal of cystic fibrosis: official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 3 Suppl 2, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.040>
129. Sood, R., Bear, C., Auerbach, W., Reyes, E., Jensen, T., Kartner, N., Riordan, J. R., & Buchwald, M. (1992). Regulation of CFTR expression and function during differentiation of intestinal epithelial cells. *The EMBO journal*, 11(7), 2487–2494. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05313.x>
130. Tien, X. Y., Brasitus, T. A., Kaetzel, M. A., Dedman, J. R., & Nelson, D. J. (1994). Activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by cGMP in the human colonic cancer cell line, Caco-2. *The Journal of biological chemistry*, 269(1), 51–54.
131. Yasuda, Y., Saito, M., Yamamura, T., Yaguchi, T., & Nishizaki, T. (2009). Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors. *Journal of gastroenterology*, 44(1), 56–65. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2273-7>
132. Krzystek-Korpacka, M., Diakowska, D., Bania, J., & Gamian, A. (2014). Expression stability of common housekeeping genes is differently affected by bowel inflammation and cancer: implications for finding suitable normalizers for inflammatory bowel disease studies. *Inflammatory bowel diseases*, 20(7), 1147–1156. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000067>
133. Frick, J. S., MacManus, C. F., Scully, M., Glover, L. E., Eltzschig, H. K., & Colgan, S. P. (2009). Contribution of adenosine A2B receptors to inflammatory parameters of experimental colitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(8), 4957–4964. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801324>
134. Aherne, C. M., Saeedi, B., Collins, C. B., Masterson, J. C., McNamee, E. N., Perrenoud, L., Rapp, C. R., Curtis, V. F., Bayless, A., Fletcher, A., Glover, L. E., Evans, C. M., Jedlicka, P., Furuta, G. T., de Zoeten, E. F., Colgan, S. P., & Eltzschig, H. K. (2015). Epithelial-specific A2B adenosine receptor signaling protects the colonic epithelial barrier during acute colitis. *Mucosal immunology*, 8(6), 1324–1338. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.22>

135. Philip, K., Mills, T. W., Davies, J., Chen, N. Y., Karmouty-Quintana, H., Luo, F., Molina, J. G., Amione-Guerra, J., Sinha, N., Guha, A., Eltzschig, H. K., & Blackburn, M. R. (2017). HIF1A up-regulates the ADORA2B receptor on alternatively activated macrophages and contributes to pulmonary fibrosis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(11), 4745–4758. <https://doi.org/10.1096/fj.201700219R>
136. Collum, S. D., Molina, J. G., Hanmandlu, A., Bi, W., Pedroza, M., Mertens, T. C. J., Wareing, N., Wei, W., Wilson, C., Sun, W., Rajadas, J., Bollyky, P. L., Philip, K. M., Ren, D., Thandavarayan, R. A., Bruckner, B. A., Xia, Y., Blackburn, M. R., & Karmouty-Quintana, H. (2019). Adenosine and hyaluronan promote lung fibrosis and pulmonary hypertension in combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Disease models & mechanisms*, 12(5), dmm038711. <https://doi.org/10.1242/dmm.038711>
137. Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Klotz, K. N., & Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*, 53(4), 527–552.
138. Rollins, B. M., Burn, M., Coakley, R. D., Chambers, L. A., Hirsh, A. J., Clunes, M. T., Lethem, M. I., Donaldson, S. H., & Tarran, R. (2008). A2B adenosine receptors regulate the mucus clearance component of the lung's innate defense system. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 39(2), 190–197. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0450OC>
139. Watson, M. J., Lee, S. L., Marklew, A. J., Gilmore, R. C., Gentzsch, M., Sassano, M. F., Gray, M. A., & Tarran, R. (2016). The Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Uses its C-Terminus to Regulate the A2B Adenosine Receptor. *Scientific reports*, 6, 27390. <https://doi.org/10.1038/srep27390>
140. Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeiffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., & Galiotta, L. J. (2008). TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5901), 590–594. <https://doi.org/10.1126/science.1163518>
141. Jung, J., Nam, J. H., Park, H. W., Oh, U., Yoon, J. H., & Lee, M. G. (2013). Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> permeability by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), 360–365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211594110>
142. Yu Q. (2021). Slc26a3 (DRA) in the Gut: Expression, function, regulation, role in infectious Diarrhea and Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory bowel diseases*, 27(4), 575–584. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa256>
143. Yang, H., Jiang, W., Furth, E. E., Wen, X., Katz, J. P., Sellon, R. K., Silberg, D. G., Antalis, T. M., Schweinfest, C. W., & Wu, G. D. (1998). Intestinal inflammation reduces expression of DRA, a transporter responsible for congenital chloride diarrhea. *The American journal of physiology*, 275(6), G1445–G1453. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.6.G1445>
144. Klotz, K. N., Hessling, J., Hegler, J., Owman, C., Kull, B., Fredholm, B. B., & Lohse, M. J. (1998). Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 357(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/pl00005131>

145. De Filippo, E., Hinz, S., Pellizzari, V., Deganutti, G., El-Tayeb, A., Navarro, G., Franco, R., Moro, S., Schiedel, A. C., & Müller, C. E. (2020). A2A and A2B adenosine receptors: The extracellular loop 2 determines high (A2A) or low affinity (A2B) for adenosine. *Biochemical pharmacology*, 172, 113718. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113718>
146. Eidelman, O., Guay-Broder, C., van Galen, P. J., Jacobson, K. A., Fox, C., Turner, R. J., Cabantchik, Z. I., & Pollard, H. B. (1992). A1 adenosine-receptor antagonists activate chloride efflux from cystic fibrosis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), 5562–5566. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.12.5562>
147. Kaftrio | European Medicines Agency Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kaftrio-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/kaftrio-epar-medicine-overview_en.pdf) (accessed on 27 February 2024).
148. Karmouty-Quintana, H., Zhong, H., Acero, L., Weng, T., Melicoff, E., West, J. D., Hemnes, A., Grenz, A., Eltzschig, H. K., Blackwell, T. S., Xia, Y., Johnston, R. A., Zeng, D., Belardinelli, L., & Blackburn, M. R. (2012). The A2B adenosine receptor modulates pulmonary hypertension associated with interstitial lung disease. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(6), 2546–2557. <https://doi.org/10.1096/fj.11-200907>
149. Burnstock, G., & Ralevic, V. (2013). Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacological reviews*, 66(1), 102–192. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008029>
150. Vijftigschild, L. A., Berkers, G., Dekkers, J. F., Zomer-van Ommen, D. D., Matthes, E., Kruisselbrink, E., Vonk, A., Hensen, C. E., Heida-Michel, S., Geerdink, M., Janssens, H. M., van de Graaf, E. A., Bronsveld, I., de Winter-de Groot, K. M., Majoor, C. J., Heijerman, H. G., de Jonge, H. R., Hanrahan, J. W., van der Ent, C. K., & Beekman, J. M. (2016).  $\beta$ 2-Adrenergic receptor agonists activate CFTR in intestinal organoids and subjects with cystic fibrosis. *The European respiratory journal*, 48(3), 768–779. <https://doi.org/10.1183/13993003.01661-2015>
151. Rodenburg, L. W., Delpiano, L., Railean, V., Centeio, R., Pinto, M. C., Smits, S. M. A., van der Windt, I. S., van Hugten, C. F. J., van Beuningen, S. F. B., Rodenburg, R. N. P., van der Ent, C. K., Amaral, M. D., Kunzelmann, K., Gray, M. A., Beekman, J. M., & Amatngalim, G. D. (2022). Drug repurposing for Cystic Fibrosis: identification of drugs that induce CFTR-independent fluid secretion in nasal organoids. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12657. <https://doi.org/10.3390/ijms232012657>
152. Sitaraman, S. V., Merlin, D., Wang, L., Wong, M., Gewirtz, A. T., Si-Tahar, M., & Madara, J. L. (2001). Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *The Journal of clinical investigation*, 107(7), 861–869. <https://doi.org/10.1172/JCI11783>
153. Eckle, T., Grenz, A., Laucher, S., & Eltzschig, H. K. (2008). A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(10), 3301–3315. <https://doi.org/10.1172/JCI34203>
154. Chunn, J. L., Young, H. W., Banerjee, S. K., Colasurdo, G. N., & Blackburn, M. R. (2001). Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(8), 4676–4685. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4676>

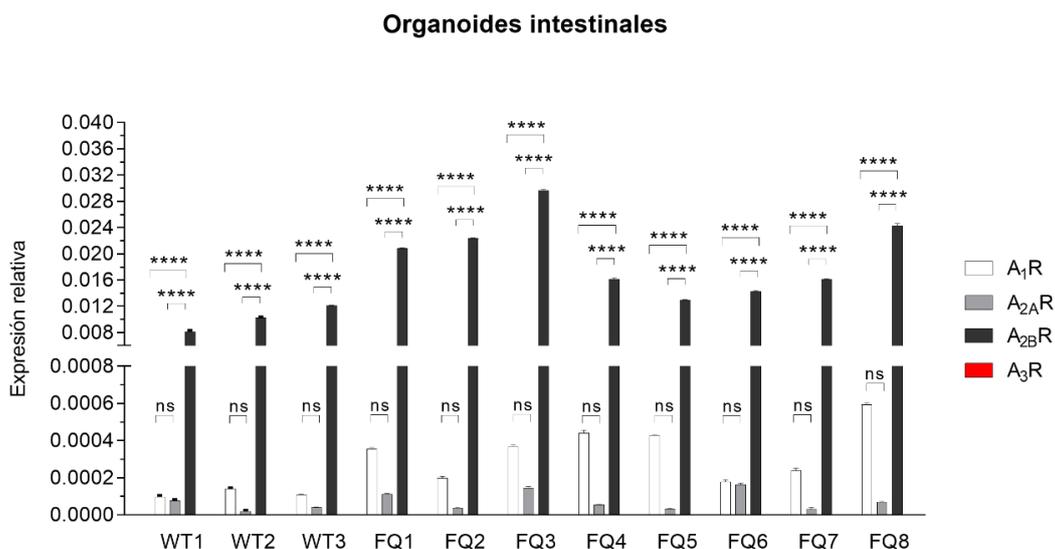
155. Blackburn, M. R., Volmer, J. B., Thrasher, J. L., Zhong, H., Crosby, J. R., Lee, J. J., & Kellems, R. E. (2000). Metabolic consequences of adenosine deaminase deficiency in mice are associated with defects in alveogenesis, pulmonary inflammation, and airway obstruction. *The Journal of experimental medicine*, 192(2), 159–170. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.159>



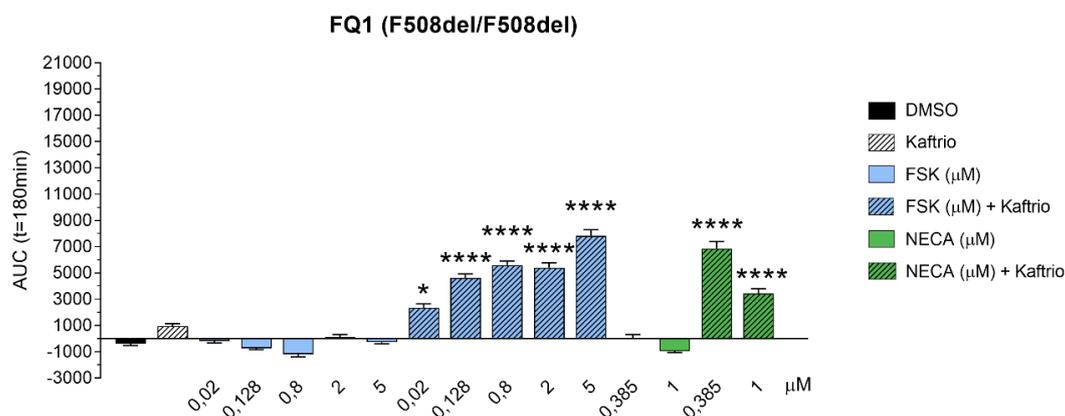
**IX – Anexos**



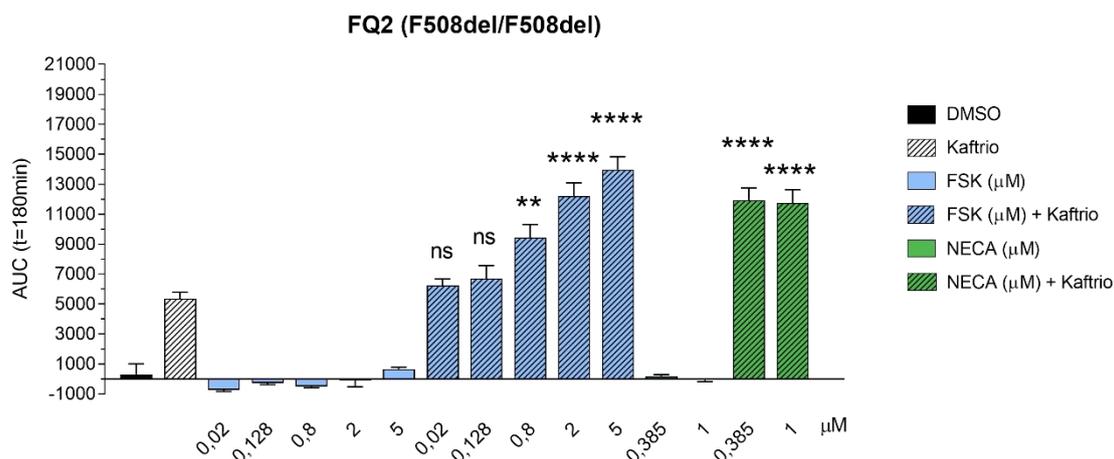
## 9.1 FIGURAS



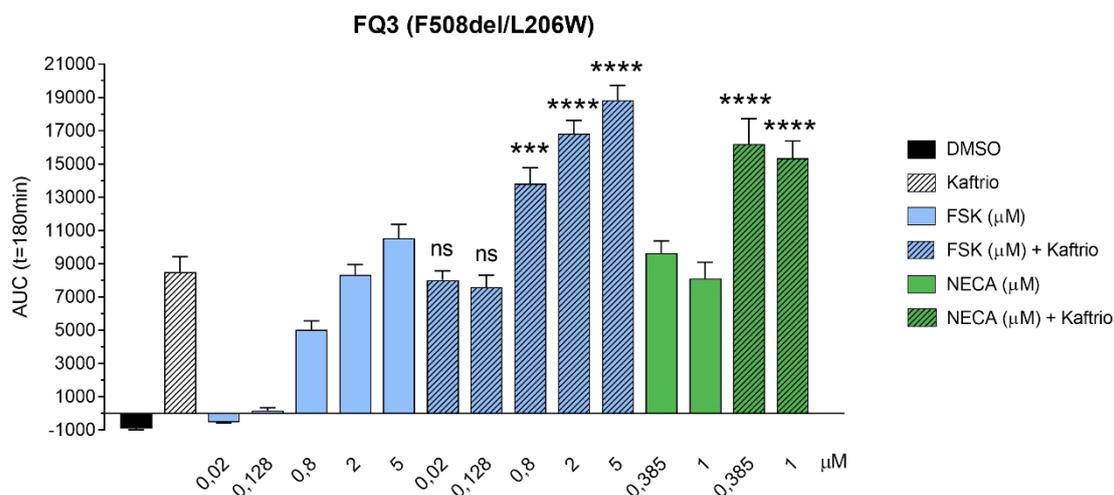
**Figura A1. Patrón de expresión génica de los RAs de los organoides intestinales WT y FQ.** Se estudiaron tres WT y ocho individuos FQ con distintos genotipos: F508del/F508del (FQ1 y FQ2), F508del/L206W (FQ3), F508del/G542X (FQ4), F508del/K6684fs (FQ5), G542X/K668X (FQ6), G542X/G542X (FQ7) y S589N/1812-1G>A (FQ8). Los niveles de expresión de A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R se determinaron mediante la normalización con el gen de referencia *PPIA*. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; y "ns" para no significativo.



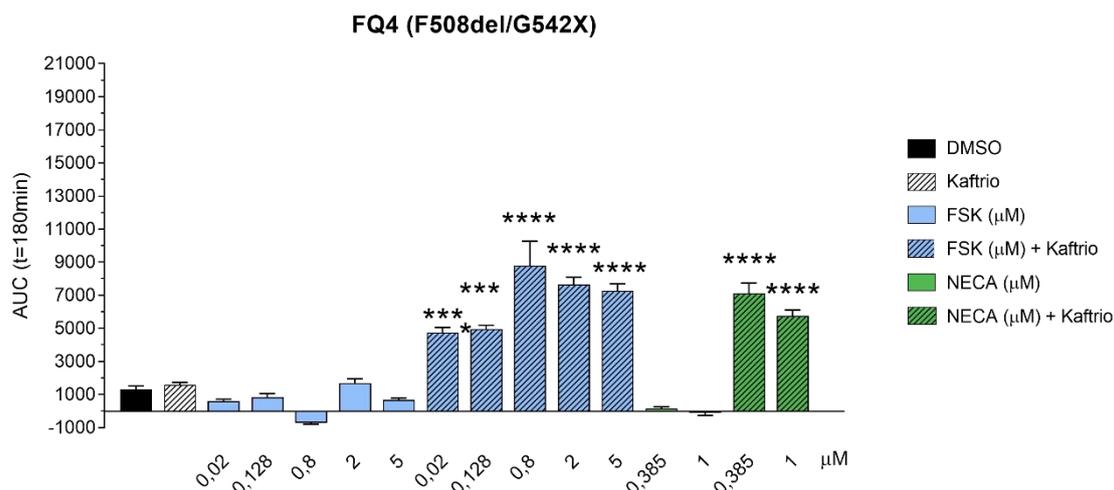
**Figura A2. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso FSK y NECA en organoides intestinales derivados de FQ1 (F508del/F508del).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,02/0,128/0,8/2/5 μM) o con NECA (a 0,385 y 1 μM). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de las condiciones testadas en relación con la obtenida con Kaftrio solo. Se utilizó DMSO (a <0,001%) y la incubación de Kaftrio como controles. Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Las barras en los gráficos representan el SEM. Los niveles de significancia se indican como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (n=1).



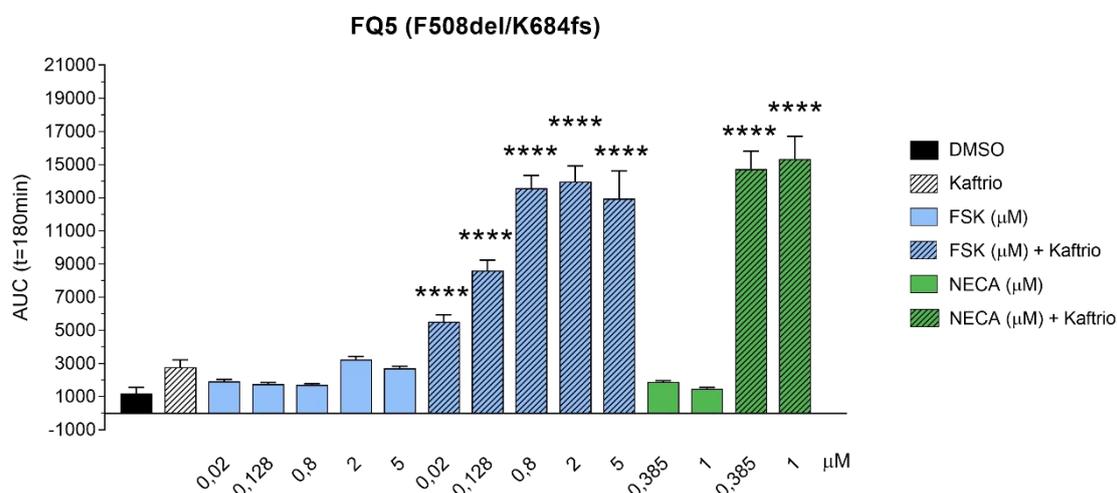
**Figura A3. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso FSK y NECA en organoides intestinales derivados de FQ2 (F508del/F508del).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,02/0,128/0,8/2/5  $\mu\text{M}$ ) o con NECA (a 0,385 y 1  $\mu\text{M}$ ). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de las condiciones testadas en relación con la obtenida con Kaftrio solo. Se utilizó DMSO (a <0,001%) y la incubación de Kaftrio como controles. Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Las barras en los gráficos representan el SEM. Los niveles de significancia se indican como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (n=1).



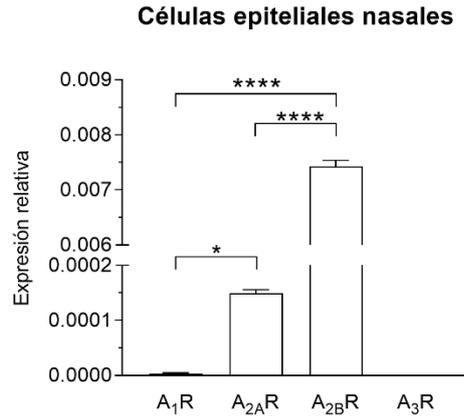
**Figura A4. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso FSK y NECA en organoides intestinales derivados de FQ3 (F508del/L206W).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,02/0,128/0,8/2/5  $\mu\text{M}$ ) o con NECA (a 0,385 y 1  $\mu\text{M}$ ). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de las condiciones testadas en relación con la obtenida con Kaftrio solo. Se utilizó DMSO (a <0,001%) y la incubación de Kaftrio como controles. Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Las barras en los gráficos representan el SEM. Los niveles de significancia se indican como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (n=1).



**Figura A5. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso FSK y NECA en organoides intestinales derivados de FQ4 (F508del/G542X).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,02/0,128/0,8/2/5  $\mu\text{M}$ ) o con NECA (a 0,385 y 1  $\mu\text{M}$ ). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de las condiciones testadas en relación con la obtenida con Kaftrio solo. Se utilizó DMSO (a <0,001%) y la incubación de Kaftrio como controles. Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Las barras en los gráficos representan el SEM. Los niveles de significancia se indican como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (n=1).



**Figura A6. Estudio de la funcionalidad del CFTR tras el uso FSK y NECA en organoides intestinales derivados de FQ5 (F508del/K684fs).** Mediante el ensayo funcional FIS, se determinó la respuesta basal de la CFTR ante la estimulación con FSK (a 0,02/0,128/0,8/2/5  $\mu\text{M}$ ) o con NECA (a 0,385 y 1  $\mu\text{M}$ ). Además, se combinaron las diferentes concentraciones de FSK o NECA con Kaftrio. Los resultados de la significancia muestran la comparación de la respuesta de las condiciones testadas en relación con la obtenida con Kaftrio solo. Se utilizó DMSO (a <0,001%) y la incubación de Kaftrio como controles. Por cada condición se estudiaron entre 40-60 organoides. Las barras en los gráficos representan el SEM. Los niveles de significancia se indican como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (n=1).



**Figura A7. Expresión génica de los distintos subtipos de RAs en células epiteliales nasales.** Tras la obtención de células epiteliales nasales de un individuo WT mediante raspado nasal, se utilizó el protocolo detallado en la sección 9.2 de Anexos para poder expandir y diferenciar dichas células. Posteriormente, con las células diferenciadas, se determinaron los niveles de expresión de A<sub>1</sub>R, A<sub>2A</sub>R, A<sub>2B</sub>R y A<sub>3</sub>R mediante la normalización con la expresión del gen de referencia *PPIA*. La barra de cada columna representa el SEM. El nivel de significancia se indica como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; y "ns" para no significativo. (n=3).

## 9.2 PROTOCOLO DE EXPANSIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES NASALES HUMANAS

El protocolo seguido para la obtención, expansión y diferenciación de las células epiteliales nasales humanas se basa en procedimientos publicados anteriormente que han sido adaptados y ligeramente modificados [79–81].

### 9.2.1.1 Reactivos

Reactivos	Casa comercial	Referencia
Ácido retinoico	Sigma	R2625
Adenina	Sigma	A2786
Anfotericina B	Sigma	CDS020667
Ceftazidima	Sigma	V2002
Colágeno IV	Sigma	C8374
DMEM – cultivo células de mamífero	Thermofisher	42430025
DMEM – cultivo de fibroblastos	Thermofisher	11965-092
DMEM/F12	Sigma	11330-032
D-PBS (1X) w/o Ca <sup>+</sup> Mg <sup>+</sup>	ThermoFisher	14190144
Factor de crecimiento epidérmico ( <i>EGF, epidermal growth factor</i> )	StemCell	7800.1
Epinefrina	Sigma	E4250
Etanolamina	Sigma	E9508
Extracto de cerebro bovino	Cultek	H3CC-4092
F12	Thermofisher	21765029
Fosfoetanolamina	Sigma	74576
Gelatina	Sigma	G9391
Hidrocortisona	Sigma	H0888
Insulina	Sigma	91077C
Mitomicina C	Sigma	10107409001
Penicilina-estreptomina (Pen/Strep)	Thermofisher	15140-122
RPMI 1640	Thermofisher	11875101
Suero bovino fetal ( <i>FBS, feta bovine serum</i> )	Thermofisher	16140-071
Suero fetal clon II	FisherScientific	12339772
Tobramicina	Thermofisher	15290018
Toxina del cólera	Sigma	C8052
Transferrina	Sigma	T2036
Tripsina-EDTA (0,05%)	Thermofisher	25300054
Tripsina TrypLE Express	Thermofisher	12604021
Triyodotironina	Santa Cruz	SC231968
Ultrosor G	Sartorius	15950-017
Vancomicina	FisherScientific	15512610
Y-27632, inhibidor ROCK	Stem Cell	72304

### 9.2.1.2 Medios

- Medio de cultivo de fibroblastos: DMEM + 10% FBS + 1% Pen/Strep.
- Medio completo: DMEM (para cultivo células de mamífero) + 25 % F12 + 5% FBS + 0,4 µg/ml hidrocortisona + 5 µg/ml insulina + 8,4 ng/ml toxina del cólera + 10 ng/ml EGF + 24 µg/ml adenina + 1% Pen/Strep + 10 µM Y-27632.
- Medio completo con antibióticos: medio completo + 2,5 µg/ml anfotericina B + 100 µg/ml ceftazidima + 100 µg/ml vancomicina + 100 µg/ml tobramicina.
- Medio de diferenciación: DMEM/F12 + 2% ultrosor G + 2% suero fetal clon II + 0,25 % extracto de cerebro bovino + 250 nM etanolamina + 250 nM fosfoetanolamina + 20 nM hidrocortisona + 5 µg/ml insulina + 500 nM triyodotironina + 2,5 µg/ml transferrina + 1,5 µg/ml epinefrina + 10 nM ácido retinoico.

### 9.2.1.3 Protocolos

#### *9.2.1.3.1 Obtención y expansión de las células epiteliales nasales humanas*

Para poder expandir las células epiteliales nasales fue necesario realizar un co-cultivo con fibroblastos tratados con mitomicina C (Figura A8). Es por ello que primero fue necesario realizar el cultivo de fibroblastos, utilizando un flascón de T75 con su respectivo medio de cultivo. El día anterior a la obtención de las células epiteliales nasales, se retiró el medio de cultivo de los fibroblastos y se realizó un par de lavados con D-PBS. Seguidamente, se añadieron 10 ml de medio de cultivo de fibroblastos con 4 µg/ml de mitomicina C y se incubó el flascón durante 3h a 37°C. Posteriormente, se realizó un par de lavados con D-PBS, se recogieron los fibroblastos en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó a 1.500 rpm durante 4 min a 22°C. Tras realizar el conteo del pellet, los fibroblastos se sembraron en un flascón T25 a una concentración de entre 500.000-750.000 células/ml y se añadió suficiente medio de fibroblastos hasta alcanzar los 5ml. Dicho flascón previamente había sido tratado para revestirlo de una capa de gelatina al 2% para fomentar la adhesión de los fibroblastos.

Para la obtención de las células epiteliales nasales se realizaron dos raspados en cada orificio nasal mediante curetas (ASL, Arlington, Probe). Las curetas de cada orificio se colocaron en un mismo tubo Falcon de 15ml con RPMI 1640 en hielo. Seguidamente, para desprender las células epiteliales nasales de las curetas, estas se agitaron dentro del tubo y se centrifugó a 400 rpm durante 4 min a 4°C.

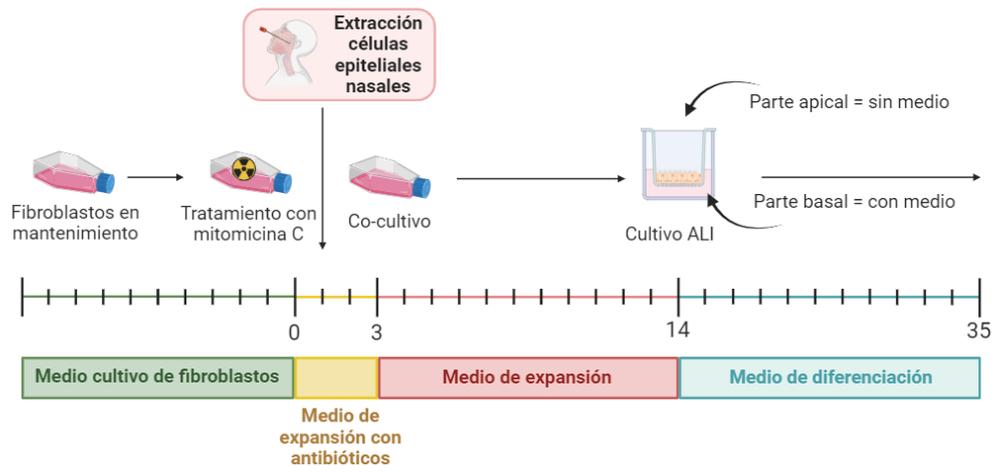
El pellet se resuspendió en 1 ml de medio completo con antibióticos y posteriormente se sembró en el flascón T25 previamente sembrado con fibroblastos tratados. Tras 48h, se cambió el medio por medio completo. De forma rutinaria, se cambió el medio cada 2-3 días utilizando medio completo.

#### *9.2.1.3.2 Diferenciación de las células epiteliales nasales expandidas*

Para poder diferenciar las células epiteliales nasales previamente expandidas, fue necesario cultivarlas mediante el sistema de cultivo llamado ALI (del inglés, *Air Liquid Interface*) (Figura A8). Este sistema consiste en la siembra de las células epiteliales nasales en un inserto, el cual permite que estén en contacto con el medio de diferenciación por la parte basal, mientras que por la parte apical queden totalmente expuestas al aire. De esta manera, se mimetiza la disposición que presentan las células epiteliales en el tejido respiratorio nasal, lo que ayuda a su correcta diferenciación.

Aproximadamente, a las 2 semanas de iniciar el co-cultivo de las células epiteliales nasales con los fibroblastos tratados se comprobó que se alcanzó una confluencia del 80% de las células expandidas. En tal caso, se procedió a la realización de la tripsinización secuencial. Para ello, primero se utilizó la tripsina-EDTA durante 2 min a 37°C (para despegar los fibroblastos) y después con TripLE durante 5-10 min a 37°C (para obtener las células epiteliales nasales expandidas). Las células epiteliales se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml con medio de expansión + 20% FBS y se centrifugaron a 360 rpm, durante 4 min a 22°C. Se añadió 1 ml de medio de diferenciación y se procedió a su contaje. Posteriormente, se sembraron 200 µl en la parte superior de los insertos a una concentración de  $0,7-1,75 \times 10^6$  células/ml. En la parte basal se colocaron 600 µl de medio de diferenciación. Los insertos fueron tratados previamente con colágeno IV para favorecer la adherencia de las células sembradas. Para ello, sobre cada uno se colocaron 80 µl de colágeno al 0,5 mg/ml y se dejaron 2h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una incubación de 30 min a 37°C. Por último, transcurrido este tiempo, se quitó el sobredanante del inserto y se esterilizó durante 15 min con UV dentro de la cabina de cultivos.

Pasados 3 días desde la siembra de las células en el inserto, se retiró el medio de la parte apical (dejándolo expuesto al aire) y se cambió el medio en la parte basal por nuevo medio de diferenciación. De forma rutinaria, se cambió el medio de la parte basal cada 2-3 días con medio de diferenciación.



**Figura A8. Resumen de los procedimientos y medios utilizados para la expansión y diferenciación de las células epiteliales nasales en función del tiempo.**

