



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina. Facultad de Medicina

**AFECTACIÓN NEUROMUSCULAR Y RELACIÓN  
CON EL GENOTIPO Y LA CAPACIDAD DE  
ESFUERZO EN PACIENTES ADULTOS CON  
FIBROSIS QUÍSTICA**

**Tesis Doctoral**

Presentada por:

Mario Culebras Amigo

Director:

Javier de Gracia Roldán

Tutor:

Ferran Morell Brotad

Barcelona 2017





**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultad de Medicina

El Dr. Javier de Gracia Roldán, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y Jefe de Sección de Neumología del Hospital Universitari Vall d'Hebron,

CERTIFICA:

Que la Tesis doctoral titulada: **“Afectación neuromuscular y relación con el genotipo y la capacidad de esfuerzo en pacientes adultos con fibrosis quística”**, presentada por Mario Culebras Amigo para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo mi dirección y tutela y considero que reúne los requisitos formales y científicos para poder proceder a su lectura y defensa pública.

Dr. Javier de Gracia Roldán

Barcelona 2017



Dedico esta tesis doctoral a mis padres, mi hermano, mi mujer y mi/s hijo/s.

A mis padres, **Celedonio y Manoli**, por su paciencia y comprensión y por darme TODO lo que un hijo necesita, además de una excelente educación personal, una infancia feliz y una formación universitaria superior, gracias a su gran esfuerzo y dedicación y dándome libertad absoluta para conseguir mi sueño desde el primer momento que pronuncié “de mayor quiero ser médico”.

A mi hermano y mejor amigo, **Paco**, por ser siempre mi ejemplo y modelo a seguir, dejándome abiertas todas las puertas que tuvo que abrir para crecer y madurar como persona, dándome buenos consejos y estando siempre a mi lado cuando lo he necesitado.

A mi mujer, **Astrid**, el amor de mi vida, por permitirme pasar el resto de mis días a su lado, haciéndome sentir especial y único, por su comprensión y apoyo incondicional, sobre todo en los malos momentos, por creer en mí incluso cuando yo mismo no lo hacía, por conseguir arrancar de mí cualidades que no sabía que tenía, por su paciencia y por ser la mejor madre que uno quiere para sus hijos.

A mi hijo, **Daniel**, mi mayor tesoro, por darle sentido a la vida, por ser tan especial, por darme el mayor amor que una persona puede llegar a sentir, por hacerme madurar como persona, por hacerme sentir su héroe, por su comprensión cuando “papi está de guardia” o “papi sale de guardia y está cansado”, por su tolerancia con el poco tiempo que podemos pasar con él en el día a día, y, simplemente, por existir.

A ti, mi segundo/a hijo/a, tanto si llegas como si no, por reavivar nuestras ilusiones y unirnos más como familia.



*“El arte es largo, la vida breve, la ocasión fugitiva, la experiencia falaz, el juicio dificultoso. No basta que el médico haga por su parte cuanto debe hacer, si por otro lado no concurren al mismo objeto, los asistentes y demás circunstancias exteriores”*

**Hipócrates**

*“Saber que sabemos lo que sabemos y saber que no sabemos lo que no sabemos, ese es el verdadero conocimiento”*

**Nicolás Copérnico**

*“El fin de la ciencia no es abrir la puerta al saber eterno, sino poner límite al error eterno”*

**Galileo Galilei**

*“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”*

**Isaac Newton**

*“Cada día sabemos más y entendemos menos”*

**Albert Einstein**



# ÍNDICE

---

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
1.1 FIBROSIS QUÍSTICA.....	19
1.1.1 <i>Definición</i> .....	19
1.1.2 <i>Antecedentes históricos</i> .....	20
1.1.3 <i>Epidemiología</i> .....	28
1.1.4 <i>Genética</i> .....	30
1.1.5 <i>Patogenia</i> .....	34
1.1.6 <i>Microbiología</i> .....	38
1.1.7 <i>Clínica</i> .....	42
1.1.8 <i>Diagnóstico</i> .....	46
1.2 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO CON FUNCIÓN PULMONAR .....	53
1.2.1 <i>Correlación genotipo-fenotipo</i> .....	53
1.2.2 <i>Pruebas de función respiratoria</i> .....	54
1.2.3 <i>Resultados</i> .....	56
1.3 CAPACIDAD DE ESFUERZO Y FIBROSIS QUÍSTICA.....	60
1.3.1 <i>Antecedentes</i> .....	60
1.3.2 <i>Correlación de la función pulmonar y el genotipo con la capacidad de esfuerzo</i> .....	63
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>67</b>
2.1 HIPÓTESIS.....	67
2.2 OBJETIVOS.....	67
<b>3. MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	69
3.2 PACIENTES.....	69
3.3 VARIABLES DEL ESTUDIO .....	70
3.4 ERGOMETRÍA RESPIRATORIA .....	72
3.5 EXAMEN NEUROMUSCULAR .....	74
3.6 BIOPSIA MUSCULAR .....	74
3.7 ESTUDIO DE LA CADENA RESPIRATORIA. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS) .....	77
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	79
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO .....	81
4.2 ERGOMETRÍA RESPIRATORIA .....	83
4.3 ELECTROMIOGRAFÍA.....	88
4.4 EXAMEN NEUROMUSCULAR.....	88
4.5 BIOPSIA MUSCULAR .....	89
4.6 ESTUDIO DE LA CADENA RESPIRATORIA.....	93
4.7 OTROS RESULTADOS .....	95
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>111</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Preparaciones histopatológicas del páncreas de pacientes afectados de FQ.....	22
<b>Figura 1.2.</b> Algoritmo diagnóstico partiendo del test del sudor en pacientes con sospecha clínica de fibrosis quística. Consenso Europeo 2006.....	48
<b>Figura 1.3.</b> Algoritmo diagnóstico partiendo del estudio genético a utilizar en los programas de cribado neonatal de fibrosis quística. Consenso Europeo 2006.....	50
<b>Figura 1.4.</b> Análisis comparativo de los valores espirométricos medidos usando ANOVA. La media (IC 95%) de los valores de FVC y FEV1 fueron mayores en pacientes con al menos una mutación CFTR de clase III, IV ó V.....	57
<b>Figura 1.5.</b> Evolución de la enfermedad pulmonar durante el seguimiento en la unidad de FQ, ajustado por edad de diagnóstico y tiempo de evolución, usando ANOVA. La progresión del daño pulmonar fue significativamente mayor en pacientes con mutaciones CFTR de clase I.....	58
<b>Figura 1.6.</b> Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier por genotipo.....	59
<b>Figura 3.1.</b> Pacientes incluidos en el estudio.....	70
<b>Figura 3.2.</b> Representación esquemática del sistema OXPHOS.....	78
<b>Figura 4.1.</b> FVC y FEV1 (% del teórico) de los pacientes en función de su genotipo.....	82
<b>Figura 4.2.</b> Capacidad funcional de los pacientes en función del grado de obstrucción en las PFR.....	83
<b>Figura 4.3.</b> Pendiente del pulso de oxígeno desviada a la derecha.....	85
<b>Figura 4.4.</b> Pendiente de la frecuencia cardíaca desviada a la izquierda.....	85
<b>Figura 4.5.</b> RER con patrón irregular.....	86
<b>Figura 4.6.</b> Biopsia muscular con presencia de núcleos internos.....	89
<b>Figura 4.7.</b> Biopsia muscular con fibras hipertróficas.....	89
<b>Figura 4.8.</b> Biopsia muscular con fibras en anillo.....	90
<b>Figura 4.9.</b> Biopsia muscular con fibras hipertróficas con baja actividad oxidativa y patrón interno irregular.....	90
<b>Figura 4.10.</b> Biopsia muscular con infiltrado inflamatorio.....	91

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b> Características fenotípicas sugestivas de FQ.....	42
<b>Tabla 1.2.</b> Criterios diagnósticos de FQ Clásica o Típica (Consenso ECFS 2006).....	48
<b>Tabla 1.3.</b> Criterios diagnósticos de FQ no Clásica o Atípica (Consenso ECFS 2006).....	49
<b>Tabla 4.1.</b> Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.....	81
<b>Tabla 4.2.</b> Valores ergométricos en función del grado de obstrucción en las PFR.....	84
<b>Tabla 4.3.</b> Valores ergométricos de los pacientes en función de la gravedad del genotipo.....	87
<b>Tabla 4.4.</b> Valores del estudio anatomopatológico de las biopsias musculares de los pacientes en función del grado de obstrucción en las PFR.....	92
<b>Tabla 4.5.</b> Valores del estudio anatomopatológico de las biopsias musculares de los pacientes en función del genotipo.....	92
<b>Tabla 4.6.</b> Valores de la cadena respiratoria en función del grado de obstrucción en las PFR.....	93
<b>Tabla 4.7.</b> Valores de la cadena respiratoria en función de la gravedad del genotipo.....	94
<b>Tabla 4.8.</b> Valores de PFR, genotipo, anatomía patológica, cadena respiratoria y actividad física en función del patrón de limitación en la prueba de esfuerzo.....	96

# AGRADECIMIENTOS

---

A mi “padre profesional”, el Dr. Javier de Gracia, director de esta tesis, por su amistad, por su paciencia, por su esfuerzo, por la confianza que ha tenido siempre en mí, por su apoyo y por las oportunidades que me ha brindado para crecer profesionalmente, siendo un ejemplo constante de responsabilidad, actitud y rigurosidad en el trabajo.

A mi “hermano profesional”, Antonio Álvarez, por su amistad, por sus buenos consejos, por ser siempre un ejemplo como persona y como médico y por su ayuda incondicional en la realización de este trabajo.

A toda mi familia, y en especial a mi hijo Daniel y mi mujer, la Dra. Astrid Crespo, por impulsarme y acompañarme continuamente en la elaboración de la tesis con su enorme pasión por la investigación, siendo todo un ejemplo de fuerza de voluntad, perseverancia y profesionalidad.

A mi tutor de tesis, el Dr. Ferran Morell, por enseñarme que la vida es muy larga y hay tiempo para todo lo que uno se proponga.

A Josep M<sup>a</sup> Bofill, el Dr. Josep Gámez, la Dra. Elena García-Arumí, la Dra. Margarida Gratacós, la Dra. Arantxa Ortega, la Dra. Elena Martínez, Laura Ruano, Pepi López, Emília Soler y Mercè Badia, por su colaboración profesional y su esfuerzo para que este trabajo se pudiera llevar a cabo.

Al Dr. Fernando Mata, porque sin su trabajo y generosidad no hubiera sido posible iniciar esta tesis.

A la Dra. Maria Antònia Ramon, por su esfuerzo y colaboración profesional.

A todos los pacientes con Fibrosis Quística, y muy especialmente a los que han participado en este estudio, por su comprensión, paciencia, esfuerzo y sacrificio.

A Merche Catalán y Yolanda Portomeñe, por su amistad, su apoyo y ayuda desde el primer día que iniciamos este trabajo.

A Karina Loor y Patricia Chang, por su amistad, ayuda y apoyo profesional, sin el cual muy probablemente no hubiera sido posible terminar esta tesis.

A David de la Rosa, Eduardo Coluccio, Ramon Toribio, Leonor Luque, Nuria Neira y Carmen Piqueras, por su amistad y su compañerismo.

Al Instituto de Salud Carlos III, a la Fundación Sira Carrasco para la Ayuda a la Fibrosis Quística, a la Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP) y a la Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP), por su apoyo científico y económico.

A la Medicina asistencial y a todo el personal médico, de enfermería, de secretaría, auxiliares de enfermería y celadores que forman o han formado parte del Servei de Pneumologia del Hospital Vall d’Hebron, por su excelente trabajo y dedicación.



# ABREVIATURAS

---

**°C:** grados centígrados

**ABPA:** aspergilosis broncopulmonar alérgica

**ACBVD:** Agenesia congénita bilateral de vasos deferentes

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico

**ANOVA:** análisis de la varianza

**ANT:** translocador de nucleótidos de adenina

**ARN:** ácido ribonucleico

**AT:** umbral anaeróbico

**ATP:** adenosín trifosfato

**CFF:** Cystic Fibrosis Foundation

**CFTR:** cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

**Cl:** ion cloruro

**CO<sub>2</sub>:** dióxido de carbono

**COX:** Citocromo C oxidasa

**DHO-CoQO:** dihidrooorotato CoQ oxidorreductasa

**DPNT:** diferencia de potencial nasal transepitelial

**ECFS:** European Cystic Fibrosis Society

**ECSC:** European Coal and Steel Community

**EMG:** electromiografía

**ENaC:** canal epitelial de Na<sup>+</sup>

**EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**ETF-CoQO:** flavoproteína transportadora de electrones CoQ oxidorreductasa

**FEV<sub>1</sub>:** Forced Expiratory Volume in 1 second

**FQ:** Fibrosis Quística

**FR:** frecuencia respiratoria

**FVC:** Forced Vital Capacity

**HR:** frecuencia cardíaca

**HRR:** reserva cardíaca

**ICD:** International Classification of Diseases

**IMC:** Índice de masa corporal

**IPAQ:** International Physical Activity Questionnaire

**K<sup>+</sup>:** ion potasio

**Kb:** kilobase

**KDa:** kiloDalton

**MEFV o FEF25-75:** flujo medio entre el 25% y el 75% de la capacidad vital forzada

**mEq:** miliequivalente

**MMT:** Balance muscular manual

**MVIC:** Contracción isométrica voluntaria máxima

**Na<sup>+</sup>:** ion sodio

**NBD:** nucleotide binding domain

**NIRS:** espectroscopia de infrarrojo cercano

**O<sub>2</sub>:** oxígeno

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ORO:** Oil-red O

**OXPHOS:** sistema de fosforilación oxidativa

**p:** significación estadística

**PAS:** Ácido periódico de Schiff

**PCr:** fosfocreatina

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PETCO<sub>2</sub>:** presión parcial de CO<sub>2</sub> al final del volumen corriente

**PFR:** pruebas funcionales respiratorias

**RER:** cociente respiratorio

**RRF:** Ragged Red Fibers

**RTFQ:** regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística

**RV:** volumen residual

**SARM:** S. aureus resistentes a la meticilina

**SatO<sub>2</sub>:** saturación de O<sub>2</sub>

**SDH:** Succino deshidrogenasa

**TA:** tensión arterial

**TLC:** capacidad pulmonar total

**Tx:** Texas

**USA:** United States of America

**VD/VT:** razón de espacio muerto fisiológico con el volumen corriente

**VE/VCO<sub>2</sub>:** equivalente ventilatorio para el CO<sub>2</sub>

**VE/VO<sub>2</sub>:** equivalente ventilatorio para el O<sub>2</sub>

**VE<sub>máx</sub>:** ventilación máxima

**VO<sub>2</sub>/HR:** pulso de oxígeno

**VO<sub>2</sub>:** consumo de oxígeno

**Vt/IC:** relación entre volumen corriente y capacidad inspiratoria

**W:** carga

**X<sup>2</sup>:** Chi-cuadrado

**ΔVO<sub>2</sub>/ΔWR:** relación entre VO<sub>2</sub> y la carga



# JUSTIFICACIÓN

---

La tesis doctoral que presento es el resultado del trabajo realizado en el Servicio de Neumología del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) y en el Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), en el programa de Doctorado en Medicina del Departamento de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) y bajo la dirección del profesor Javier de Gracia Roldán.

La disfunción pulmonar es la manifestación clínica más común en los pacientes con Fibrosis Quística (FQ). Sin embargo, hay otras consecuencias sistémicas que contribuyen a disminuir la calidad de vida de estos pacientes, como la intolerancia al ejercicio. A pesar de todos los estudios realizados en este sentido hasta la fecha, los mecanismos que la provocan todavía no han sido dilucidados. Las evidencias sugieren una expresión anómala en el músculo esquelético de la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ (RTFQ o CFTR por su acrónimo en inglés), que se asocia a anomalías en la oxigenación y el metabolismo muscular. Por otra parte, al ser la FQ una enfermedad genética de cuyo gen se han descrito más de 2000 mutaciones diferentes, podrían existir determinantes genéticos que influyeran en estos mecanismos.

La línea de investigación desarrollada para la elaboración de esta tesis tuvo como objetivo fundamental mejorar los conocimientos sobre la causa de la disminución de la capacidad de esfuerzo en los pacientes con Fibrosis Quística, mediante el estudio funcional, histológico y del sistema oxidativo de su músculo esquelético. La confirmación de una alteración a este nivel y el conocimiento de su patogenia podrían condicionar futuros protocolos de tratamiento que mejoren la calidad de vida de estos pacientes.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 FIBROSIS QUÍSTICA

### 1.1.1 Definición

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad genética autosómica recesiva potencialmente letal más frecuente en las poblaciones de ascendencia europea, si bien en las tres últimas décadas ha visto aumentada significativamente su esperanza de vida. Los resultados obtenidos de los estudios epidemiológicos y de detección precoz neonatal demuestran una gran variabilidad en su incidencia entre diferentes países y razas, presumiblemente debida a la desigual distribución del gen mutado en las distintas poblaciones. En España se dispone de datos procedentes de varias Comunidades Autónomas, en las que existe desde hace años un programa de cribado neonatal de la FQ. En Cataluña, único lugar donde este programa lleva más de 10 años en funcionamiento, se ha objetivado una incidencia de 1:6.496<sup>1</sup>. Es causada por la mutación de un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 7. Este gen codifica para una proteína conocida como regulador de la conductancia transmembrana de la FQ (RTFQ o CFTR por su acrónimo en inglés), que actúa como canal principal del ion cloruro de la membrana e influye en otros (calcio, sodio, etc.); se localiza en la membrana apical del epitelio secretor de las glándulas mucosas de vías aéreas, digestivas y reproductoras, y en las serosas del sudor y saliva (fue denominada originalmente también como Disexocrinosis congénita familiar). Su alteración por tanto afecta a múltiples órganos y sistemas, debido a la existencia de alteraciones hidroelectrolíticas y de las mucoproteínas a nivel glandular, originándose secreciones anómalas y espesas que producen obstrucción e infección con las consiguientes

manifestaciones clínicas. En la actualidad, la principal causa de morbilidad y mortalidad continúa siendo la afectación pulmonar, causante de un 95% de los fallecimientos.

### 1.1.2 Antecedentes históricos<sup>2</sup>

Mucho antes de que la FQ se reconociese como una entidad patológica, existían observaciones recogidas en el antiguo folclore popular del norte de Europa en las que se aseguraba que los niños que al besarlos tenían sabor salado, estaban embrujados y morirían precozmente. En este sentido, en un manuscrito alemán del siglo XV (Codex Latinus Monacensis 849), se recoge la bendición “Wider elbe” contra las enfermedades de los niños encantados. Dicho códice recomienda lamer la nariz del niño, supuestamente encantado, para averiguar si tiene o no sabor salado *-so sint es dy elbe-*. Es la primera documentación escrita que relaciona el sabor salado con una posible enfermedad, relación que hoy es ampliamente conocida con la FQ.

Según trabajos de X. Estivill y su grupo, el gen de la FQ pudo aparecer hace aproximadamente 52.000 años. Evidentemente, no poseemos testimonios tan antiguos sobre la clínica de la enfermedad.

En el año 1606 surge una descripción relacionada con este tema en la literatura médica de nuestro Siglo de Oro; el Dr. D. Juan Alonso y de los Ruyzes de Fontecha, Profesor de Medicina de la Universidad de Alcalá, en su libro “diez privilegios para mugeres preñadas” dice: “... que se conoce a la gente embrujada, si al rascarles en la frente, uno después nota un sabor salado en los dedos”. Otras referencias al sabor a sal y su relación con el encantamiento de los niños se dan en la literatura europea del siglo XVII.

Probablemente, la primera descripción anatomopatológica macroscópica del proceso se debe al holandés Peter Paaw, quien en 1595, en Leiden, realizó la autopsia de una niña de once años y describe: “Se suponía que estaba hechizada”. “Había tenido síntomas extraños durante ocho años. La niña estaba muy flaca y agotada por la fiebre prolongada. El páncreas estaba abultado, cirroso y de color blanco brillante después de cortarlo y abrirlo”. “La causa de muerte fue el páncreas”, concluye Paaw. Vemos aquí la relación entre la superstición o hechizo y la causa orgánica de la enfermedad que nos ocupa. También de Holanda es la observación de Gerardus Blasius (1677) sobre el páncreas cirroso de un niño de nueve años fallecido a quien estudió.

Una de las primeras “Historias clínicas” fue la realizada por Georg Seger -de Thorm, Polonia- en 1673. Refiriéndose a una niña de tres años de edad recoge la presencia de fiebre, vómitos, diarrea, dificultades para ganar peso e inanición prolongada. Tras su muerte, poco después, la autopsia -practicada por Bartholomeus Taubenheim- mostró un páncreas endurecido y cirroso.

Nils Rosen von Rosenstein (1706 - 1773), eminente pediatra sueco, en su libro sobre enfermedades infantiles describe un cuadro, dentro del apartado genérico de los procesos diarreicos, al que denomina “fluxus coeliasus”, que se caracterizaba por la presencia de diarrea, distrofia, falta de medro y debilidad; pese a ello, los enfermos tenían un apetito voraz. Describe además dilataciones en manos y pies y un vientre distendido. El páncreas estaba endurecido. Probablemente eran en su mayoría enfermos con FQ.

Carl Von Rokitansky describe -en la pujante Viena de 1838- los resultados de una autopsia. Se trataba de un feto de siete meses de gestación, sin signos de vida postnatal, en el que se detectó una perforación de intestino delgado y flujo de meconio libre en la cavidad peritoneal con reacción inflamatoria. Presumiblemente se trataba de lo que hoy conocemos como íleo meconial.

En 1850, Alois Bednar, también en Viena, describe un caso similar en un recién nacido que murió al sexto día de vida. Coincidentes en el tiempo, en Inglaterra se describen y publican cuadros similares.

La primera descripción de la clínica e histopatología de la FQ (figura 1.1) se debe a Dorothy Andersen<sup>3</sup>, patóloga en el hospital de niños de Nueva York, quien publicó en 1938 una detallada revisión de los signos de esta enfermedad incluyendo la asociación con el íleo meconial. La Dra. Andersen atribuyó la enfermedad a una deficiencia de vitamina A. Unos años antes, en Europa, Fanconi (1936) había descrito un síndrome celíaco con insuficiencia pancreática y bronquiectasias que, sin duda, correspondía a pacientes con FQ.

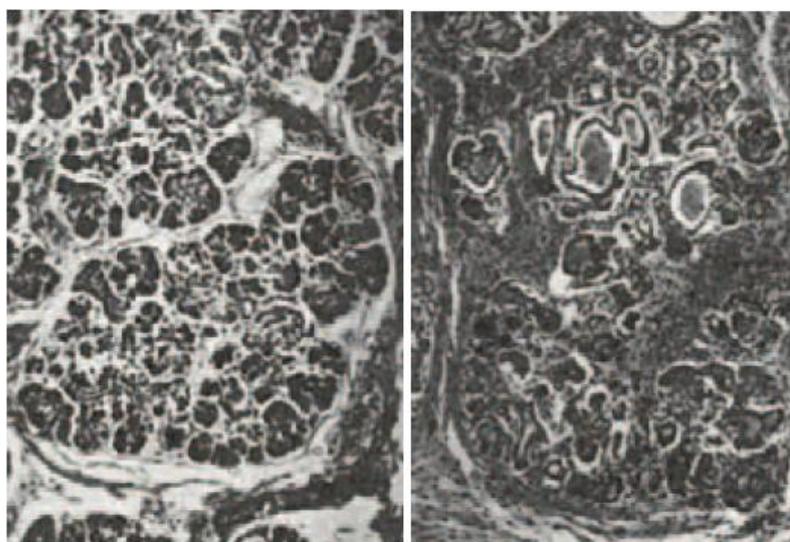


Figura 1.1. Preparaciones histopatológicas del páncreas de pacientes afectados de FQ (Andersen DH; 1938)

Farber<sup>4</sup>, en 1943, propuso el término de mucoviscidosis, en base a los hallazgos observados en las autopsias de pacientes fallecidos por FQ, nombre que se sigue utilizando en la actualidad. Del estudio de 47 familias con pacientes que padecían esta enfermedad, Andersen y Hodges<sup>5</sup> (1946) concluyeron que la incidencia familiar observada era concordante con una herencia autosómica recesiva. En aquellos años, el diagnóstico se realizaba por la existencia de familiaridad, insuficiencia pancreática y afectación pulmonar crónica.

Bodian<sup>6</sup>, en 1952, elaboró la teoría patogénica de que las lesiones que observaban en el páncreas, pulmón, hígado y conductos deferentes se debían a secreciones anormalmente espesas que taponaban los conductos excretores de las glándulas exocrinas, produciéndose secundariamente la dilatación quística, fibrosis y destrucción de la glándula. Este autor describió por primera vez la cirrosis biliar focal, lesión patognomónica de la FQ en el hígado.

Ese mismo año, en Nueva York, se produjo una ola de calor que originó que muchos pacientes con FQ sufrieran deshidrataciones con alcalosis hipoclorémica y postración. Di San't Agnese<sup>7</sup>, investigando su causa, llegó a la conclusión de que se debían a la eliminación anormal de ion cloruro por el sudor. Posteriormente, la determinación de iones cloruro y sodio en sudor se convirtió en el mejor método diagnóstico de FQ. Inicialmente, se sometía a los pacientes a altas temperaturas para inducir la sudoración, lo cual no estaba exento de riesgos, pero en 1959, mediante la prueba de iontoforesis con pilocarpina diseñada por Gibson y Cooke<sup>8</sup>, se pudo realizar de forma segura, siendo hasta la fecha una prueba diagnóstica que no ha sido superada.

Durante la década de los años 50-60, aunque la causa fundamental de la lesión se desconocía, se fueron perfilando las diferentes formas clínicas. Shwachman<sup>9</sup> fue el primero que publicó que el 15% de los pacientes no tenían afectación pancreática y estableció un sistema de puntuación clínico de gravedad que todavía hoy se sigue utilizando.

Los recién nacidos con íleo meconial tenían un pronóstico sombrío: cerca del 50% fallecían. La realización de una técnica denominada ileostomía por Bishop y Koop<sup>10</sup>, permitió salvar muchas vidas. Más tarde, en 1965, Noblett<sup>11</sup> utilizó el Gastrografín® en el íleo meconial no complicado, lo que consiguió la curación de los niños sin realizar procedimientos quirúrgicos.

Otros avances en el campo de la farmacología, como la aparición de penicilinas resistentes a betalactamasas y la introducción de fermentos pancreáticos con cubierta entérica, que impiden la inactivación de la lipasa por el ácido clorhídrico del estómago, contribuyeron de manera decisiva a la supervivencia de estos enfermos.

En 1983, el descubrimiento por Quinton<sup>12</sup> de que el defecto específico de la FQ era una reabsorción defectuosa del ion cloruro a nivel de las células epiteliales del epitelio glandular, marcó un cambio en la investigación de esta enfermedad.

La búsqueda del gen FQ fue un proceso largo y arduo. Se inició a principios de los 80, cuando ya se conocía que existía un defecto en el transporte iónico. A pesar de que numerosos trabajos de investigación se dirigieron a definir la proteína anómala de la FQ, ésta permanecía oculta, por lo que diversos investigadores decidieron buscar directamente en el genoma.

La localización de la región cromosómica donde se encontraba el gen se inició gracias al hallazgo, descrito por Eiberg<sup>13</sup> (1985), del ligamiento de la FQ con una enzima polimórfica, la paraoxonasa. Posteriormente, Lap Chee Tsui<sup>14</sup>, en Toronto, describió un marcador en el cromosoma 7 unido tanto a la paraoxonasa como a la FQ. Poco después se identificaron nuevos marcadores ligados a la FQ. El gen MET, descubierto por R. White<sup>15</sup>, y el marcador DNA J3,11, en el laboratorio de Williamson, ambos localizados en el brazo largo del cromosoma 7. Al estudiar estos marcadores en familias con pacientes afectados de FQ, se pudo observar que cosegregaban en el 98.5% de los casos; lo que permitió hacer el diagnóstico prenatal con muy escasos errores. Farrall<sup>16</sup>, en 1986, con este método, pudo excluir por primera vez la presencia de FQ en un feto.

A pesar de que los marcadores ligados a la FQ se localizaban a escasa distancia del gen, éste se mostraba esquivo, ya que los estudios familiares empleando estos marcadores habían alcanzado el límite de resolución de los estudios de ligamiento genético. El descubrimiento de enzimas de restricción que permiten reconocer polimorfismos del genoma humano junto con el desarrollo de la electroforesis en gel de campo pulsante, permitió configurar mapas más precisos de la región del cromosoma 7 donde se había acotado el gen de la FQ. A partir de este momento, la búsqueda del gen se efectuó mediante clonación y secuenciación de elementos superponibles de ácido desoxirribonucleico (ADN), con “saltos” por encima de las regiones no clonables. En tres ocasiones se descubrió una secuencia de nucleótidos no metilados citosina-guanina, que habitualmente preceden el inicio de un gen, comprobándose sin embargo que no existían signos de transcripción de estas

secuencias. Finalmente, a últimos de 1989, Riordan, Rommens y Kerem<sup>17</sup> comunicaron en la revista Science la identificación del gen de la FQ.

Se trata de un gen muy grande de 250 Kb que contiene 27 exones y 26 intrones y que se transcriben en un ARN mensajero (ARNm) de 6.5 Kb, que codifica para la síntesis de una proteína de 1.480 aminoácidos. La secuenciación del ADN del gen de los enfermos con FQ, demostró la presencia de una pequeña mutación, la ausencia del triplete de bases que codifica la fenilalanina en la posición 508 de la proteína; mientras que los cromosomas normales no presentaron esta delección. Esta mutación llamada F508del se observó en el 70% de una población canadiense con FQ.

A partir del ADN clonado se predijo la estructura proteica; ésta contiene doce regiones hidrófobas que presumiblemente están ancladas en la bicapa lipídica de la membrana celular y una gran región intracitoplasmática que se llamó “dominio R”, que contiene múltiples lugares para la fosforilización y otras dos pequeñas regiones de fijación a nucleótidos con capacidad de unión a adenosín trifosfato (ATP). Esta proteína tiene una estructura similar a las proteínas transportadoras dependientes de ATP que se encuentran en organismos uni y pluricelulares, encargadas de exportar macromoléculas al exterior mediante la energía obtenida a partir de la bomba ATP. Al producto del gen, Riordan lo llamó regulador de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR)<sup>17</sup>.

Quinton había descrito un defecto en el transporte del ion cloruro en las células del epitelio glandular de los pacientes con FQ. En base a esta observación, los estudios de Welsh<sup>18</sup> (1990) sobre los canales de ion cloruro en las células epiteliales de las vías aéreas y glándulas sudoríparas, demostraron que la secreción de ion cloruro estaba

alterada en la FQ, particularmente la actividad mediada por adenosín monofosfato cíclico (AMPC), por lo que después del aislamiento del gen, Drumm y colaboradores<sup>19</sup> transfectaron in vitro células de enfermos con FQ con ADN clonado, demostrando que se corregía el defecto de impermeabilidad al ion cloruro en el cultivo celular. La primera evidencia de que la proteína CFTR era un canal de transporte de ion cloruro fue obtenida por Kartner y colaboradores<sup>20</sup> al lograr la expresión de dicha proteína en una línea celular de invertebrados, que no poseen conductancia para el ion cloruro.

Por técnicas inmunocitoquímicas, el ARNm de CFTR se ha identificado en las glándulas submucosas del pulmón humano, glándulas sudoríparas, páncreas, criptas intestinales y conductos biliares, todos ellos tejidos donde se expresa CFTR y sorprendentemente en grandes cantidades en los túbulos proximales y distales del riñón, donde no se expresa la enfermedad, quizá debido a una vía alternativa de eliminación del ion cloruro.

### 1.1.3 Epidemiología

En población caucásica, la mayoría de los autores citan una incidencia de un enfermo de FQ cada 2.500-3.000 nacidos vivos en la raza blanca, aunque los resultados obtenidos de los estudios epidemiológicos y de detección precoz neonatal demuestran gran variabilidad en la incidencia de la FQ entre diferentes países y razas. Algunas publicaciones señalan rangos de incidencia desde 1 por 1.800 en Eslovenia a 1 por 25.000 en Finlandia<sup>21</sup> con incidencias intermedias de 1 por 2.381 en el Reino Unido, 1 por 3.300 en Alemania, 1 por 4.348 en Francia, 1 por 4.238 en Italia, 1 por 4.750 en Países Bajos y 1 por 10.080 en Rusia<sup>22</sup>. En Wisconsin se ha publicado una incidencia de 1 por 4.189<sup>23</sup>. En España, como consecuencia de la implementación del programa de cribado neonatal de FQ en distintas comunidades, se está reconociendo una incidencia inferior a la estimada con anterioridad, siendo de 1:6.496 en Cataluña<sup>1</sup>.

En los grupos no caucásicos las cifras son muy inferiores; así, en la población de raza negra americana se indica una incidencia de 1 por cada 17.000, en la raza oriental de Hawai de 1 por cada 90.000 y en Japón de 1 por cada 320.000 a 680.000 nacidos vivos<sup>24,25</sup>. Estos resultados pueden estar influidos, además de por factores genéticos, por la carencia de métodos diagnósticos para la detección de la enfermedad, ya que en estos países existen otros problemas de salud que consideran más prioritarios.

En cuanto a la supervivencia, desde las primeras publicaciones sobre enfermos afectados de FQ en 1938, en cuyo momento menos del 50% de los pacientes superaban el año de vida, ha ido mejorando claramente, siendo la mediana de la supervivencia de 4 años hacia los años 60, alcanzando los 28.3 años en varones y 31.8 en mujeres en 1996. Para los pacientes nacidos en 1990 se estimaba que la esperanza media de vida

podría ser de unos 40 años<sup>26</sup>. En el estudio realizado por Kulich y colaboradores sobre un total de 31.012 enfermos con FQ de las Unidades de EE.UU. (entre 1985 y 1999), se concluyó que el incremento de supervivencia observado desde 1985 se limitaba principalmente a la población infantil y adolescente (entre 2-20 años) objetivando que el sexo femenino a lo largo de este periodo tenía peor supervivencia que el masculino<sup>27</sup>.

Al incremento de la supervivencia han contribuido decisivamente el diagnóstico temprano por cribado neonatal y los avances en la terapia digestiva y antibiótica, traduciéndose en una mejoría del estado nutricional y una disminución de las infecciones respiratorias, aspectos muy importantes en la evolución de la enfermedad. Otro punto importante que ha influido en el incremento de la supervivencia ha sido la creación y organización de las unidades multidisciplinarias de FQ constituidas por gastroenterólogos, neumólogos, nutricionistas, endocrinólogos, genetistas, fisioterapeutas, psicólogos, trabajadores sociales, microbiólogos y radiólogos expertos<sup>28</sup>. Claramente el seguimiento de los pacientes en estas unidades especializadas ha permitido un mejor control y seguimiento. Asimismo, la creación de las asociaciones laicas en la lucha contra la FQ, a partir de la década de los 80, ha conseguido aunar fuerzas, junto con los profesionales sanitarios, para producir mejoras en el campo de la FQ, e incrementar el apoyo psicosocial a los enfermos y su entorno familiar y profesional.

#### 1.1.4 Genética

El gen CFTR abarca una secuencia genómica de 230 kb organizada en 27 exones. El ADN complementario (ADNc) identifica un transcrito de 6.1 kb con 4.400 nucleótidos que codifican una proteína de 1.480 aminoácidos y 170 kDa<sup>17</sup>. Los estudios de la región promotora indican la presencia de diferentes puntos de inicio de la transcripción y un complejo mecanismo de regulación responsable de su expresión tejido dependiente y de la especificidad observada a lo largo del desarrollo<sup>29</sup>.

La denominación de las mutaciones describe el cambio de secuencia a nivel de ADN, ARN o proteína<sup>30</sup>. En el gen CFTR predominan las mutaciones puntuales que afectan a uno o pocos nucleótidos. En las mutaciones “error de sentido” el cambio de nucleótido determina, a su vez, un cambio de aminoácido. Por ejemplo, la mutación R334W en la cual la arginina del codón 334 es sustituida por triptófano. Estas mutaciones constituyen el grupo más numeroso y representan casi el 50% del total.

Las mutaciones con “cambio de pauta” son producidas por la inserción / deleción de uno o pocos nucleótidos que acaban generando una proteína truncada. La mutación 1609del-CA indica la pérdida de las bases citosina y adenina. Un 23% de las mutaciones del gen CFTR pertenecen a este grupo.

Las mutaciones que modifican la señal de splicing producen proteínas inestables de distinto tamaño, bien por la incorporación de una secuencia codificante como ocurre en la mutación 1811+1,6kbA>G, que adiciona 16 aminoácidos a la proteína en el intrón 11, bien por su eliminación; la pérdida del exón 5 se debe a la mutación 711+1G>T. El 16% de las mutaciones CFTR afectan al correcto splicing.

Un porcentaje similar corresponde a mutaciones “sin sentido” que originan un codón de terminación. Esta señal prematura impide la síntesis de la proteína. Su nomenclatura con la letra “X” señala el codón en el cual se produce la interrupción (G542X, R1162X).

Las deleciones / inserciones de tamaño variable comprenden un 5%. La mutación F508del es la consecuencia de la pérdida de un único triplete, mientras que la deleción de 21 kb, CFTRdele2,3, abarca los exones 2, 3, y buena parte de los intrones flanqueantes.

La mutación F508del es la más prevalente del gen CFTR y fue la primera identificada. Esta mutación, producida por la pérdida del triplete CTT, determina la deleción de la fenilalanina en el codón 508<sup>31</sup>. En la población mundial, alrededor de 2/3 de las mutaciones del gen CFTR son por esta deleción; sin embargo, se ha descrito un amplio rango de frecuencias. En Europa, su frecuencia oscila desde el 87% en Dinamarca hasta el 21% en Turquía y, en general, se observa un gradiente Norte–Sur, indicando la mayor heterogeneidad molecular de la región mediterránea<sup>32</sup>. Actualmente, la base de datos del consorcio FQ reúne más de 2017 mutaciones<sup>33</sup>, de las cuales sólo cinco, F508del, G542X, G551D, N1303K y W1282X, pueden considerarse ampliamente representadas, con una frecuencia global superior al 1%<sup>34</sup>.

Es previsible que cualquier alteración en la secuencia del gen afecte la compleja regulación del canal, modificando la síntesis y/o estructura de la proteína. El efecto sobre la proteína depende del tipo de mutación y su localización. Basándose en los estudios funcionales de proteínas anómalas se ha propuesto la clasificación de las mutaciones en 6 grupos<sup>35,36</sup>. La clase I incluye mutaciones que introducen una señal

prematura de terminación, produciendo transcritos inestables y/o proteínas truncadas. Las mutaciones de este grupo pueden ser “sin sentido” (G542X), “cambio de pauta” (3905insT) o splicing (621+ 1G>T).

Las mutaciones de clase II afectan la maduración de la proteína. En el proceso de biosíntesis intervienen chaperonas (hsp70, calnexina) que interaccionan con el gen CFTR. Las proteínas inmaduras quedan ancladas por estas chaperonas y son degradadas en el retículo endoplásmico, sólo excepcionalmente consiguen alcanzar la membrana celular. La mutación F508del es la más relevante de este grupo.

Las mutaciones de clase III alteran la regulación del canal de cloro reduciendo su actividad. Integran este grupo mutaciones de los dominios R y NBs de los que depende la fosforilación y unión de ATP (G551D).

La clase IV está constituida por mutaciones que cambian los aminoácidos que forman el poro del canal. Se localizan en los dominios TM y reducen la conducción iónica (R117H, R347P).

En la clase V se agrupan las mutaciones que producen una disminución en la síntesis de proteína. Aunque la mayoría son mutaciones de splicing que producen transcritos alternativos (2789+5G>A, 3849+10kbC>T, 5T), también se ha demostrado este mismo efecto en mutaciones “error de sentido” (D565G, G576A) mediante el análisis de los transcritos y la construcción de mini-genes<sup>37</sup>.

Finalmente, la clase VI está formada por mutaciones que determinan la pérdida del extremo COOH- terminal, reduciendo la estabilidad de la molécula (Q1412X, 4279insA).

En general, las mutaciones de clase I y II impiden la maduración de la proteína y se asocian a un fenotipo de FQ grave, mientras que las mutaciones de clase III-VI están asociadas a una amplia variabilidad fenotípica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunas mutaciones alteran varias funciones de la proteína CFTR y, por consiguiente, pueden ser incluidas en más de una clase, o producen una disfunción distinta a la esperada. En particular, las mutaciones “error de sentido” requieren el estudio funcional de las proteínas mutantes para determinar las consecuencias sobre la actividad del canal. Así, el análisis de la mutación M1137R en el dominio TM12, hipotéticamente en la clase IV, demuestra que la mutación afecta al proceso de maduración de la proteína (clase II)<sup>38</sup>. Bajo esta óptica, la clasificación propuesta debe ser considerada con cierta flexibilidad.

### 1.1.5 Patogenia

La proteína CFTR está formada por una cadena única compuesta por 1.480 aminoácidos. Contiene 12 regiones hidrofóbicas embutidas en la membrana lipídica. También existe un dominio llamado NBD-1 (nucleotide binding domain), que es un lugar para la unión e hidrólisis de ATP, y una región hidrofílica de más de 400 aminoácidos denominada dominio R (regulatory domain), en el que se efectúa la fosforilación dependiente de las proteinquinasas A y C. Finalmente, hay otro dominio NBD-2 que puede servir de enlace al ATP<sup>39</sup>. Esta estructura clasifica la CFTR dentro de la familia de las proteínas ABC (ATP-binding cassette) que se asocian al transporte de iones mediante la hidrólisis de ATP<sup>40</sup>.

El metabolismo de la CFTR se inicia en el retículo endoplásmico, donde un polipéptido glicosilado queda rodeado por una membrana lipídica y se traslada al aparato de Golgi. Allí se glicosila de nuevo para después trasladarse a la zona apical de la membrana plasmática. Tanto en el retículo endoplásmico como en los pasos siguientes, hasta llegar al aparato de Golgi, la CFTR interacciona con unas proteínas llamadas chaperonas, sin que esté claro hasta qué punto éstas intervienen en su degradación o ayudan a su procesamiento<sup>41</sup>. En el intestino puede haber un paso posterior desde la membrana apical a unas vesículas submembranas, donde queda almacenada para después retornar a la superficie celular. En el resto de los órganos, después de 4-6 horas, la proteína se degrada y es reemplazada por nuevas moléculas.

La proteína CFTR parece que actúa como un canal para el ion cloruro (Cl<sup>-</sup>) dependiente del AMPc, aunque también regularía otros canales iónicos<sup>42</sup>. En

condiciones normales es capaz de transportar con más rapidez aniones que cationes, en una proporción de 10:1.

La glándula sudorípara normal produce un líquido isotónico, gracias a su contenido en iones  $\text{Cl}^-$  y sodio ( $\text{Na}^+$ ). Cuando pasa por el conducto excretor, que es impermeable al agua, se produce la entrada de ion  $\text{Na}^+$  en la célula, a través de la membrana apical y gracias a la existencia de un gradiente electroquímico favorable. Este ion abandona la célula a través de la membrana baso-lateral, intercambiándose por ion potasio ( $\text{K}^+$ ), en la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. El ion  $\text{K}^+$  entra en la célula por los canales para este ion que existen en la membrana basolateral. El ion  $\text{Na}^+$  intracelular establece un gradiente favorable para que penetre el ion  $\text{Cl}^-$ , tanto por los canales apicales de CFTR como por los basolaterales. En la FQ la pérdida de función de la CFTR hace que el ion  $\text{Cl}^-$  no pueda entrar en la célula y por lo tanto tampoco lo haga el ion  $\text{Na}^+$ , dando lugar a un aumento de estos iones en el sudor.

En el aparato respiratorio la proteína CFTR se comporta de forma diferente según su localización. Así, en el epitelio de la vía aérea proximal se produce una absorción neta de ion  $\text{Na}^+$  desde la luz bronquial. El gradiente electroquímico necesario para ello lo proporciona la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa localizada basolateralmente. El ion  $\text{Na}^+$  penetra en la célula, desde la vía aérea, a través de un canal epitelial para el ion  $\text{Na}^+$  (epitelial  $\text{Na}^+$  channel, ENaC) que es sensible al amiloride. Para mantener el equilibrio eléctrico debe reabsorberse ion  $\text{Cl}^-$  a través de una vía paracelular, mientras que el agua se mueve, tanto por la vía celular como por la paracelular, en respuesta a los gradientes generados por el transporte de iones. En la membrana apical de la célula hay dos canales para el ion  $\text{Cl}^-$ . El canal CFTR es el más importante y tiene una actividad

dos veces mayor que el canal para el ion  $\text{Na}^+$ . El otro se denomina canal alternativo para el ion  $\text{Cl}^-$  (alternative  $\text{Cl}^-$  channel,  $\text{Cl}^-_a$ ) y está regulado por el calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) intracelular. En la FQ, al funcionar mal la CFTR, queda disminuida la permeabilidad de la membrana apical para el ion  $\text{Cl}^-$ , mientras que el canal para el ion  $\text{Na}^+$  mantiene una actividad doble que la que se observa en los sujetos normales. Como consecuencia aumenta la diferencia de potencial a través del epitelio, que en el enfermo resulta más negativo que en el sano. Los niveles más altos de expresión de la proteína CFTR se encuentran en las células serosas de las glándulas submucosas de la vía aérea proximal. En ellas se produce la salida de ion  $\text{Cl}^-$  hacia el exterior. Además, existen canales para el ion  $\text{Na}^+$ , a través de los cuales se segrega también este ion en la misma dirección. Estos movimientos acarrearán el desplazamiento de agua y también de mucinas, originadas en las glándulas submucosas, permitiendo su presencia en la superficie de la vía aérea. Para que todo ello se produzca normalmente debe funcionar un cotransportador basolateral  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, otro cotransportador basolateral formado por iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $2 \text{Cl}^-$ , que permite que entre este último en la célula, y un canal CFTR apical por el que sale el ion  $\text{Cl}^-$  de la célula hacia la luz acinar. El ion  $\text{Na}^+$  sale de la célula siguiendo al ion  $\text{Cl}^-$  por una vía paracelular acompañado de agua. Cuando la CFTR funciona defectuosamente no se produce la salida del ion  $\text{Cl}^-$  por este canal y esto implica la disminución de ion  $\text{Na}^+$  y agua en la luz canalicular, con el consiguiente espesamiento de las secreciones.

En las pequeñas vías aéreas no hay glándulas submucosas y son las células epiteliales las encargadas de mantener el equilibrio hidroelectrolítico. A este nivel dicho epitelio se comporta predominantemente como reabsortivo.

Finalmente, se ha identificado cierta expresividad de CFTR en el epitelio alveolar de sujetos adultos, habiéndose especulado sobre su papel en el mantenimiento de la homeostasis en esta zona<sup>43</sup>.

### 1.1.6 Microbiología

Como consecuencia de la afectación en la eliminación del moco respiratorio que se produce a causa de las mutaciones en el gen CFTR, se favorece la colonización por microorganismos del árbol bronquial. Se ha constatado un sobrecrecimiento de determinadas bacterias que son capaces de acceder al tracto respiratorio inferior, esencialmente *S. aureus*, *H. influenzae* y, sobre todo, *P. aeruginosa*. Estas bacterias desencadenan un proceso inflamatorio local que lesiona la mucosa y el epitelio respiratorio, provocando un deterioro progresivo de la función pulmonar.

Existen diferentes hipótesis que tratan de explicar la presencia y el sobrecrecimiento de los microorganismos y la intensa respuesta inflamatoria que se observa en el tracto respiratorio de los pacientes con FQ. Entre ellas destacan la inflamación primaria y respuesta inflamatoria exacerbada, la presencia de receptores celulares que facilitarían la adherencia bacteriana a las células epiteliales y el proceso de inflamación, el aumento en la concentración de electrolitos y la alteración de las defensinas, y la disminución del fluido isotónico y moco anóxico. Ninguna de ellas explicaría por sí sola el proceso de colonización persistente, pudiendo ser complementarias entre ellas<sup>44</sup>.

Asimismo, en estos pacientes se ha destacado el crecimiento de los microorganismos en la mucosa respiratoria sin invasión de los tejidos, estableciéndose, al igual que en los pacientes con bronquiectasias no FQ o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), un proceso denominado de colonización patogénica, que hace referencia al efecto lesivo que se produce como consecuencia del

sobrecrecimiento de los microorganismos y el desencadenamiento de un círculo vicioso en el que intervendrían diferentes mediadores de la inflamación<sup>45</sup>.

Los microorganismos que colonizan la vía aérea de los pacientes con FQ presentan una secuencia temporal relativamente establecida. Durante las primeras etapas de la vida, las infecciones víricas propias de la infancia (también en el individuo no afecto de FQ) pueden provocar la denudación del epitelio pulmonar, favoreciendo la colonización bacteriana recurrente y el estado local de inflamación crónica<sup>46</sup>. Se ha demostrado que algunos virus (Adenovirus y Coronavirus) y también determinadas bacterias (*M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*) estimulan el sistema fagocítico, favoreciendo la descamación del epitelio y la atracción de los neutrófilos<sup>47</sup>. Con ello se favorece la respuesta inflamatoria presente en el tracto respiratorio que puede evidenciarse incluso antes de que se aislen los patógenos clásicos y característicos de la FQ<sup>48</sup>. Tras este período inicial, la colonización más frecuente es la causada por *S. aureus* y *H. influenzae*. En cuanto a *S. pneumoniae*, éste coloniza también la mucosa respiratoria en las primeras etapas, pero su presencia no es más frecuente que en los niños de igual edad sin FQ<sup>49</sup>. No obstante, presentan unos perfiles de resistencia mayores que en estos.

*S. aureus* es a menudo el patógeno que inicia el proceso de colonización crónica que caracteriza a los pacientes con FQ. Incluso, recientemente, han aumentado las descripciones de aislamientos de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM)<sup>50</sup>. Aunque en su mayoría se asocian a una adquisición nosocomial, también se han descrito clones de SARM comunitarios de mayor virulencia, cuya emergencia en la FQ es preocupante por el mayor deterioro de la función pulmonar que podrían provocar. Conforme

avanza la edad del paciente y progresa la enfermedad, decrece la colonización por *S. aureus* y aumenta el aislamiento de *P. aeruginosa*, que se incrementa de forma gradual hasta convertirse en el patógeno más frecuente en la edad adulta<sup>51, 52</sup>. *H. influenzae* aparece con menor frecuencia junto con otras especies como *B. cepacia*, *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxydans* o *S. maltophilia*<sup>53, 54, 55</sup>. Estas últimas tienen un interés creciente. En el caso de *B. cepacia* puede desarrollarse el denominado “síndrome cepacia”, que conlleva un importante, rápido y fatal deterioro de la función pulmonar, mientras que el resto de los microorganismos pueden marcar un peor pronóstico de la enfermedad, ya que afectan a pacientes de mayor edad y dificultan la respuesta al tratamiento antimicrobiano por la multirresistencia que acompaña a estos microorganismos. Junto a estos, se han aislado también otros considerados como patógenos emergentes por algunos autores, entre los que se incluyen *Pandoraea spp*, *Inquilinus limosus*, *Ralstonia spp*, *Dolosigranulum pigrum* y *Dialister pneumosintes*. La aplicación de métodos moleculares y de técnicas de proteómica (MALdi TOF MS) en los laboratorios de microbiología ha aumentado la descripción de estos patógenos. No obstante, su adscripción patogénica es incierta y son necesarios aún más estudios que definan su relevancia y participación en el deterioro pulmonar<sup>56, 57</sup>.

En los últimos años se ha insistido en la importancia que podrían tener los microorganismos anaerobios y el papel patogénico que podrían ejercer en la FQ. Su presencia no se investiga habitualmente en las muestras respiratorias, pero algunos estudios demuestran que pueden colonizar la mucosa respiratoria del paciente con FQ con una alta carga bacteriana. Podrían actuar como coadyuvantes de la inflamación y ser indicadores de este proceso y ejercer un efecto pasivo en la patogenia de la colonización<sup>58, 59</sup>.

Además, en los pacientes adultos o multitratados con antimicrobianos no es raro encontrar en el tracto respiratorio *Aspergillus* spp, generalmente *A. fumigatus* y diversas especies de *Candida*. Mientras que estas últimas suelen considerarse microorganismos saprofitos sin interés clínico, *A. fumigatus* se asocia con la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Otros hongos con importancia epidemiológica reciente en estos pacientes son *S. apiospermum*, que podrían favorecer un síndrome similar a la ABPA<sup>52</sup>. También *P. jirovecii*, que podría comportarse exclusivamente como colonizador del tracto respiratorio, aunque no se descarta un papel secundario relevante en la respuesta inflamatoria local<sup>60</sup>. Por último, no es infrecuente en los pacientes también multitratados el aislamiento de micobacterias atípicas, sobre todo, *M. avium* o *M. abscessus*, siendo excepcional el aislamiento de *M. tuberculosis*<sup>52</sup>. Debe resaltarse que en la mayoría de los pacientes, hasta el 70%, el patrón de colonización bronquial no siempre es monomicrobiano y pueden coexistir diferentes patógenos. En más del 50% de ellos aparecen simultáneamente *S. aureus* y *P. aeruginosa*, solos o en asociación con *H. influenzae* o *S. pneumoniae*, y pueden existir sobrecolonizaciones con bacilos Gram negativos multirresistentes o patógenos emergentes, siendo difícil establecer los tratamientos antimicrobianos<sup>52</sup>.

### 1.1.7 Clínica

Con la implantación del cribado neonatal cada vez más generalizada, las características clínicas de los enfermos diagnosticados de FQ han cambiado, al igual que las actuaciones del grupo multidisciplinar de control y seguimiento de estos pacientes. No obstante, es de especial relevancia describir la sintomatología clásica de la enfermedad y otros previsible datos clínicos de interés, ya que hay aún muchas zonas en el mundo sin cribado neonatal y también existe la posibilidad de falsos negativos con retraso en el diagnóstico por desconocimiento o inexperiencia.

Desde el punto de vista clínico, esta enfermedad puede cursar con diferentes manifestaciones (Tabla 1.1)<sup>21, 61</sup>.

*Tabla 1.1. Características fenotípicas sugestivas de FQ*

#### **A. Sinupatía o bronconeumopatía crónica manifestada por:**

Colonización/infección persistente por microorganismos encontrados habitualmente en pacientes con FQ: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia*.

Tos y producción de esputo purulento crónicas.

Alteraciones persistentes en radiografía de tórax (bronquiectasias, atelectasias, infiltrados, hiperinsuflación).

Obstrucción de las vías aéreas manifestada por sibilancias y atrapamiento aéreo.

Poliposis nasal o alteraciones de los senos paranasales en radiografía convencional o tomografía computarizada.

Acropaquias.

#### **B. Alteraciones gastrointestinales y nutricionales**

Intestinal: íleo meconial, síndrome de obstrucción intestinal distal, prolapso rectal.

Pancreática: insuficiencia pancreática, pancreatitis aguda recurrente, pancreatitis crónica, alteraciones pancreáticas detectadas por técnicas de imagen.

Hepática: ictericia neonatal prolongada, hepatopatía crónica sugerida por el cuadro clínico o por características histológicas de cirrosis biliar focal o multilobulillar.

Nutricional: retraso de crecimiento (malnutrición proteico-calórica), hipoproteïnemia y edema, complicaciones secundarias a déficit de vitaminas liposolubles.

#### **C. Síndromes pierde-sal: pérdida aguda de sal, alcalosis metabólica crónica**

#### **D. Alteraciones urogenitales en el varón originando azoospermia obstructiva**

La afectación respiratoria, junto con la malabsorción, constituyen el modo clásico de presentación en la edad pediátrica. La edad de comienzo de los síntomas-signos respiratorios es muy variable. Los síntomas-signos digestivos y la deshidratación suelen aparecer en los dos primeros años de vida. La enfermedad pulmonar puede desarrollarse a diferentes edades y algunos autores relacionan las distintas clases de

mutaciones del gen CFTR con afectación respiratoria más o menos grave y una presentación más o menos precoz de los síntomas. Algunos pacientes inician el cuadro clínico en la etapa neonatal o durante la lactancia, mientras que otros pueden permanecer asintomáticos o poco sintomáticos prácticamente hasta la adolescencia o la etapa de jóvenes adultos. También es fácil observar cómo un amplio abanico de niños presenta una patología respiratoria florida en los primeros años de su vida, para posteriormente atravesar un período de latencia más o menos amplio libre de síntomas respiratorios, reapareciendo posteriormente los mismos.

Al nacimiento, o incluso intraútero, la enfermedad se puede presentar con obstrucción intestinal secundaria a íleo meconial o con ictericia, siendo infrecuente la presentación de sintomatología respiratoria en etapa tan temprana de la vida.

Durante la lactancia y en la etapa preescolar las manifestaciones respiratorias pueden comenzar en forma de tos seca, acompañándose a veces de dificultad respiratoria y sibilancias que sugieren el diagnóstico de bronquiolitis que, en muchos casos, se presenta fuera de la estación epidémica y no está producida por el virus sincitial respiratorio.

Estos procesos no responden bien a la terapia habitual, haciéndose persistentes o recurrentes. No podemos olvidar las manifestaciones como bronquitis recurrentes y/o neumonías recurrentes o de lenta resolución o con escasa respuesta al tratamiento empírico habitual de las neumonías adquiridas en la comunidad.

En la etapa escolar y en la adolescencia los pacientes pueden presentar tos blanda, emetizante y episodios de broncoespasmo. Con el paso del tiempo, las manifestaciones respiratorias se van haciendo más llamativas, especialmente cuando

se desarrollan bronquiectasias y aparece tos productiva con esputo amarillento, verdoso y viscoso y se aíslan los microorganismos característicos de esta enfermedad. Algunos pacientes presentan neumonías de repetición acompañadas en muchas ocasiones de signos de hiperinsuflación pulmonar, y otros son etiquetados de asmáticos de mala evolución. Un 25-50% de enfermos con FQ pueden cursar con hiperreactividad bronquial. Las acropaquias pueden aparecer con la progresión de la enfermedad y en relación muchas veces con la gravedad de ésta.

Esta cronología puede verse alterada en los pacientes diagnosticados por cribado neonatal debido a que el diagnóstico y el tratamiento precoz y agresivo enlentece la progresión de la enfermedad. También se va a alterar esta secuencia de síntomas y signos en los enfermos con suficiencia pancreática o en los monosintomáticos, que son aquellos que presentan un solo rasgo distintivo de FQ, como el dolor abdominal secundario al síndrome de obstrucción intestinal distal o a pancreatitis, la patología de la vía aérea superior como la sinusitis crónica y la poliposis nasal, o la presencia de hepatopatía o retraso puberal o del crecimiento. La detección de microorganismos típicos de la enfermedad puede ser fundamental para el diagnóstico en estos casos con FQ atípica o monosintomática. Los pacientes diagnosticados de FQ en la edad adulta pueden tener una sintomatología respiratoria mucho más larvada y más de la mitad de ellos pueden tener una función respiratoria normal.

La evolución clínica puede ser muy variable de un paciente a otro. La gravedad de la enfermedad parece estar genéticamente modulada, en relación a la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la FQ (CFTR) y otros factores genéticos (genes modificadores), e influenciada por factores ambientales, situación

psicosocial del enfermo y asistencia médica prestada. La relación fenotipo-genotipo está bien establecida para la insuficiencia pancreática, pero no para la gravedad de la afectación pulmonar<sup>62, 63</sup>.

### 1.1.8 Diagnóstico

El Consenso de 1998 de la Cystic Fibrosis Foundation (CFF) estableció<sup>61</sup> que el diagnóstico de la FQ se debía basar en la presencia de uno o más de lo siguiente: uno o más rasgos fenotípicos consistentes con FQ, o historia de la enfermedad en hermanos o primos hermanos, o un test de cribado neonatal positivo (elevación de los niveles séricos de tripsinógeno inmunorreactivo), junto con pruebas de laboratorio que indicaran “disfunción del CFTR”, documentada por cualquiera de lo siguiente: concentración de ion cloruro en el sudor elevada, identificación de mutaciones causantes de enfermedad en ambas copias del gen CFTR, o alteraciones características en el transporte iónico a través del epitelio nasal. Los rasgos fenotípicos consistentes con FQ eran cualquiera de los siguientes, solos o en combinación: 1) enfermedad sinopulmonar crónica sugestiva; 2) alteraciones características gastrointestinales y nutricionales; 3) síndromes debidos a las pérdidas excesivas de sal por el sudor; y 4) Agenesia congénita bilateral de vasos deferentes (ACBVD) en los varones. Algunas de las conclusiones del Consenso fueron desde el principio objeto de controversia, por ejemplo, diagnosticar de FQ a un adulto, por otra parte sano, cuyo motivo de consulta es la infertilidad, o - vista la variable relación del genotipo con el fenotipo - los diagnósticos basados en los resultados del cribado neonatal en lactantes sin síntomas característicos de la enfermedad, o bien considerar evidencia clínica suficiente de la enfermedad la presencia de síntomas de vías aéreas superiores únicamente.

En 2001, un grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la European Cystic Fibrosis Society (ECFS)<sup>64</sup> proponen una nueva clasificación para la “fibrosis quística y trastornos relacionados”, para que fueran codificados en la undécima edición de la International Classification of Diseases (ICD -11), publicada por

la OMS. La propuesta se basa en que la clasificación se debe hacer principalmente sobre una base clínica, y no de laboratorio, y recoge las incertidumbres de nuestro conocimiento actual sobre el CFTR y su disfunción, y el juicio de que cuando la afectación clínica se reduce a un solo órgano, por ejemplo, en casos de ACBVD, pancreatitis, o ABPA de manera aislada, es mejor restringir la etiqueta diagnóstica “fibrosis quística”. El documento acordó que bajo el título de “fibrosis quística y trastornos relacionados” figurara un listado con las siguientes entidades -cuyos límites precisos no detalla-:

- Fibrosis Quística clásica con insuficiencia pancreática (IP).
- Fibrosis Quística clásica con suficiencia pancreática (SP).
- Fibrosis Quística atípica.
- Fibrosis Quística especificada de otra forma.
- Fibrosis Quística no especificada de otra forma.
- Azoospermia obstructiva aislada.
- Pancreatitis crónica\*.
- Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)\*.
- Bronquiectasias diseminadas\*.
- Panbronquiolitis difusa\*.
- Colangitis esclerosante\*.
- Hipertripsinemia neonatal\*.

(\* = con al menos una mutación identificada en el gen CFTR).

Los cambios conceptuales respecto a las conclusiones del Consenso de la CFF fueron desarrollados en el Consenso Europeo de 2006<sup>65</sup>, que coloca de nuevo la clínica y la prueba del sudor en el centro del diagnóstico de la FQ; y propone unos algoritmos sobre la metodología diagnóstica a seguir, partiendo del resultado de la prueba del sudor (Figura 1.2) a ser utilizado en todos los casos, salvo en el del cribado neonatal, en el que se propone otro algoritmo, que parte de un resultado positivo en el estudio genético (Figura 1.3).

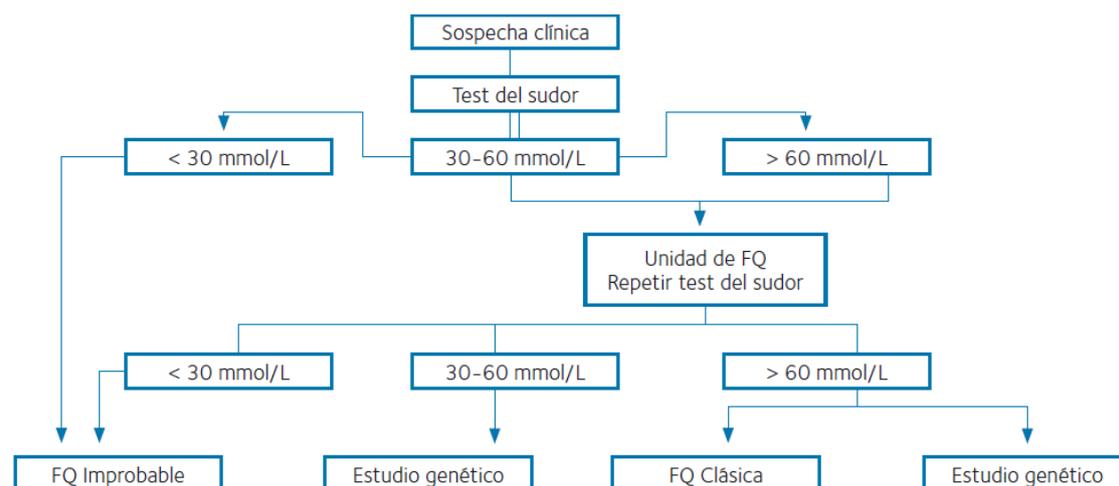


Figura 1.2. Algoritmo diagnóstico partiendo del test del sudor en pacientes con sospecha clínica de fibrosis quística. Consenso Europeo 2006. Modificado de Ref. 21

Las Tablas 1.2 y 1.3 muestran la propuesta del Consenso de 2006 de diagnosticar “fibrosis quística clásica” en presencia de al menos una manifestación fenotípica, junto con una concentración de ion cloruro en el sudor  $\geq 60$  mmol/L, y “fibrosis quística no clásica o atípica” en presencia de un test del sudor “dudoso” (definido por una concentración de ion cloruro en el sudor de 30-60 mmol/L), o incluso “normal” (ion cloruro  $< 30$  mmol/L), junto con la presencia de 2 mutaciones causantes de enfermedad y/o una diferencia del potencial nasal transepitelial (DPNT) alterada.

Tabla 1.2. Criterios diagnósticos de FQ Clásica o Típica (Consenso ECFS 2006)

$\geq 1$ característica fenotípica + Cl sudor $\geq 60$ mmol/L	Enfermedad sinopulmonar crónica Alteraciones digestivas y nutricionales Síndromes pierde-sal Agnesia congénita bilateral de vasos deferentes
Otras características	Generalmente 2 mutaciones identificadas Suficiencia o insuficiencia pancreática Evolución clínica variable

Tabla 1.3. Criterios diagnósticos de FQ no Clásica o Atípica (Consenso ECFS 2006)

<p>≥ 1 característica fenotípica + Cl sudor “dudoso” (30-60 mmol/L) o “normal” (&lt; 30 mmol/L) + 2 mutaciones en el gen identificadas y/o DPNT alterada</p>	
<p>Otras características</p>	<p>Suficiencia pancreática Afectación pulmonar leve Afectación de uno o más órganos</p>

El Consenso de 2006 declara que “para algunos pacientes con FQ no clásica y afectación de un solo órgano, puede ser más apropiado utilizar una etiqueta diagnóstica atenuativa según la propuesta de la clasificación de la OMS de trastornos relacionados con la FQ”.

La Figura 1.2 representa de manera simplificada el primero de los algoritmos diagnósticos que propone el Consenso 2006. Hace notar que existen 3 situaciones en la práctica clínica en la que se puede plantear el diagnóstico de FQ. En primer lugar, la sospecha clínica por los síntomas del paciente, o bien la historia familiar de FQ en un hermano -en ambos casos, se debe utilizar el algoritmo de la Figura 1.2, que parte del resultado del test del sudor-. Finalmente, el diagnóstico se puede suscitar en el contexto del cribado neonatal, en cuyo caso se propone otro algoritmo (Figura 1.3), que partiendo de una elevación de los valores de tripsinógeno inmunorreactivo sérico, continúa con la realización de un estudio genético que, mediante el estudio de un panel de mutaciones, tenga capacidad para la detección de al menos el 80% de los alelos mutantes en la población a la que pertenece el paciente.

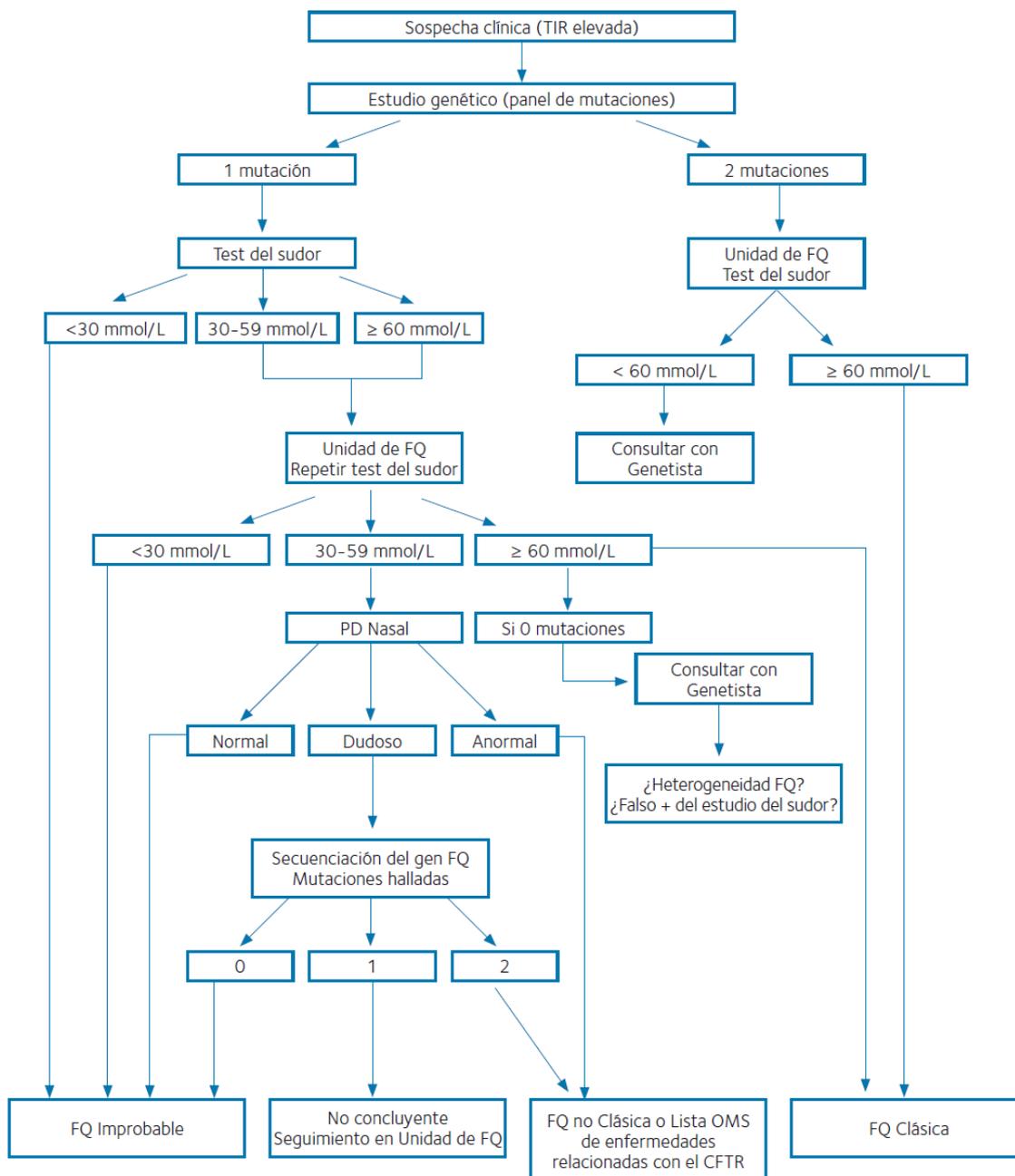


Figura 1.3. Algoritmo diagnóstico partiendo del estudio genético a utilizar en los programas de cribado neonatal de fibrosis quística. Consenso Europeo 2006. Modificado de Ref. 21

Se recalca que ni el estudio genético ni la DPNT tienen la sensibilidad ni la especificidad de la prueba del sudor para el diagnóstico de la FQ, y recuerda que aunque se identifiquen 2 mutaciones, el impacto clínico de muchas de las mutaciones raras es poco conocido, e incluso algunas pueden no ser auténticas mutaciones, y muy

pocas unidades poseen la experiencia suficiente como para otorgar relevancia diagnóstica a las determinaciones de la DPNT de manera aislada. Cuando el test del sudor realizado en la Unidad de FQ confirma que la concentración de ion cloruro es mayor de 60 mmol/L, se efectúa el diagnóstico de FQ clásica, siendo conveniente, aunque no necesario para la confirmación del diagnóstico, la caracterización de las mutaciones del gen CFTR.

El Consenso 2006 considera que las concentraciones de ion cloruro en sudor de 30-59 mmol/L son dudosas y propone someter a todos estos pacientes a un protocolo que sigue con la realización de una prueba genética (estudio de un panel de mutaciones mediante PCR, usando un kit comercial). Si este estudio no detecta ninguna mutación, recomienda considerar diagnósticos alternativos. Si se detectan ambas mutaciones, se puede realizar el diagnóstico de FQ no clásica o atípica, o alternativamente elegir una de las entidades relacionadas con la FQ en la lista de la clasificación OMS. Si la prueba genética detecta una mutación, propone que se realice un rastreo completo de toda la región codificante del gen CFTR y sus regiones intrónicas limítrofes, así como la realización de una DPNT. Con el hallazgo de la segunda mutación o un resultado anormal de la DPNT, se podría diagnosticar FQ atípica o entidad relacionada con la FQ (lista OMS), y un resultado negativo de ambos estudios haría replantearse el diagnóstico. El Consenso de la CFF de 2008<sup>21</sup>, señala que el límite de 30 mmol/L es apropiado para lactantes (especialmente en los de menos de 6 meses), pero en el resto de la población infantil es aconsejable elevar el límite normal de la concentración de ion cloruro en el sudor hasta los 39 mmol/L, lo que concuerda con la opinión de los autores.

Otra aportación del Consenso 2006 es que divide las posibles manifestaciones clínicas de la enfermedad entre “altamente sugestivas” y “menos específicas”. Entre las manifestaciones digestivas y nutricionales considera altamente sugestivas el íleo meconial y la insuficiencia pancreática exocrina en niños; y menos específicas, el retraso en el desarrollo pondero-estatural, la hipoproteinemia, anemia, edemas, la deficiencia de vitaminas liposolubles, el síndrome de obstrucción intestinal distal, prolapso rectal, cirrosis biliar, hipertensión portal, colelitiasis en niños, insuficiencia pancreática exocrina en adultos y pancreatitis recurrente. Entre las manifestaciones sinopulmonares son altamente sugestivas la infección bronquial persistente con *P. aeruginosa* mucóide, la infección bronquial persistente con el complejo *B. cepacia* y los pólipos nasales en niños; y son menos específicas la infección bronquial persistente con *S. aureus*, *P. aeruginosa* no mucóide, *A. xylooxidans*, o *H. influenzae*, los cambios radiológicos de bronquiectasias, infiltrados, atelectasias, hiperinsuflación, hemoptisis asociada a enfermedad pulmonar difusa, tos productiva crónica, ABPA, pólipos nasales en el adulto y pansinusitis crónica. Otras manifestaciones altamente sugestivas son la alcalosis hipoclorémica en ausencia de vómitos y la ACBVD; y menos específicas, las acropaquias, osteopenia-osteoporosis en pacientes menores de 40 años y lo que denominan “diabetes atípica”.

## 1.2 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO CON FUNCIÓN PULMONAR

### 1.2.1 Correlación genotipo-fenotipo

Desde el descubrimiento del gen causante de la FQ en 1989<sup>17</sup>, ha existido un gran interés por determinar la influencia del genotipo CFTR sobre el fenotipo, pues ya anteriormente se habían observado diferencias clínicas entre pacientes afectados de esta patología y se sabía que algunas de ellas estaban determinadas genéticamente. En la actualidad hay descritas más de 2000 mutaciones en CFTR<sup>33</sup> que afectan de distinta forma a la estructura y la funcionalidad de la proteína, como ya comentamos anteriormente, reduciendo o incluso impidiendo el transporte de electrolitos a través de la membrana de las células epiteliales de los tejidos en los que se expresa este gen, principalmente en pulmón, páncreas, intestino, glándula sudorípara y conductos deferentes del testículo.

La FQ, al ser una enfermedad autosómica recesiva, requiere de mutaciones en ambos alelos, por lo que el tipo y grado de disfunción molecular de las mutaciones son determinantes para establecer el fenotipo, fruto de la interacción compleja entre el genotipo CFTR, la influencia de genes modificadores, la relación entre el canal de ion cloruro CFTR y otros canales iónicos y la expresión de CFTR en diferentes tejidos, además de la exposición a diferentes agentes ambientales.

En el estudio del Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium<sup>66</sup> se compararon las características clínicas de 399 pacientes con FQ en 32 centros participantes en el Consorcio de 14 países. En base a los resultados, se propuso denominar a las mutaciones como “graves” o “leves” de acuerdo con su asociación con

el desarrollo de insuficiencia pancreática y que el genotipo podía tener valor pronóstico al poder predecir el estatus pancreático; pero no podía predecir el fenotipo pulmonar. Se estipuló que un alelo “leve” (asociado a suficiencia pancreática) podría dominar sobre un alelo “grave” (asociado a insuficiencia pancreática), de tal manera que era necesaria la asociación de dos alelos “graves” para el desarrollo de insuficiencia pancreática y que éste era uno de los determinantes más importantes en el fenotipo pulmonar, que a su vez iba a depender de factores ambientales y de factores genéticos no relacionados con el CFTR. Sin embargo, en un estudio<sup>67</sup> realizado por nuestro grupo se pudo poner de manifiesto que el factor predictivo más importante del fenotipo pulmonar era el genético y que éste era incluso independiente de la presencia o ausencia de insuficiencia pancreática. Así, mutaciones de la Clase I y II se relacionaron con formas graves de la enfermedad; mientras que mutaciones, fundamentalmente, de las clases IV y V se acompañaban de fenotipos más leves de la enfermedad.

### 1.2.2 Pruebas de función respiratoria

Los pacientes con FQ nacen con pulmones aparentemente normales y el deterioro progresivo en la función pulmonar es la causa de la muerte en el 95% de los casos, por lo que la enfermedad pulmonar representa el principal factor pronóstico en estos pacientes.

Uno de los hallazgos más precoces de afectación pulmonar es la hiperinsuflación pulmonar con incremento del volumen residual y disminución de la capacidad vital. El incremento de la relación volumen residual (RV)/capacidad pulmonar total (TLC) es

muy sensible a los primeros cambios, mientras que la resistencia de la vías aéreas es un parámetro que no se afecta inicialmente debido a que las vías aéreas pequeñas suponen una gran superficie y, por lo tanto, su influencia sobre la resistencias de las vías aéreas es relativamente baja. El índice RV/TLC se ha correlacionado con la gravedad de la enfermedad en diversos estudios. Otra prueba que se altera muy inicialmente en la FQ es el flujo medio entre el 25% y el 75% de la capacidad vital forzada (MEFV o FEF25-75). Esta prueba está alterada incluso antes de que se afecten otras pruebas de función pulmonar, como el volumen espiratorio forzado al primer segundo (FEV1). Sin embargo, la gran variabilidad interindividual de esta prueba hace que sea poco útil en los estudios transversales.<sup>68</sup> También hay que tener en cuenta que el estudio de los flujos a volúmenes bajos solo es útil en pacientes con enfermedad leve en ausencia de hiperinsuflación importante, porque cuando hay obstrucción importante los flujos se miden a volúmenes mayores y dan valores falsamente elevados.

A pesar de los esfuerzos para encontrar técnicas de función pulmonar más sensibles para detectar enfermedad de pequeñas vías aéreas, la espirometría forzada sigue siendo la prueba más útil de las que disponemos. La prueba considerada “patrón oro” en la FQ es la medida del FEV1 por ser la más útil para evaluar la progresión de la enfermedad. Estudios longitudinales con grandes bases de datos han mostrado que el curso natural de la enfermedad conlleva una pérdida anual de FEV1 de alrededor del 2-4% dependiendo de la función basal, los pacientes con mejores niveles basales de función pulmonar son los que sufren una pérdida mayor de FEV1.<sup>69</sup> El FEV1 es también el mejor predictor individual de supervivencia y se utiliza para seleccionar candidatos a trasplante pulmonar. La pérdida de volumen pulmonar que se produce en los

pacientes con FQ debido a la destrucción tisular junto con la hiperinsuflación hacen que baje la capacidad vital forzada (FVC), lo que hace que el índice FEV1/FVC no sea una prueba útil en FQ, pudiendo ser normal incluso en pacientes con enfermedad grave.<sup>70</sup> Existe un pequeño grupo de pacientes con FQ que desarrolla una enfermedad pulmonar restrictiva primaria por razones no completamente entendidas.<sup>71</sup>

### 1.2.3 Resultados

En el estudio<sup>67</sup> llevado a cabo por nuestro grupo se incluyeron un total de 74 pacientes (40 hombres y 34 mujeres) con diagnóstico de FQ por la detección de 2 mutaciones del gen CFTR, con una edad media de 26.7 años. Fueron agrupados en función de la clase funcional de sus mutaciones en ambos cromosomas, considerando como graves aquellos con dos mutaciones de clase I ó II y como leves aquellos en los que una de las mutaciones era de clase III, IV ó V. No se hallaron diferencias significativas en los valores de FVC y FEV1 entre los pacientes con genotipos I-II/III, I-II/IV y I-II/V, pero estos valores fueron significativamente más elevados que en los pacientes con genotipos I-II/I-II (Figura 1.4).

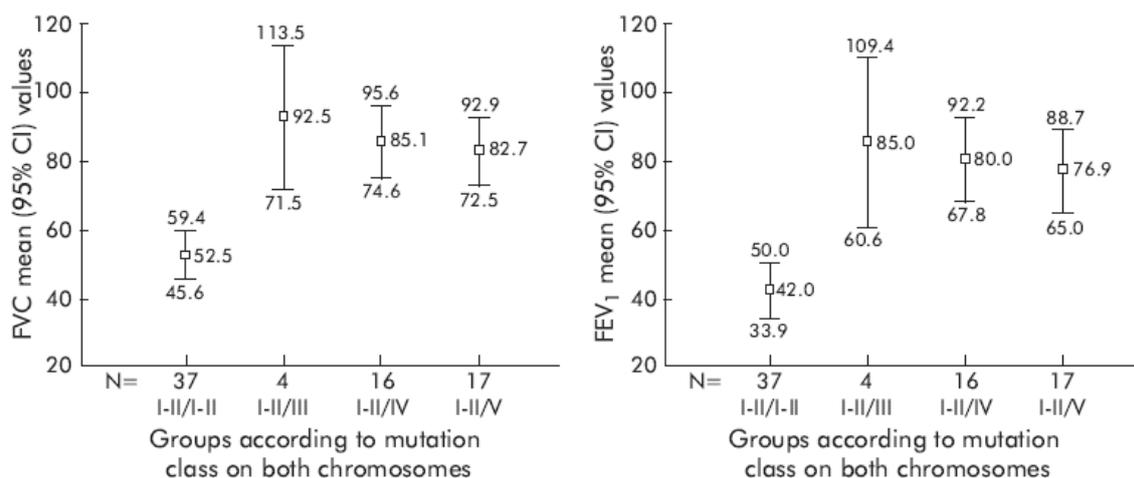


Figura 1.4. Análisis comparativo de los valores espirométricos medidos usando ANOVA. La media (IC 95%) de los valores de FVC y FEV<sub>1</sub> fueron mayores en pacientes con al menos una mutación CFTR de clase III, IV ó V

La evolución de la enfermedad pulmonar fue significativamente diferente en función de si el genotipo era grave o leve. Los pacientes con genotipos graves tenían valores basales de FVC y FEV<sub>1</sub> más bajos y presentaron un deterioro más significativo de su función pulmonar durante el tiempo de seguimiento del estudio. Estas diferencias persistieron aun ajustando los datos por la edad de diagnóstico y por tiempo de seguimiento (Figura 1.5).

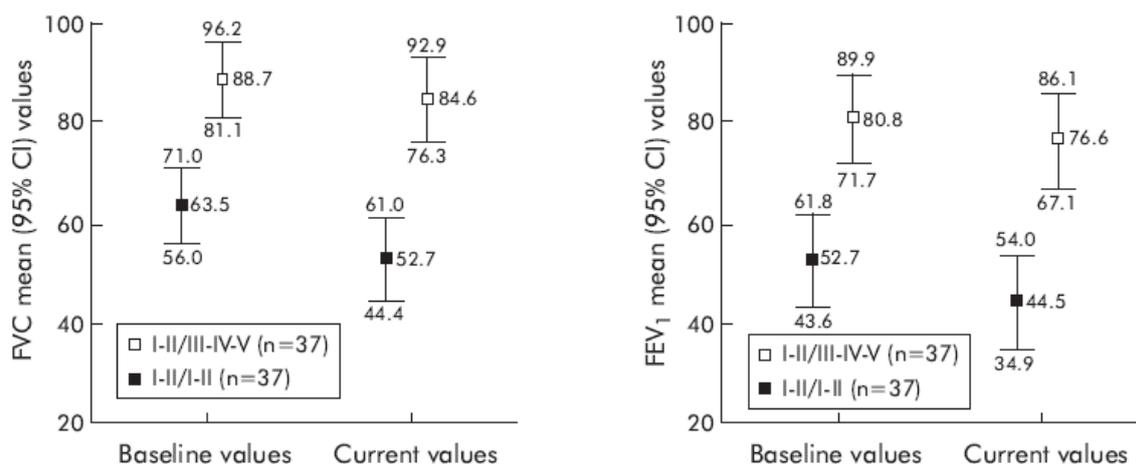
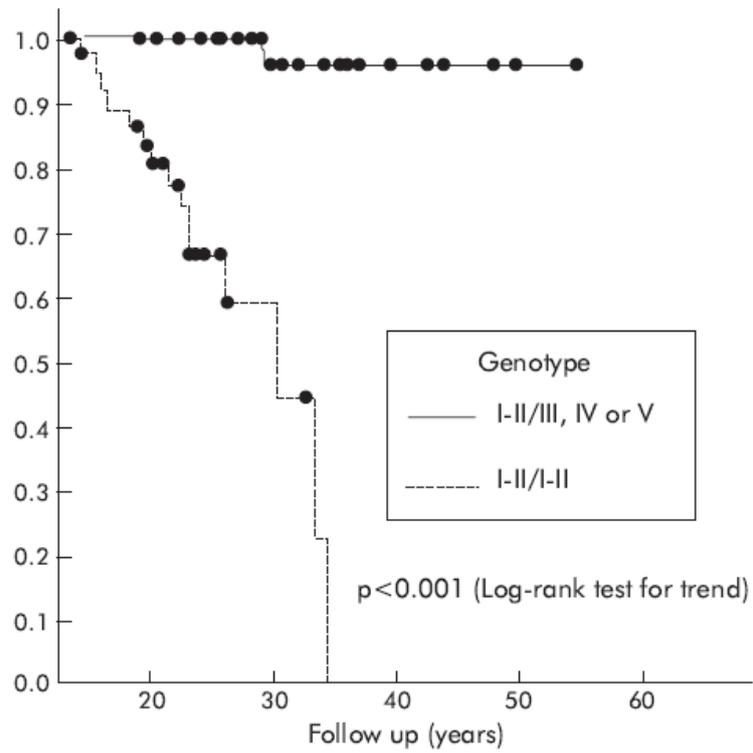


Figura 1.5. Evolución de la enfermedad pulmonar durante el seguimiento en la unidad de FQ, ajustado por edad de diagnóstico y tiempo de evolución, usando ANOVA. La progresión del daño pulmonar fue significativamente mayor en pacientes con mutaciones CFTR de clase I

Asimismo, se llevó a cabo un estudio de supervivencia y se observó que la probabilidad de llegar a la fase terminal de la enfermedad pulmonar fue significativamente mayor en pacientes con genotipos graves (Figura 1.6). El estudio de correlación reveló una relación significativa entre el par de mutaciones y la gravedad de la enfermedad pulmonar, que era mayor en los pacientes con genotipos graves.

En conclusión, los resultados de este estudio muestran que el genotipo, basado en la clase funcional de las mutaciones en los 2 cromosomas, parece ser uno de los factores más decisivos para el fenotipo pulmonar y para la supervivencia relacionada con el daño pulmonar. Los pacientes con genotipos graves presentan un más rápido deterioro de su función pulmonar y peores ratios de supervivencia relacionados con la enfermedad pulmonar que aquellos con otros genotipos, especialmente si una de las mutaciones es de clase IV ó V.



Events	I-II/I-II	I-II/III-V
Lung transplant	9	1
Dead	6	0

Figura 1.6. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier por genotipo

## 1.3 CAPACIDAD DE ESFUERZO Y FIBROSIS QUÍSTICA

### 1.3.1 Antecedentes

Como ya se ha comentado anteriormente, la eficacia en el tratamiento de los pacientes con FQ, aplicando protocolos estandarizados, ha conseguido mejorar el pronóstico y las expectativas de vida de estos pacientes. Ello ha hecho posible que muchos pacientes alcancen la adolescencia y edad adulta y puedan incorporarse al ámbito universitario y laboral. Uno de los problemas con los que deben enfrentarse los pacientes en su quehacer diario es la disfunción en su capacidad de esfuerzo, lo cual condiciona su posible incorporación o no a una vida laboral y/o universitaria y determina en gran medida la calidad de vida de estos pacientes. Estudios previos con pruebas de esfuerzo,<sup>72, 73, 74, 75</sup> realizados en la mayoría de los casos en poblaciones infantiles de pacientes con FQ, apuntan que, a excepción de los que tienen una afectación funcional pulmonar grave, en los que su capacidad de esfuerzo se ve limitada por el factor ventilatorio, en los pacientes con afectación funcional pulmonar leve o moderada existe una gran variabilidad en la capacidad de esfuerzo y que la causa más determinante de ello parece ser la alteración muscular periférica, independientemente del estado nutricional y de la función pulmonar.<sup>75</sup>

Estos datos contrastan en parte con los patrones observados asociados a otras patologías pulmonares crónicas, como los pacientes con EPOC. En estos pacientes, si bien la limitación al ejercicio es compleja y multifactorial, el descenso de la capacidad ventilatoria y, en menor medida, la disfunción de la musculatura periférica, serían los factores condicionantes más importantes.<sup>76</sup> La disfunción de la musculatura periférica que presentan los pacientes con EPOC se ha relacionado con<sup>77</sup>: a) una disminución de

la capacidad generadora de fuerza, debida a la pérdida de proteínas secundaria a factores tales como la hipoxemia, la hipercapnia, los corticoides y la malnutrición, factores todos ellos que no están presentes en los pacientes afectos de FQ con alteración leve o moderada de la función pulmonar; y b) una desregulación del metabolismo energético cuyas causas no son todavía conocidas. No obstante, se han visto, en biopsias musculares de pacientes con EPOC, alteraciones estructurales que también podrían estar presentes en los pacientes con FQ y que incluyen disminución en la proporción de fibras musculares tipo I, reducción en los niveles de mioglobina y un menor número de capilares por unidad de superficie, todos ellos dando lugar a una reducción en la entrega de oxígeno hacia los músculos esqueléticos. Todos estos hallazgos han hecho postular a algunos autores<sup>78</sup> que la disfunción de la musculatura periférica podría ser un factor determinante más importante de lo que hasta la fecha se ha reconocido en la limitación de la capacidad de esfuerzo en pacientes con EPOC. Sin embargo, estudios recientes<sup>76</sup> sugieren que la reserva metabólica de la musculatura periférica es similar a la de las personas normales y que el “whole body exercise” no está limitado por la musculatura periférica.

Los mecanismos patogénicos por los que pacientes con FQ, con alteración pulmonar leve o moderada, presentan una disfunción de la musculatura periférica, son desconocidos y muy probablemente diferentes, al menos en gran parte, a los que se han podido observar en pacientes con EPOC. Si se comparan sujetos sanos con pacientes adultos con FQ, todos ellos con un nivel de ejercicio físico similar, se obtienen valores de función y fuerza muscular similares en ambos grupos, sin diferencias significativas.<sup>79</sup> Asimismo, pacientes con FQ sometidos a programas de entrenamiento físico mejoran considerablemente su capacidad de esfuerzo de manera

similar a la que se podría observar en algunas miopatías como la mitocondrial.<sup>80</sup> Investigaciones recientes, realizadas en población infantil afecta de FQ, han observado que en estos pacientes parece existir una alteración en la actividad y la cinética de los enzimas respiratorios y un gasto energético incrementado.<sup>81</sup> Más recientemente, se ha observado que la capacidad de trabajo oxidativo del músculo esquelético estaría reducido en los pacientes con FQ en relación con cambios fisiopatológicos secundarios a este nivel.<sup>82</sup> Todo ello apunta a la necesidad de realizar nuevos estudios sobre la función mitocondrial en el músculo de los pacientes con FQ para determinar la causa del decremento de dicha función, que podría ser debida a una menor densidad mitocondrial o a alteraciones en su metabolismo.

Por otra parte, al ser la FQ una enfermedad genética de cuyo gen se han descrito más de 2000 mutaciones diferentes, podrían existir determinantes genéticos que influyeran en la capacidad de esfuerzo de estos pacientes. El único estudio<sup>83</sup> realizado en pacientes con FQ relacionando ambos aspectos, mostró que aquellos que tenían un genotipo formado por dos mutaciones de clase I ó II tenían una capacidad de esfuerzo (medida como pico de capacidad aeróbica) menor que aquellos pacientes con un genotipo que incluyera al menos una mutación clase IV ó V y que ello era independiente de la función pulmonar de los pacientes. No obstante, este estudio fue realizado en una población infantil y sería conveniente corroborar estos hallazgos, evaluando su progresión en el tiempo, con una población más homogénea y de mayor tiempo de evolución, como son los pacientes adultos con FQ.

### 1.3.2 Correlación de la función pulmonar y el genotipo con la capacidad de esfuerzo

Bajo la hipótesis de que en pacientes con FQ pueda existir una alteración en la tolerancia al ejercicio no relacionada con la afectación pulmonar, realizamos un estudio prospectivo, transversal, observacional y comparativo en el que incluimos a un total de 50 pacientes adultos con FQ. Fueron clasificados en 4 grupos en función del grado de obstrucción que presentaban en las pruebas de función pulmonar: normal ( $FEV1 \geq 80\%$ ); leve ( $70\% \leq FEV1 < 80\%$ ); moderada ( $50\% \leq FEV1 < 70\%$ ); grave ( $FEV1 < 50\%$ ). Asimismo, fueron también distribuidos en dos grupos en función de las clases funcionales de las mutaciones que presentaban. En el grupo A incluimos aquellos con clases funcionales I-II/I-II, que dan lugar a fenotipos más graves, mientras que en el grupo B incluimos aquellos con clases funcionales más leves (I-II/III, I-II/IV y I-II/V). A todos ellos se les realizó una ergometría para evaluar su capacidad de esfuerzo y determinar, en el caso de que estuviera disminuida, su causa.

La función pulmonar fue normal en 22 (44%) pacientes, 12 (24%) presentaban una obstrucción leve, 11 (22%) una obstrucción moderada y 5 (10%) tenían una obstrucción grave al flujo aéreo. Todos realizaron un esfuerzo máximo, presentando un cociente respiratorio (RER) alto al final del ejercicio y niveles de lactatos altos a los 2 minutos de finalizar el mismo. El consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) estaba disminuido en todos los pacientes con obstrucción moderada o grave y sólo fue normal en 1 de los 12 (8%) pacientes con obstrucción leve y en la mitad de los que tenían unas pruebas de función pulmonar normales. Además, el umbral anaeróbico estaba disminuido en el 78% de los pacientes, incluyendo el 58% de los que tenían una función pulmonar normal.

Los pacientes con una espirometría gravemente disminuida tenían una capacidad de esfuerzo más baja y su limitación primaria fue ventilatoria en el 91% de los casos, sin poderse descartar otras causas concomitantes. Sin embargo, el 76% de los pacientes con función pulmonar normal o con una alteración leve también tenían disminuida su capacidad de esfuerzo y su causa primaria fue por un estado de decondición y/o alteración periférica.

No hubo diferencias significativas en los porcentajes de los valores de referencia de FEV1 y FVC entre los pacientes del grupo B (genotipos I-II/III-IV-V) pero estos valores fueron significativamente mayores que los observados en los pacientes del grupo A (genotipos I-II/I-II). Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en la capacidad de esfuerzo, que estaba disminuida en aproximadamente el 80% de los pacientes en ambos grupos.

Hay que destacar que este estudio fue realizado sobre una población adulta de pacientes con FQ, lo que conlleva un mayor tiempo de evolución de la enfermedad y nos permite estudiar pacientes con genotipo formado por mutaciones más leves, que suelen acompañarse de un fenotipo pulmonar menos grave que retrasa el diagnóstico hasta la edad adulta. Esto hizo posible la realización de un estudio de correlación de la capacidad de esfuerzo y la función pulmonar tanto en los pacientes con genotipos graves como en aquellos con genotipos más leves y ver las diferencias entre ellos. El hecho de que la capacidad de esfuerzo esté disminuida en ambos grupos apoya la hipótesis de la existencia de otro u otros factores que la condicionan, siendo en nuestro estudio, de forma similar a lo ocurrido en otros, la alteración muscular periférica el más importante tras la limitación funcional pulmonar. El conocimiento

exacto de la causa de esta limitación y de los mecanismos patogénicos que llevan a la misma conduciría al desarrollo de programas de tratamiento precoz que permitirían ofrecerles una mayor calidad de vida.

Por todo ello, y dado que ha sido descrita en la literatura una alteración mitocondrial en cultivos de células no musculares de pacientes con FQ,<sup>81</sup> siendo la mitocondria fundamental para el desarrollo de la función muscular, nos propusimos estudiar estas alteraciones a nivel del músculo esquelético de estos pacientes para determinar la causa de su intolerancia al ejercicio, correlacionándolas a su vez con el genotipo.



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

### 2.1 HIPÓTESIS

- 1- En los pacientes con FQ no limitados por un trastorno ventilatorio grave, su intolerancia al ejercicio está relacionada con cambios en la estructura y/o función del músculo esquelético debidos a una disfunción mitocondrial.
- 2- Existen diferencias en el tipo y/o grado de alteración del músculo esquelético de los pacientes con FQ en función de su genotipo.

### 2.2 OBJETIVOS

- 1- Investigar el grado y tipos de afectación del músculo esquelético en pacientes con FQ.
- 2- Determinar la relación existente entre el tipo y/o grado de afectación del músculo esquelético, a nivel histológico y de funcionalismo de la cadena respiratoria mitocondrial, y el genotipo de FQ.



## 3. MÉTODOS

---

### 3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo, observacional, transversal y comparativo.

### 3.2 PACIENTES

Se incluyeron 44 pacientes afectos de Fibrosis Quística controlados en una Unidad de Adultos.

Criterios de Inclusión.-

- Pacientes mayores de 16 años con diagnóstico de Fibrosis Quística confirmado por dos pruebas de sudor (concentración de ion cloruro  $\geq 60$  mEq/L) y la detección de dos mutaciones aceptadas como patogénicas en las librerías genéticas internacionales del gen de la FQ.

Criterios de Exclusión.-

- Pacientes que no aceptaron participar en el estudio.
- Pacientes que no dieron consentimiento para la realización de biopsia muscular.
- Pacientes con una contraindicación absoluta o relativa para la realización de una prueba de esfuerzo (cardiopatía no controlada, asma no controlada, insuficiencia respiratoria, entre otras).

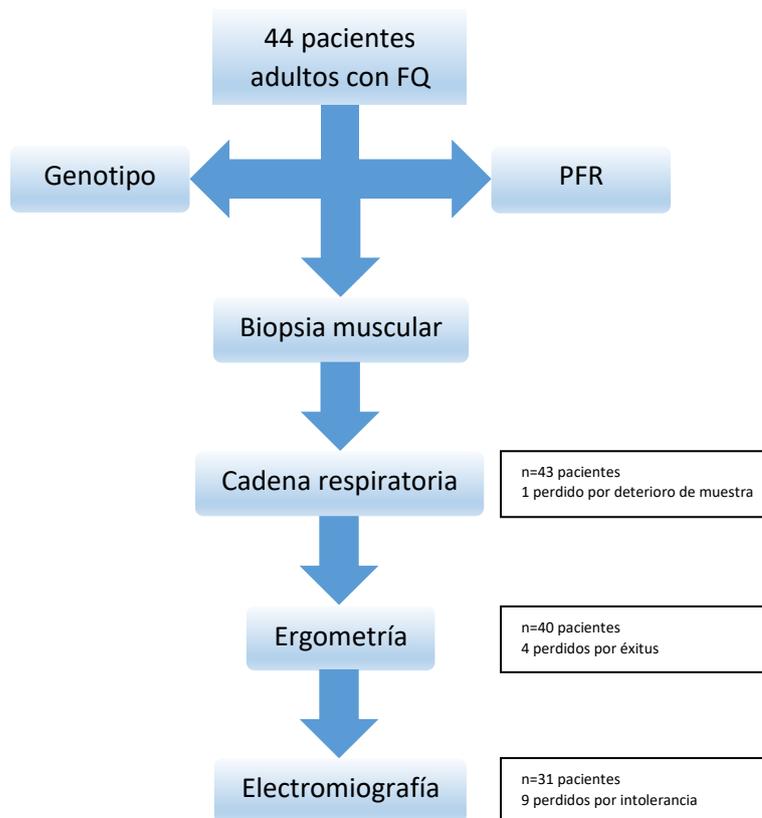


Figura 3.1. Pacientes incluidos en el estudio

### 3.3 VARIABLES DEL ESTUDIO

Se realizó una hoja de captura de datos de cada uno de los pacientes a estudiar en la cual se incluirán, además de datos demográficos, características clínicas de su enfermedad, tiempo de diagnóstico, características bacteriológicas de las secreciones respiratorias, pruebas del sudor, perfil bioquímico básico con parámetros nutricionales, estudio genético y estudios de función pulmonar (rutinarios cada 6 meses).

A todos los sujetos del estudio se les realizó una ergometría respiratoria, un examen neuromuscular y biopsia muscular con estudio histológico y de la cadena respiratoria, así como determinación plasmática de enzimas musculares y electromiografía (EMG), con el fin de investigar el tipo y grado de afectación del músculo esquelético que pudieran presentar. Su nivel de actividad física fue evaluado mediante la versión larga en español del International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), en formato auto administrado<sup>84</sup>.

Los pacientes fueron clasificados en función del grado de obstrucción que presentaban en las pruebas de función pulmonar: normal ( $FEV1 \geq 80\%$ ); leve ( $70\% \leq FEV1 < 80\%$ ); moderada ( $50\% \leq FEV1 < 70\%$ ); grave ( $FEV1 < 50\%$ ). Secundariamente, fueron agrupados en 2 grupos, quedando en un grupo los que no tenían obstrucción o ésta era leve, y en otro grupo los que tenían obstrucción moderada o grave. Asimismo, fueron también agrupados en 2 grupos en función de las clases funcionales de las mutaciones que presentaban, de acuerdo a la posición molecular de CFTR en la superficie de la célula epitelial y al tipo de disfunción molecular de la proteína CFTR (I-II/I-II, I-II/III, I-II/IV, I-II/V y I-II/III-V). En un grupo incluimos aquellos con clases funcionales I-II/I-II, que dan lugar a fenotipos más graves, mientras que en el otro grupo incluimos aquellos con clases funcionales más leves (I-II/III, I-II/IV y I-II/V). De esta forma, para evaluar la relación entre las clases de mutación en ambos cromosomas con la función pulmonar y la capacidad de esfuerzo, se compararon los valores de FVC y FEV1 y los parámetros ergométricos entre los diferentes grupos. Por otro lado, con el objetivo de establecer una relación entre el tipo y/o grado de afectación de la musculatura periférica, a nivel histológico y de funcionalismo de la

cadena respiratoria mitocondrial, y el genotipo, se hizo también un estudio de correlación con estos datos.

### 3.4 ERGOMETRÍA RESPIRATORIA

Se utilizó una bicicleta Ergometrics 800 (Ergoline GmbH. Germany), transductor de flujo aéreo (Neumotac de Pitot), analizador de gases de oxígeno (O<sub>2</sub>) y de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), electrocardiógrafo de 12 derivaciones, esfigomanómetro y pulsioxímetro.

La prueba se realizó según el siguiente protocolo: 1) mínimo de 3 minutos de reposo hasta conseguir la estabilidad de los parámetros que se registran; 2) pedaleo sin carga durante 3 minutos; 3) carga incremental a razón de 10 a 30 W por minuto, manteniendo una velocidad de pedaleo de 60-70 revoluciones por minuto, hasta que el paciente pare la prueba por incapacidad de mantener la carga o se finalice por motivos médicos; y 4) recuperación sin carga durante 3 minutos.

Valores de referencia.-

Se utilizaron los valores de las tablas de Wasserman<sup>85</sup> para los parámetros de intercambio gaseoso pulmonar, que se adaptan a la población estudiada, y los de la European Coal and Steel Community (ECSC)<sup>86</sup> para los parámetros espirométricos.

VARIABLES DE ESTUDIO.-

Consumo de  $O_2$  ( $VO_2$ ); carga (W); relación entre  $VO_2$  y la carga ( $\Delta VO_2/\Delta WR$ ); frecuencia cardíaca (HR); reserva de HR (HRR); tensión arterial (TA); pulso de oxígeno ( $VO_2/HR$ ); frecuencia respiratoria (FR); reserva ventilatoria;  $V_t/IC$ ; pendiente del equivalente ventilatorio para el  $CO_2$  ( $VE/VCO_2$ ); ventilación máxima ( $VE_{m\acute{a}x}$ ); equivalente ventilatorio para el  $O_2$  ( $VE/VO_2$ ); equivalente ventilatorio para el  $CO_2$  ( $VE/VCO_2$ );  $PCO_2$  al final del volumen corriente ( $PETCO_2$ ); razón de espacio muerto fisiológico con el volumen corriente ( $VD/VT$ ); saturación de  $O_2$  ( $SatO_2$ ); cociente respiratorio (RER); niveles de lactato a los 2 minutos del inicio de la recuperación; y umbral anaeróbico (AT).

Los pacientes en los que se objetivó una disminución de su capacidad de esfuerzo en la ergometría respiratoria fueron divididos en 2 grupos en función del patrón de limitación que presentaron:

1. Patrón ventilatorio: agotan la reserva respiratoria y finalizan la prueba por disnea.
2. Patrón periférico/mixto: agotan la reserva cardíaca pero no la respiratoria; HR con pendiente desviada a la izquierda; pulso de oxígeno disminuido o menos frecuentemente normal con pendiente habitualmente desviada a la derecha; RER normal con patrón irregular; AT habitualmente disminuido; finalizan la prueba por fatiga de piernas.

### 3.5 EXAMEN NEUROMUSCULAR

El estudio de la fuerza muscular se realizó en todos los pacientes mediante las siguientes exploraciones:

1. Balance muscular manual (MMT)<sup>87</sup> cuantificado utilizando la Escala del Medical Research Council<sup>88</sup> de los siguientes grupos musculares: deltoides, pectorales, bíceps braquial, tríceps, extensores/flexores de muñeca, extensores/flexores de los dedos de las manos, interóseos, eminencia tenar, eminencia hipotenar, psoas, adductores y abductores del muslo, cuádriceps, glúteos, bíceps crural, tibial anterior, tríceps sural, flexor de los dedos del pie, EPDG y peroneos (derecho e izquierdo). También se estudiaron con este método tres músculos axiales: paravertebrales, extensores y flexores del cuello.

2. Contracción isométrica voluntaria máxima (MVIC): se utilizó el QMA-SYSTEM para cuantificar la fuerza en los músculos mayores, el dinamómetro de mano Jamar para medir la fuerza del puño y el dinamómetro pinch de Jamar (Lafayette, IN 47903 USA) para cuantificar la fuerza de la pinza de la mano.

### 3.6 BIOPSIA MUSCULAR

Se realizó mediante técnica a cielo abierto, obteniéndose 2 muestras de tejido muscular. Una de las muestras se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para estudio de la cadena respiratoria. La muestra restante se depositó en una gasa humedecida en un recipiente hermético y se trasladó al laboratorio (< 2 horas) en una caja de porexpan con hielo picado. En el laboratorio se

orientó el tejido y se practicaron bloques de 8-10mm de longitud por 4mm de diámetro aproximadamente y se procedió a su congelación sumergiendo el bloque con el espécimen en isopentano enfriado hasta  $-160^{\circ}\text{C}$  con nitrógeno líquido durante 5 segundos. Una parte del tejido congelado se conservó de  $-20$  a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos; y otra parte se almacenó en congelador ( $-70^{\circ}\text{C}$  a  $-90^{\circ}\text{C}$ ) para posibles estudios posteriores bioquímicos y genéticos. Asimismo, de la muestra muscular en el momento de su recepción, se tomó un mínimo fragmento para posible estudio posterior ultraestructural, previa fijación en glutaraldehído.

#### Técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.-

1. Técnicas histoquímicas para el estudio rutinario de estructuras de la fibra muscular (Hematoxilina-Eosina; Tricrómico modificado de Gomori; Ácido periódico de Schiff (PAS); Oil-red O (ORO); y Rojo de Alizerina).

2. Técnicas histoquímicas enzimáticas, con enzimas oxidativos, para el estudio de mitocondrias (NADH; SDH (Succino deshidrogenasa); COX (Citocromo C oxidasa); y Menadiona-alfa-Glicerofosfato-Deshidrogenasa).

3. Técnicas histoquímicas enzimáticas, con hidrolasas, para el estudio de miofibrillas, con identificación de tipos de fibras (ATPasa Miosínica (Adenosin trifosfatasa) a los siguientes ph = 9, 4, 4.6 y 4.3).

4. Técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos (Ubicuitina, para los proteosomas (estructura celular);  $\alpha$ -Laminina, para la lámina basal (vasos);

---

Mioglobina, para el citosol (estructura celular); y Desmina, para la membrana plasmática).

Los resultados se cuantificaron por método semicuantitativo con microscopio óptico y se compararon con las descripciones de análisis cuantitativo de biopsias musculares realizadas a voluntarios sanos por Sandstedt y colaboradores<sup>89</sup>. Se tuvieron en cuenta los siguientes hallazgos:

- Núcleos internos: se consideró como fuera del rango normal la presencia de más de 3 por campo.
- Fibras atróficas: se consideró como anormal la presencia de más de 4 por campo.
- Fibras hipertróficas: se consideró como anormal la presencia de más de 4 por campo.
- Tipo de fibras: se consideró como anormal la presencia de una área de fibras tipo II tres veces superior a la del área de fibras tipo I.
- Agrupación de fibras: su presencia se consideró patológica.
- Fibras en anillo: su presencia se consideró patológica.
- Irregularidad en el patrón de enzimas oxidativos: su presencia se consideró patológica.
- Infiltración adiposa: su presencia se consideró patológica.
- Ragged Red Fibers (RRF): su presencia se consideró patológica, siendo esto sugestivo de patología mitocondrial en individuos menores de 65 años.
- Infiltrado inflamatorio: su presencia se consideró patológica.

### 3.7 ESTUDIO DE LA CADENA RESPIRATORIA. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS)

La cadena respiratoria (Figura 3.2) está constituida por cinco complejos enzimáticos multiheteroméricos, localizados en la membrana interna mitocondrial, y dos moléculas que actúan como nexos de unión (la coenzima Q y el citocromo C). Los tres primeros complejos (complejo I, II, III) actúan como transportadores electrónicos. El complejo IV utiliza los electrones que recibe para reducir el O<sub>2</sub> a agua (H<sub>2</sub>O). El complejo V es la ATP sintasa, encargada de la síntesis de ATP. Además, para el perfecto funcionamiento del sistema son necesarios tres enzimas más: la dihidroorotato CoQ oxidorreductasa (DHO-CoQO), la flavoproteína transportadora de electrones CoQ oxidorreductasa (ETF-CoQO) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), encargado de exportar al exterior el ATP sintetizado, a la vez que introduce en la matriz el ADP y el Pi.

La actividad de los enzimas mitocondriales se determinaron en homogenados de las muestras musculares en tampón de homogeneización según métodos espectrofotométricos previamente descritos<sup>90, 91, 92, 93, 94</sup> (actividad Complejos I +III (EC 1.6.2.1); actividad Complejos II +III; actividad Complejo II (SQ y SP); actividad Complejo III (Citocromo C- coenzima Q oxidoreductasa); actividad Complejo IV (Citocromo C oxidasa (EC 1.9.3.1)); actividad Citrato sintasa (EC 4.1.3.7).

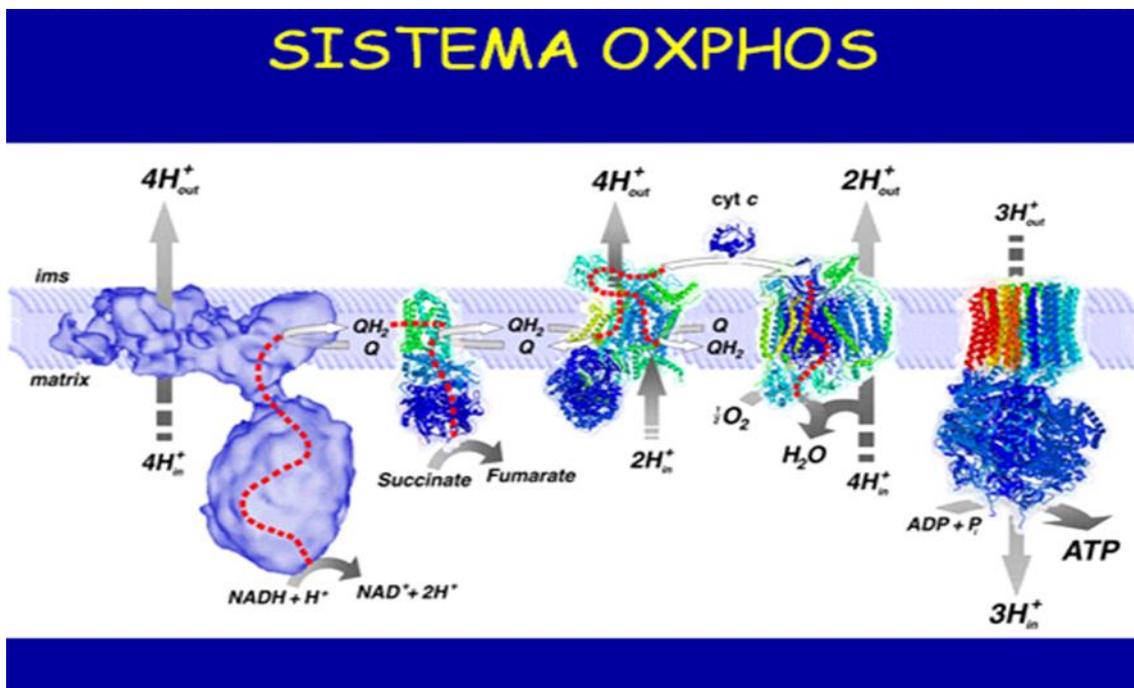


Figura 3.2. Representación esquemática del sistema OXPHOS

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas, de la serie de pacientes con FQ. Así mismo, se describieron las características fisiológicas de la prueba de esfuerzo cardiopulmonar, la electromiografía, la biopsia muscular, datos de cadena respiratoria y actividad física. De este modo, para las variables cualitativas se calcularon las frecuencias absolutas y sus correspondientes porcentajes. Las variables cuantitativas que seguían una distribución normal fueron descritas mediante medias y desviaciones estándar; mientras que aquellas variables cuantitativas que no siguieran una distribución normal fueron descritas mediante la mediana y los percentiles 25-75. Se estratificaron los datos según gravedad del genotipo, grado de limitación al flujo aéreo y patrón de limitación en la prueba de esfuerzo. Se compararon los resultados de la prueba de esfuerzo, la electromiografía, la biopsia muscular, cadena respiratoria y actividad física según estos estratos. Para ello se aplicó el test de la t de Student para grupos independientes (U de Mann-Whitney, en caso de que las variables no siguieran una distribución normal) cuando la variable resultado era cuantitativa. Cuando la variable resultado era cualitativa se utilizó la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o el test exacto de Fisher cuando alguno de los efectivos esperados era menor de 5. Así mismo, se llevaron a cabo estudios de correlación entre las variables continuas del test de capacidad de ejercicio y el grado de limitación al flujo aéreo utilizando la prueba de correlación de Spearman. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si  $p < 0.05$ . Los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATA 12.1 (Stata Comp, College station, TX, USA).



## 4. RESULTADOS

### 4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron un total de 44 pacientes adultos con FQ (31 (70.5%) hombres y 13 (29.5%) mujeres), con una mediana de edad de 28.5 años (p25-75=24-36.5). La edad de diagnóstico de la enfermedad fue de 5 años (p25-75=1-22), con unos valores en la prueba del sudor de 100 mEq/L de ion Cl<sup>-</sup> (p25-75=85-110). La mitad de los pacientes tenían un genotipo leve (n=22) y la otra mitad un genotipo grave (n=22). La tabla 4.1 muestra sus características basales, en la totalidad de los pacientes y en función del genotipo.

Tabla 4.1. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio

Variable	Total* (n=44)	Genotipo leve (n=22)	Genotipo grave (n=22)	p
Edad (años)	28.5 (24-36.5)	36 (27-42)	25.5 (24-31)	0.005
Sexo (% hombres)	31 (70.5)	15 (68.2)	16 (72.7)	0.741
Talla (cm)	170.5 (160-177.5)	172 (160-180)	168.5 (160-177)	0.366
Peso (kg)	67 (56-73)	71.5 (66-78)	61.5 (51-68)	0.003
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22.4 (20.3-25.2)	23.9 (21.6-27.4)	21.6 (19.5-22.8)	0.008
Edad de diagnóstico (años)	5 (1-22)	22 (12-32)	1 (1-5)	<0.001
Prueba del sudor (mEq/L ion Cl <sup>-</sup> )	100 (85-110)	93.5 (74-100)	109 (100-118)	0.002
Insuficiencia pancreática (%)	28 (63.6)	6 (27.3)	22 (100)	<0.001
Bronquiectasias (%)	41 (93.2)	19 (86.4)	22 (100)	0.073
Colonización (%)	39 (88.6)	18 (81.8)	21 (95.5)	0.345
FVC (% predicho)	76 (65.5-91)	84.5 (70-99)	69.5 (64-78)	0.019
FEV1 (% predicho)	63 (48.5-90)	88 (49-99)	56.5 (46-66)	0.013
Nivel de actividad física alto (%)	26 (68.4)	13 (68.4)	13 (68.4)	0.999
Nivel de actividad física moderado (%)	12 (31.6)	6 (31.6)	6 (31.6)	0.999

Los datos se presentan como n (%) o mediana (p25-p75).

\*Algunas variables tienen valores perdidos: 6 en nivel de actividad física.

No habían diferencias estadísticamente significativas en relación al sexo ( $p=0.741$ ) y la talla ( $p=0.366$ ), pero sí en cuanto al peso ( $p=0.003$ ) y el índice de masa corporal (IMC) ( $p=0.008$ ), con valores normales pero menores en los pacientes con genotipo grave. Los pacientes con genotipos graves eran significativamente más jóvenes que los que tenían genotipos leves ( $p=0.005$ ), con una edad de diagnóstico significativamente menor ( $p<0.001$ ) y valores mayores en la prueba del sudor ( $p=0.002$ ). Asimismo, todos estos pacientes tenían insuficiencia pancreática, mientras que en los que tenían genotipo leve ésta sólo estaba presente en el 27.3% de los casos ( $p<0.001$ ). Respecto a la presencia de bronquiectasias y/o colonización microbiológica de la vía aérea, no habían diferencias significativas ( $p=0.073$  y  $p=0.345$  respectivamente). Los pacientes con genotipo grave tenían valores significativamente menores de FVC ( $p=0.019$ ) y FEV1 ( $p=0.013$ ) que los pacientes con genotipo leve (figura 4.1). Por último, todos los pacientes, independientemente de su genotipo, tenían un nivel de actividad física moderado o alto.

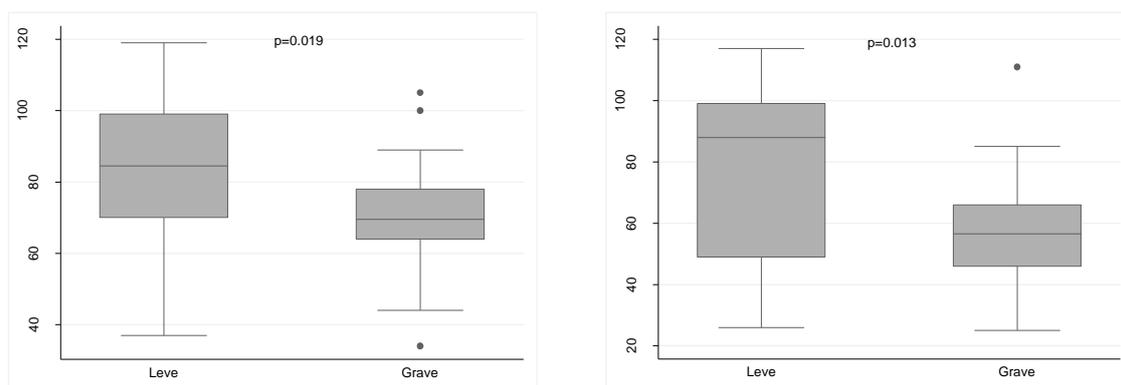


Figura 4.1. FVC y FEV1 (% del teórico) de los pacientes en función de su genotipo

## 4.2 ERGOMETRÍA RESPIRATORIA

La ergometría respiratoria pudo realizarse a 40 (90.9%) de los pacientes incluidos en el estudio. Todos realizaron un esfuerzo máximo, presentando un RER alto al final del ejercicio (p25-75=1.2-1.3) y niveles de lactatos altos a los 2 minutos de finalizar el mismo (p25-75=6-9.2). La tabla 4.2 muestra los valores de los principales parámetros obtenidos, agrupando a los pacientes en función del grado de obstrucción en las PFR. La capacidad funcional de ejercicio estaba disminuida en 21 (87.5%) pacientes con obstrucción moderada o grave, con una mediana de 67% (p25-75=56.5-76.5), y en 8 (50%) pacientes sin obstrucción u obstrucción leve, con una mediana de 85.5% (p25-75=73.5-92), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.005$ ) (figura 4.2).

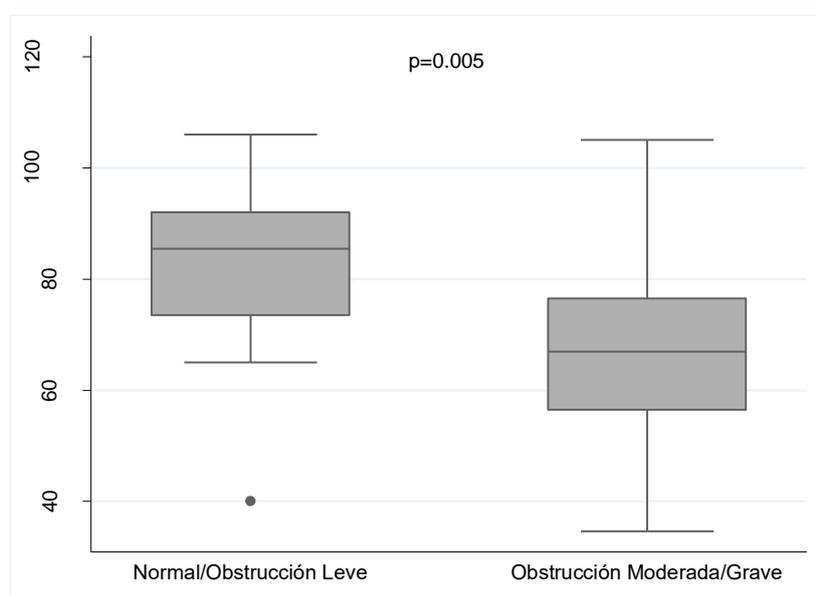


Figura 4.2. Capacidad funcional de los pacientes en función del grado de obstrucción en las PFR

Tabla 4.2. Valores ergométricos en función del grado de obstrucción en las PFR

Variable	Total (n=40)	Sin obstrucción o leve (n=16)	Obstrucción moderada/grave (n=24)	p
VO <sub>2</sub> (mL/min)	1684 (1276.5-2303.5)	2229 (1704.5-2561.5)	1509.5 (1181.5-1946)	0.009
VO <sub>2</sub> (mL/Kg/min)	26.4 (22.1-33.2)	30.4 (23.1-36.3)	25.15 (21.4-30.8)	0.199
AT (mL/min)	1017 (780-1234)	1119 (918.5-1380)	875 (710-1050)	0.027
Watts (W)	136.0 (111.5-203)	190 (142-236)	119.5 (97.5-148.5)	0.001
ΔVO <sub>2</sub> /ΔWR	8.9 (7.7-9.6)	8.6 (8-9.4)	8.9 (7.7-9.6)	0.676
HR en VO <sub>2</sub> máx (lpm)	162.5 (157-171.5)	168 (155.5-175)	161 (157.5-166)	0.307
Reserva cardíaca (%)	14.5 (10-18)	11 (7-14)	16 (12.5-20)	0.014
VO <sub>2</sub> /HR (%)	85 (72-96.5)	92.5 (85-103.5)	78.5 (69.5-92.5)	0.028
Reserva respiratoria (%)	29 (12.5-45)	16 (3.5-32)	45 (29.5-51)	<0.001
Vt/IC (%)	61.5 (53-70)	65.5 (60.5-75.5)	57.5 (51.5-66)	0.103
VE/VCO <sub>2</sub> (Slope)	28.2 (24-31)	29 (23-31.8)	26.6 (24-31)	0.952
VE <sub>máx</sub>	68 (48-85)	84 (75-93)	55 (45-69)	0.010
VE/VO <sub>2</sub> en VO <sub>2</sub> máx	37 (33-40.5)	36 (33.5-40)	38 (33-41.5)	0.406
VE/VO <sub>2</sub> en AT	30 (28-34)	28 (26.5-29)	33 (30-36)	<0.001
VE/VCO <sub>2</sub> en VO <sub>2</sub> máx	31 (28-35)	30 (28-33.5)	32.5 (27.5-35)	0.250
VE/VCO <sub>2</sub> en AT	30 (27-35)	28.5 (25.5-31)	33 (29-37)	0.002
PETCO <sub>2</sub>	41.5 (38-44.5)	41 (37-44)	42.5 (38-44.5)	0.515
RER VO <sub>2</sub> máx	1.2 (1.2-1.3)	1.3 (1.2-1.4)	1.2 (1.2-1.3)	0.103
RER recuperación	1.7 (1.5-1.8)	1.7 (1.6-1.9)	1.6 (1.5-1.7)	0.028
Lactatos (mmol/L)	7.2 (6-9.2)	7.9 (6-10.9)	6.8 (5.9-9)	0.502
Capacidad funcional (%)	75.5 (62.9-86.4)	85.5 (73.5-92)	67 (56.5-76.5)	0.005
Umbral anaeróbico (%)	41 (33-50)	43.5 (40-48.5)	38 (31.5-50)	0.092

Los datos se presentan como mediana (p25-p75).

Encontramos diferencias significativas en el VO<sub>2</sub> (p=0.009) que desaparecerían al ajustarlo por el peso del paciente (p=0.199), con un umbral anaeróbico disminuido de forma similar en ambos grupos (p=0.092). La mayoría de los parámetros ventilatorios (VO<sub>2</sub>/HR, reserva respiratoria, VE<sub>máx</sub>, VE/VO<sub>2</sub> y VE/VCO<sub>2</sub> en AT y RER recuperación)

estaban significativamente más afectados en el grupo de pacientes con obstrucción moderada/grave. Sin embargo, la principal causa de la disminución de la capacidad de esfuerzo no fue ventilatoria en el 43.8% de los pacientes sin obstrucción o con obstrucción leve y en el 25% de los pacientes con obstrucción moderada o grave. El patrón que presentaron estos pacientes fue compatible con una miopatía leve, caracterizado por:

- Reserva cardíaca agotada
- Reserva respiratoria no agotada
- Pulso de oxígeno ( $\text{VO}_2/\text{HR}$ ) disminuido o en algunos casos normal, con la pendiente habitualmente desviada a la derecha (figura 4.3)

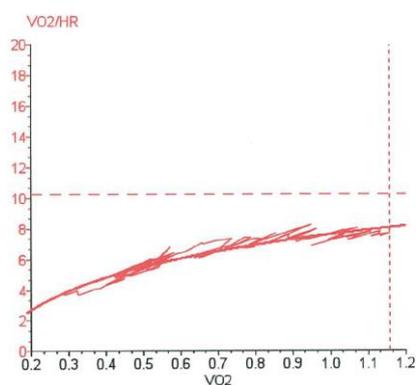


Figura 4.3. Pendiente del pulso de oxígeno desviada a la derecha

- Pendiente de la frecuencia cardíaca (HR) desviada a la izquierda (figura 4.4)

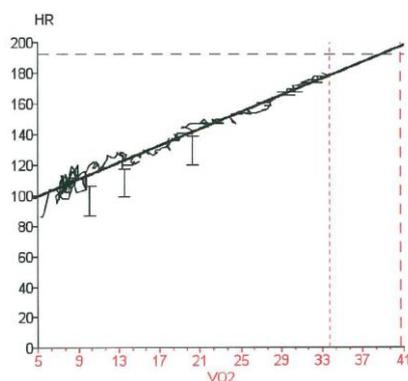


Figura 4.4. Pendiente de la frecuencia cardíaca desviada a la izquierda

- Umbral anaeróbico disminuido
- RER normal con patrón irregular (figura 4.5)

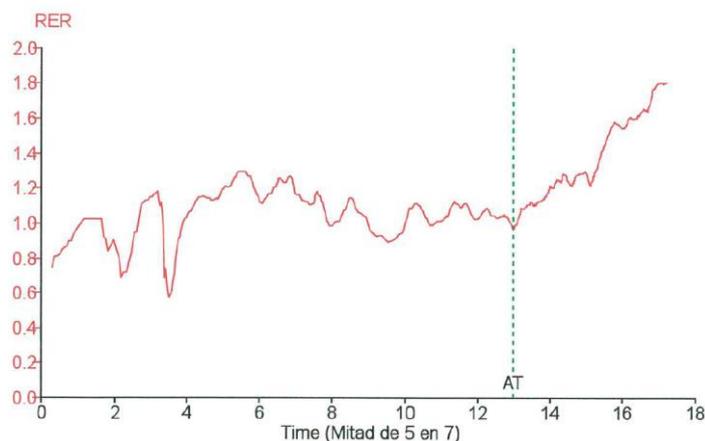


Figura 4.5. RER con patrón irregular

La tabla 4.3 muestra los valores de los principales parámetros obtenidos agrupando los pacientes en función del genotipo. Objetivamos que la capacidad funcional de ejercicio estaba disminuida en 16 (72.73%) pacientes del grupo con genotipo leve, con una mediana de 76.5% (p25-75=67-86), y en 13 pacientes del grupo con genotipo grave (72.22%), con una mediana de 67% (p25-75=58-87), en esta ocasión sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0.277$ ). Hubo diferencias significativas en la reserva cardíaca ( $p<0.001$ ) y en la reserva respiratoria ( $p=0.022$ ), en consonancia con la diferente afectación funcional respiratoria que encontramos en función de la gravedad del genotipo. La principal causa de la disminución de la capacidad de esfuerzo fue nuevamente la disfunción muscular periférica en el 40.9% de los pacientes con genotipo leve y en el 22.2% de los pacientes con genotipo grave.

Tabla 4.3. Valores ergométricos de los pacientes en función de la gravedad del genotipo

Variable	Total (n=40)	Genotipo leve (n=22)	Genotipo grave (n=18)	P
VO <sub>2</sub> (mL/min)	1684 (1276.5-2303.5)	1946 (1314-2233)	1577 (1158-2374)	0.384
VO <sub>2</sub> (mL/Kg/min)	26.4 (22.1-33.2)	26.4 (20.3-32.5)	26.7 (23.2-37.5)	0.550
AT (mL/min)	1017 (780-1234)	1042 (794-1234)	910 (710-1120)	0.314
Watts (W)	136 (111.5-203)	150 (124-197)	120 (99-205)	0.216
ΔVO <sub>2</sub> /ΔWR	8.9 (7.7-9.6)	8.56 (8-9.8)	8.9 (7.7-9.2)	0.695
HR en VO <sub>2</sub> máx (lpm)	162.5 (157-171.5)	167 (157-176)	161 (157-164)	0.174
Reserva cardíaca (%)	14.5 (10-18)	11 (8-15)	17.5 (15-20)	<0.001
VO <sub>2</sub> /HR (%)	85 (72-96.5)	86 (74-96)	79.5 (70-100)	0.913
Reserva respiratoria (%)	29 (12.5-45)	41 (19-49)	19 (4-30)	0.022
Vt/IC (%)	61.5 (53-70)	64 (57-74)	58.5 (52-66)	0.289
VE/VCO <sub>2</sub> (Slope)	28.2 (24-31)	25 (23-29)	31 (25-33)	0.008
VE <sub>máx</sub>	68 (48-85)	75.6 (45.5-89)	62 (48-84)	0.553
VE/VO <sub>2</sub> en VO <sub>2</sub> máx	37 (33-40.5)	36 (32-40)	38.5 (35-43)	0.120
VE/VO <sub>2</sub> en AT	30 (28-34)	29 (27-31)	32 (29-35)	0.105
VE/VCO <sub>2</sub> en VO <sub>2</sub> máx	31 (28-35)	30 (27-32)	34 (30-36)	0.016
VE/VCO <sub>2</sub> en AT	30 (27-35)	29 (26-32)	31 (29-37)	0.051
PETCO <sub>2</sub>	41.5 (38-44.5)	43 (41-47)	40 (37-43)	0.083
RER VO <sub>2</sub> máx	1.2 (1.2-1.3)	1.3 (1.2-1.3)	1.2 (1.2-1.3)	0.142
RER recuperación	1.7(1.5-1.8)	1.7 (1.5-1.9)	1.6 (1.5-1.7)	0.089
Lactatos (mmol/L)	7.2 (6-9.2)	7.3 (6.1-9.4)	7.2 (5.3-9)	0.429
Capacidad funcional (%)	75.5 (62.9-86.4)	76.5 (67-86)	67 (58-87)	0.277
Umbral anaeróbico (%)	41 (33-50)	42.5 (36-50)	38 (32-47)	0.301

Los datos se presentan como mediana (p25-p75).

### 4.3 ELECTROMIOGRAFÍA

La electromiografía pudo realizarse a 31 (70.5%) de los pacientes incluidos en el estudio. Todos los valores obtenidos estuvieron dentro de los rangos de referencia. Agrupando a los pacientes en función de sus PFR, la desviación del valor medio de la duración de las unidades motoras analizadas, en porcentaje, fue de 2 (p25-75=-8-8) en el grupo sin obstrucción o leve, y de -4 (p25-75=-9-3) en el grupo con obstrucción moderada o grave, sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.371$ ). Haciendo la agrupación por genotipo, este valor fue de 2 (p25-75=-7-8) en el grupo con genotipos leves, y de -4 (p25-75=-14-3) en el grupo con genotipos graves, igualmente sin que hubiera diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.114$ ).

### 4.4 EXAMEN NEUROMUSCULAR

El examen neuromuscular se realizó a los 44 (100%) pacientes incluidos en el estudio. Mostró que el tono, el volumen y la fuerza muscular en los músculos examinados estaban dentro de la normalidad en todos ellos. En tres de los pacientes, observamos un músculo con fuerza muscular 4 (normal 5 en la escala MRC). En la dinamometría el valor medio de la fuerza de la flexión de la mano era de 28.3 kg (SD 5.1, rango 22-38), valores cuantitativos similares a los observados en la población control sana ajustada por edad y sexo. No observamos atrofia muscular, fasciculaciones, miotonía, mioquimias o contracturas. No observamos alteraciones en la diferentes modalidades de las sensibilidad (sensibilidad táctil, vibratoria, de presión, posición articular, térmica y dolorosa) ni tampoco de los reflejos musculares profundos.

## 4.5 BIOPSIA MUSCULAR

Se realizó biopsia muscular a los 44 (100%) pacientes incluidos en el estudio, obteniéndose el porcentaje de pacientes con hallazgos patológicos en los diferentes aspectos anatomopatológicos analizados:

- Núcleos internos: se obtuvo un resultado anormal en 9 (20.5%) pacientes (figura 4.6).

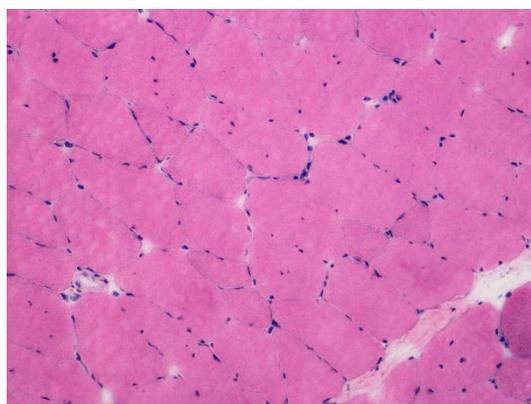


Figura 4.6. Biopsia muscular con presencia de núcleos internos (tinción Hematoxilina-Eosina, x20 aumentos)

- Fibras atroficas: se obtuvo un resultado anormal en 4 (9.1%) pacientes.
- Fibras hipertróficas: se obtuvo un resultado anormal en 15 (34.1%) pacientes (figura 4.7).

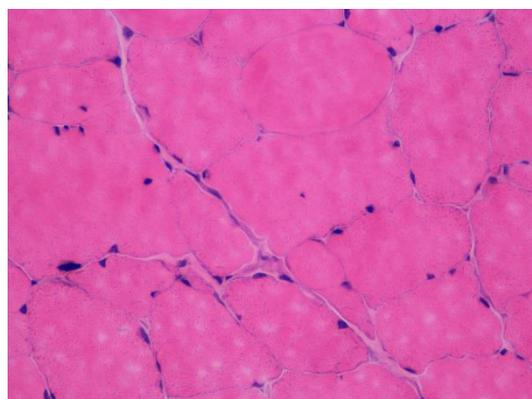
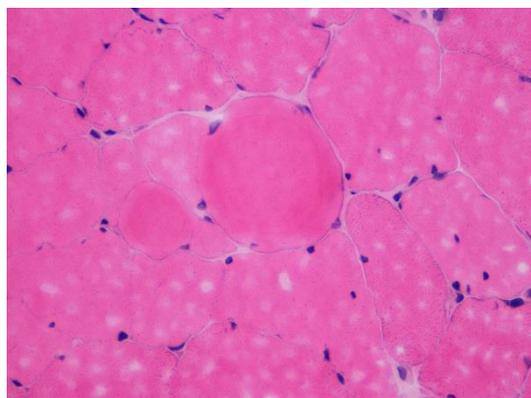


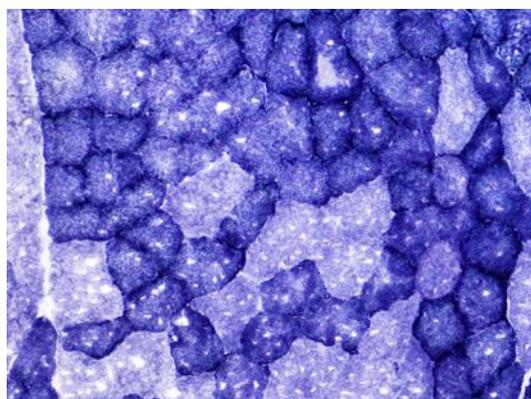
Figura 4.7. Biopsia muscular con fibras hipertróficas (tinción Hematoxilina-Eosina, x40 aumentos)

- Tipo de fibras: se obtuvo un resultado anormal en 14 (31.8%) pacientes.
- Agrupación de fibras: se observó en 9 (20.5%) pacientes.
- Fibras en anillo: fueron observadas en 1 (2.3%) paciente (figura 4.8).



*Figura 4.8. Biopsia muscular con fibras en anillo (tinción con Hematoxilina-Eosina, x40 aumentos)*

- Irregularidad en el patrón de enzimas oxidativas: se observó en 25 (56.8%) pacientes (figura 4.9).



*Figura 4.9. Biopsia muscular con fibras hipertróficas con baja actividad oxidativa y patrón interno irregular (tinción con NADH, x20 aumentos)*

- Infiltración adiposa: se observó en 4 (9.1%) pacientes.
- Ragged Red Fibers (RRF): no se observaron en ningún paciente.

- Infiltrado inflamatorio: se observó en 1 (2.3%) paciente (figura 4.10).

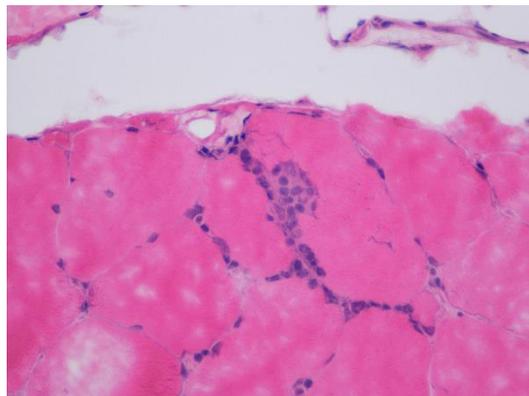


Figura 4.10. Biopsia muscular con infiltrado inflamatorio (tinción con Hematoxilina-Eosina, x40 aumentos)

Las tablas 4.4 y 4.5 muestran estos valores agrupando los pacientes en función del grado de obstrucción en las PFR y en función del genotipo, respectivamente. El único resultado estadísticamente significativo fue en relación al número de núcleos internos en función del genotipo, teniendo un genotipo leve todos los pacientes con un resultado anormal en esta variable ( $p=0.001$ ).

Tabla 4.4. Valores del estudio anatomopatológico de las biopsias musculares de los pacientes en función del grado de obstrucción en las PFR

Variable	Total (n=44)	Sin obstrucción o leve (n=18)	Obstrucción moderada/grave (n=26)	p
Núcleos internos (% anormales)	9 (20.5)	5 (27.8)	4 (15.4)	0.451
Fibras atróficas (% anormales)	4 (9.1)	2 (11.1)	2 (7.7)	0.999
Fibras hipertróficas (% anormales)	15 (34.1)	7 (38.9)	8 (30.8)	0.576
Tipo de fibras (% anormales)	14 (31.8)	6 (33.3)	8 (30.8)	0.858
Agrupación de fibras (% anormales)	9 (20.5)	5 (27.8)	4 (15.4)	0.316
Fibras en anillo (% anormales)	1 (2.3)	1 (5.6)	0 (0.0)	0.409
Irreg. en el patrón de enz. oxid (% anormales)	25 (56.8)	10 (55.6)	15 (57.7)	0.888
Infiltración adiposa (% anormales)	4 (9.1)	3 (16.7)	1 (3.9)	0.289
RRF (% anormales)	-	-	-	-
Infiltrado inflamatorio (% anormales)	1 (2.3)	1 (5.6)	0 (0.0)	0.409

Los datos se presentan como n (%).

Tabla 4.5. Valores del estudio anatomopatológico de las biopsias musculares de los pacientes en función del genotipo

Variable	Total (n=44)	Genotipo leve (n=22)	Genotipo grave (n=22)	p
Núcleos internos (% anormales)	9 (20.5)	9 (40.9)	0 (0.0)	<b>0.001</b>
Fibras atróficas (% anormales)	4 (9.1)	4 (18.2)	0 (0.0)	0.108
Fibras hipertróficas (% anormales)	15 (34.1)	7 (31.8)	8 (36.4)	0.750
Tipo de fibras (% anormales)	14 (31.8)	6 (27.3)	8 (36.4)	0.517
Agrupación de fibras (% anormales)	9 (20.5)	5 (22.7)	4 (18.2)	0.721
Fibras en anillo (% anormales)	1 (2.3)	1 (4.6)	0 (0.0)	0.185
Irreg. en el patrón de enz. oxid (% anormales)	25 (56.8)	15 (68.2)	10 (45.5)	0.128
Infiltración adiposa (% anormales)	4 (9.1)	3 (13.6)	1 (4.6)	0.607
RRF (% anormales)	-	-	-	-
Infiltrado inflamatorio (% anormales)	1 (2.3)	1 (4.6)	0 (0.0)	0.999

Los datos se presentan como n (%).

## 4.6 ESTUDIO DE LA CADENA RESPIRATORIA

El estudio de la cadena respiratoria pudo realizarse a 43 (97.7%) de los pacientes incluidos en el estudio. Las tablas 4.6 y 4.7 muestran los valores obtenidos agrupados en función del grado de obstrucción al flujo aéreo y en función del genotipo, respectivamente.

Tabla 4.6. Valores de la cadena respiratoria en función del grado de obstrucción en las PFR

Variable	Total (n=43)	Sin obstrucción o leve (n=22)	Obstrucción moderada/grave (n=21)	p
CI+III / mg prot	23.3 (18.9-29.2)	22.3 (18.8-23.7)	25.3 (20.5-29.9)	0.121
SQ / mg prot	5.9 (4.6-6.9)	5.9 (4.4-6.8)	5.9 (4.6-6.9)	0.926
SP / mg prot	11.1 (8.4-17.2)	10.2 (7.9-13.5)	15.5 (8.9-19.3)	0.150
CII+III / mg prot	14.9 (9-17.2)	13.5 (9-16.9)	15.5 (7.9-17.8)	0.491
COX / mg prot	135.8 (115.4-170.8)	134 (97.6-165.3)	135.8 (124.1-175.9)	0.260
CS / mg prot	156.6 (115.9-200.9)	151.3 (115.9-200)	156.6 (116.2-200.9)	0.902
CI+III / CS	152.6 (100.8-248.2)	143.3 (98-227.2)	175.9 (113.8-268.3)	0.290
SQ / CS	30.4 (23.8-38.2)	33.9 (26.7-41.5)	29.3 (23-36.2)	0.364
SP / CS	83.3 (39.6-126.7)	69.9 (39.8-126.8)	95.2 (37.6-126.6)	0.922
CII+III / CS	82.2 (58.2-96.3)	77.1 (61.4-92.7)	88.2 (53.6-98)	0.491
COX / CS	750.2 (548.4-1115.6)	771.6 (552.2-1090.5)	750.2 (548.4-1115.6)	0.980

CI+III: actividad complejos I+III; SQ y SP: actividad complejo II; CII+III: actividad complejos II+III; COX: actividad complejo IV (citocromo c oxidasa); CS: citrato sintasa. Los datos se presentan como mediana (p25-p75).

Tabla 4.7. Valores de la cadena respiratoria en función de la gravedad del genotipo

Variable	Todos	Genotipo leve (n=22) (media ± DE)	Genotipo grave (n=21) (media ± DE)	P
CI+III / mg prot	23.3 (18.9-29.2)	23.4 (19.7-29.9)	22.1 (18.9-28.1)	0.544
SQ / mg prot	5.9 (4.6-6.9)	5.8 (5.2-6.6)	6.1 (3.7-6.9)	0.836
SP / mg prot	11.1 (8.4-17.2)	11.4 (9.1-16.3)	10.7 (8.1-17.8)	0.908
CII+III / mg prot	14.9 (9.0-17.2)	14.2 (5.0-15.8)	15.4 (11.1-18.2)	0.184
COX / mg prot	135.8 (115.4-170.8)	146.5 (107.7-174.1)	130.7 (116.6-164.8)	0.667
CS / mg prot	156.6 (115.9-200.9)	157.1 (92.9-190.5)	141.8 (116.2-210.5)	0.343
CI+III / CS	152.6 (100.8-248.2)	189.6 (117.4-268.3)	142.3 (97.5-197.9)	0.138
SQ / CS	30.4 (23.8-38.2)	32.6 (26.7-37.1)	28.9 (21.4-39.3)	0.438
SP / CS	83.3 (39.6-126.7)	81.6 (39.8-126.8)	83.8 (39.4-117.8)	0.962
CII+III / CS	82.2 (58.2-96.3)	76.4 (52.9-94.4)	88.6 (68.9-96.3)	0.285
COX / CS	750.2 (548.4-1115.6)	786.4 (552.2-1090.8)	750.2 (548.4-1253.4)	0.941

CI+III: actividad complejos I+III; SQ y SP: actividad complejo II; CII+III: actividad complejos II+III; COX: actividad complejo IV (citocromo c oxidasa); CS: citrato sintasa. Los datos se presentan como mediana (p25-p75).

No hubo diferencias estadísticamente significativas de estos valores, tanto en función del grado de obstrucción en las PFR como del genotipo.

## 4.7 OTROS RESULTADOS

Para completar el estudio estadístico, decidimos cruzar los datos de las diferentes exploraciones realizadas a los pacientes. La tabla 4.8 muestra los valores obtenidos agrupando los pacientes en función del patrón de limitación que tenían en la prueba de esfuerzo, comparándolos además con los que tenían un resultado normal en esta prueba. Objetivamos, como era presumible, diferencias significativas en los valores de las PFR cuando comparamos el grupo en los que este patrón era ventilatorio tanto con el grupo con patrón periférico/mixto como con el grupo con ergometría normal. Encontramos también diferencias significativas en los valores de SQ/CS cuando comparamos el grupo con patrón de limitación periférico/mixto tanto con el grupo con patrón de limitación ventilatorio ( $p=0.038$ ) como con el grupo con prueba de esfuerzo normal ( $p=0.021$ ). Se hallaron también diferencias significativas en cuanto al porcentaje de pacientes con un resultado anormal en relación a la presencia de fibras hipertróficas en la anatomía patológica de la biopsia muscular, entre el grupo con prueba de esfuerzo normal y el grupo con patrón de limitación periférico/mixto ( $p=0.033$ ), sin que hubiera diferencias significativas en el nivel de actividad física ( $p=0.173$ ), hecho que podría haber explicado este resultado. Para profundizar más en este resultado, se compararon igualmente los valores de PFR, genotipo, prueba de esfuerzo, anatomía patológica y cadena respiratoria en función del nivel de actividad física, sin que se encontrara ninguna diferencia estadísticamente significativa.

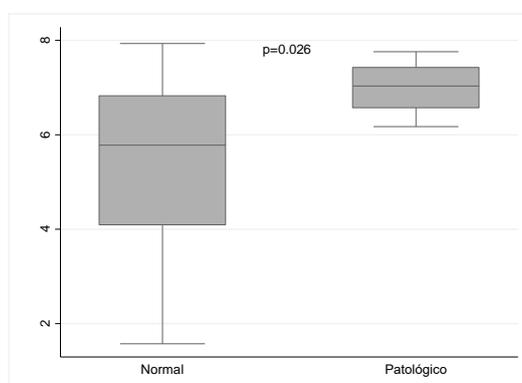
Tabla 4.8. Valores de PFR, genotipo, anatomía patológica, cadena respiratoria y actividad física en función del patrón de limitación en la prueba de esfuerzo

Variable	Total (n=40)	NORMAL (n=11)	VENTILATORIO (n=16)	PERIFÉRICO/MIXTO (n=13)	p1	p2	p3
FVC (% predicho)	73.5 (64.5-91)	91 (80-105)	63.5 (55-68)	82 (70-99)	<0.001	0.077	<0.001
FEV1 (% predicho)	63 (47.5-90.5)	90 (70-104)	45 (33-55)	74 (56-96)	<0.001	0.192	<0.001
Genotipo (% graves)	18 (45.0)	4 (36.4)	10 (62.5)	4 (30.8)	0.182	0.999	0.089
Núcleos internos (% anormales)	9 (22.5)	3 (27.7)	3 (18.8)	3 (23.1)	0.662	0.999	0.999
Fibras atróficas (% anormales)	4 (10.0)	0 (0.0)	2 (12.5)	2 (15.4)	0.499	0.482	0.999
Fibras hipertróficas (% anormales)	12 (30.0)	5 (45.5)	6 (37.5)	1 (7.7)	0.710	<b>0.033</b>	0.093
Tipo de fibras (% anormales)	12 (30.0)	5 (45.5)	5 (21.3)	2 (15.4)	0.687	0.182	0.410
Agrupación de fibras (% anormales)	9 (22.5)	3 (27.3)	3 (18.8)	3 (23.1)	0.662	0.999	0.999
Fibras en anillo (% anormales)	9 (22.5)	5 (45.5)	2 (12.5)	2 (15.4)	0.084	0.182	0.999
Irregularidad en el patrón de enz oxid (% anormales)	23 (57.5)	8 (72.7)	10 (62.5)	5 (38.5)	0.692	0.093	0.198
Infiltración adiposa (% anormales)	4 (10.0)	1 (9.1)	1 (6.3)	2 (15.4)	0.999	0.999	0.573
RRF (% anormales)	-	-	-	-	-	-	-
Infiltrado inflamatorio (% anormales)	1 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (7.7)	-	0.999	0.448
CI+III / mg prot	23.4 (19.7-29.4)	22.1 (15.5-23.7)	24.5 (21-31.7)	24.6 (20.7-30.3)	0.126	0.110	0.999
SQ / mg prot	5.9 (4.8-6.8)	4.7 (2.2-6.6)	6.5 (4.3-6.9)	5.8 (5-6.8)	0.278	0.448	0.879
SP / mg prot	12.3 (8.6-17.8)	9.5 (7.5-11.4)	17.2 (13.2-19.4)	9.9 (8.1-16)	0.104	0.750	0.070
CI+III / mg prot	14.9 (9-17.2)	11.8 (3.2-17.2)	15.4 (5.9-18.2)	15.1 (11.2-16.6)	0.542	0.553	0.922
COX / mg prot	133.2 (116-171.5)	139 (85.1-172.3)	133 (123.6-167.7)	130.7 (110.4-175.9)	0.670	0.621	0.854
CS / mg prot	157.6 (115.9-200.9)	164.3 (85.5-242.7)	161.2 (116.5-205.1)	148 (121.9-195.2)	0.622	0.951	0.816
CI+III / CS	175 (100.8-254.5)	139.3 (95.7-282.6)	175.4 (100.8-247.7)	197.9 (118-258.2)	0.657	0.424	0.486
SQ / CS	30.7 (24.5-37.1)	26.8 (18.6-32.2)	26.8 (21.4-35.7)	36.2 (30.7-43.7)	0.891	<b>0.021</b>	<b>0.038</b>
SP / CS	90.5 (41.8-126.8)	70.3 (39.4-137)	95.2 (51.2-117.8)	90.5 (41.8- 138)	0.950	0.741	0.827
CI+III / CS	81.1 (58.2-96.3)	63.1 (42.1-102.1)	86.5 (43.2-94.8)	84.5 (73.4-115.2)	0.542	0.147	0.407
COX / CS	750.2 (548.4-1115.6)	600.7 (477.7-887.3)	730.7 (511.2-1047.2)	1103.1 (560.6-1370.8)	0.882	0.157	0.078
Actividad física total (METS)	3840 (2260.5-7066)	6132 (3900-7266)	2837.3 (1932.5-8693.5)	2917.5 (2373-5785)	0.295	0.173	0.703
Nivel de actividad física moderado (%)	12 (33.3)	1 (9.1)	5 (41.7)	6 (46.1)	0.155	0.078	0.999
Nivel de actividad física alto (%)	24 (66.7)	10 (90.9)	7 (58.3)	7 (53.9)	0.155	0.078	0.999

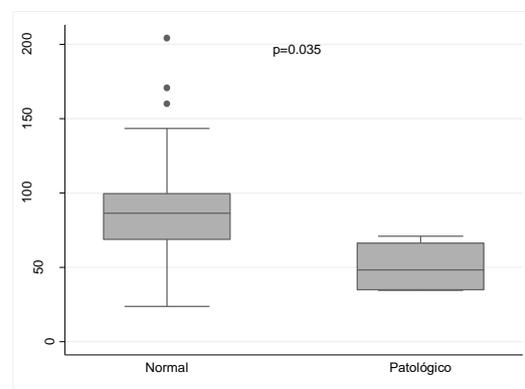
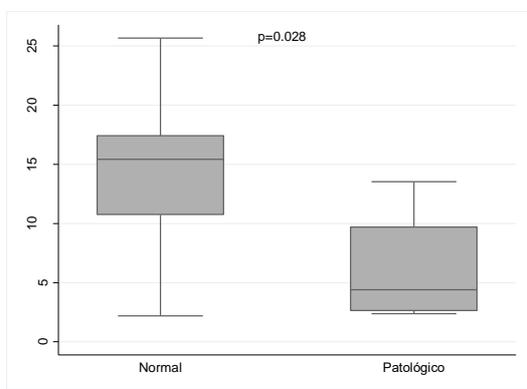
p1: Normal vs Ventilatorio; p2= Normal vs Periférico/Mixto; p3=Ventilatorio vs Periférico/Mixto  
Los datos se presentan como n (%) o mediana (p25-p75)

Por otra parte, analizamos específicamente los datos de las diferentes pruebas realizadas agrupando a los pacientes en función de si los hallazgos anatomopatológicos que se obtuvieron en la biopsia muscular eran normales o no, con los siguientes resultados a destacar:

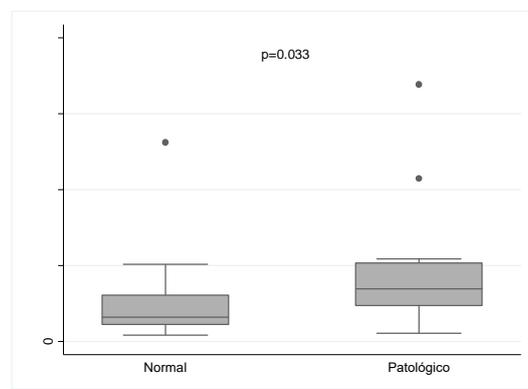
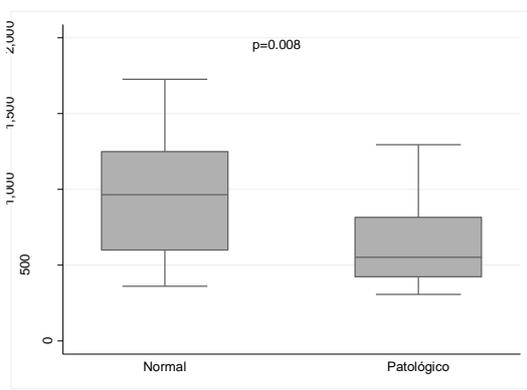
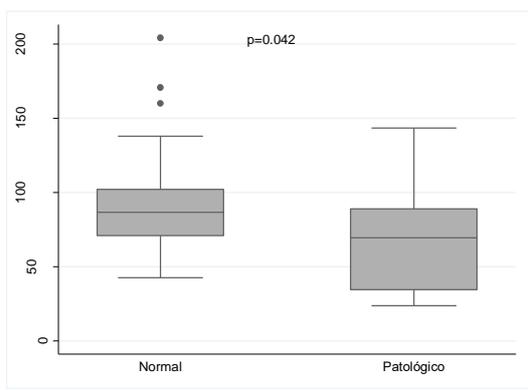
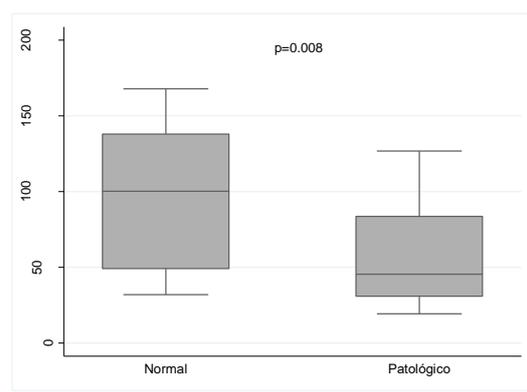
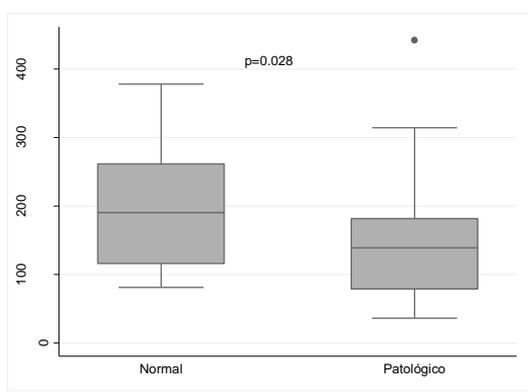
- Núcleos internos (n= 35 normal; 9 no normal): en los pacientes con resultado no normal observamos valores de SQ/mg proteína significativamente mayores ( $p=0.026$ ).



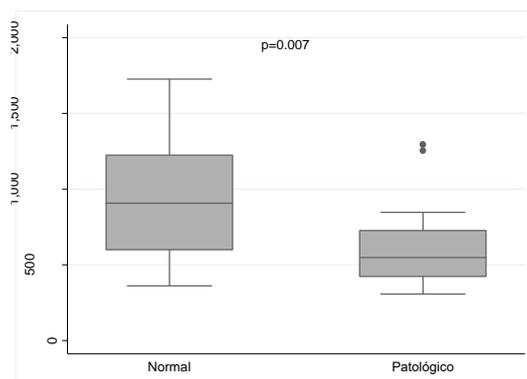
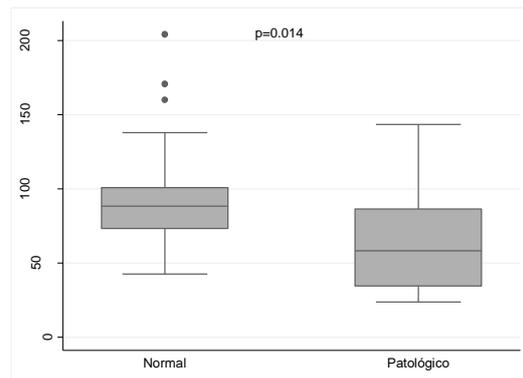
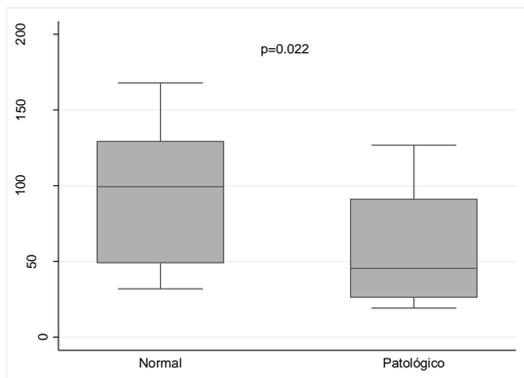
- Fibras atroficas (n= 40 normal; 4 no normal): en los pacientes con resultado no normal observamos valores de CII+III/mg proteína y CII+III/CS significativamente menores ( $p=0.028$  y  $p=0.035$  respectivamente).



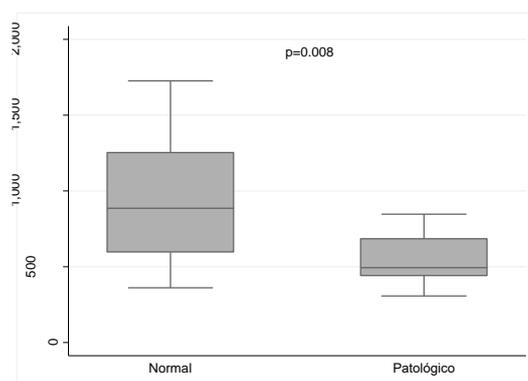
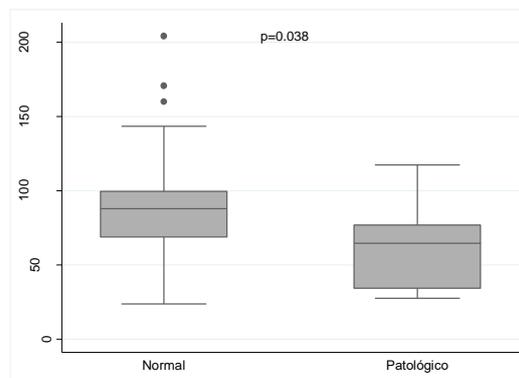
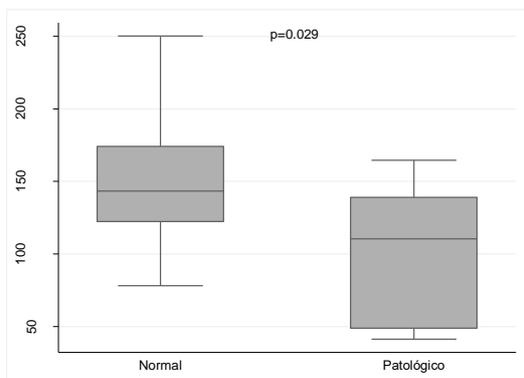
- Fibras hipertróficas (n= 29 normal; 15 no normal): en los pacientes con resultado no normal observamos valores significativamente menores de CI+III/CS ( $p=0.028$ ), SP/CS ( $p=0.008$ ), CII+III/CS ( $p=0.042$ ) y COX/CS ( $p=0.008$ ), con una actividad física total significativamente mayor que el grupo con resultado normal ( $p=0.033$ ).



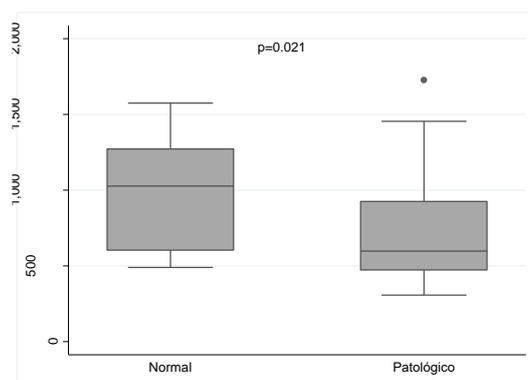
- Tipo de fibras (n= 30 normal; 14 no normal): en los pacientes con resultado no normal observamos valores significativamente menores de SP/CS (p=0.022), CII+III/CS (p=0.014) y COX/CS (p=0.007).



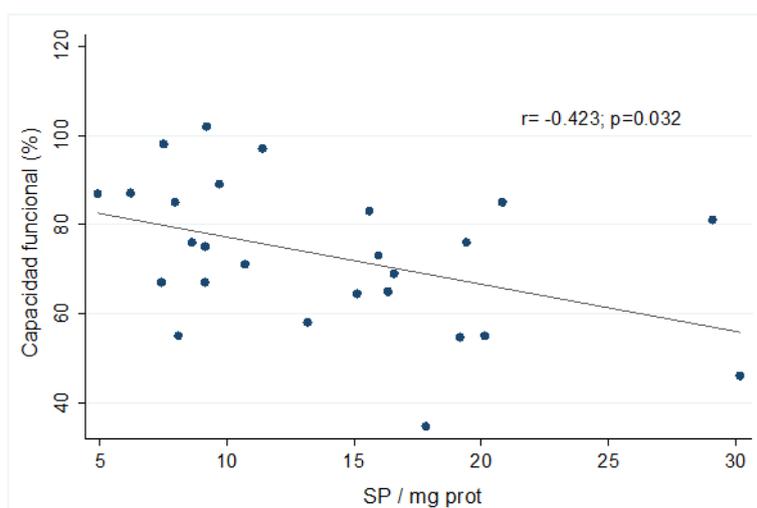
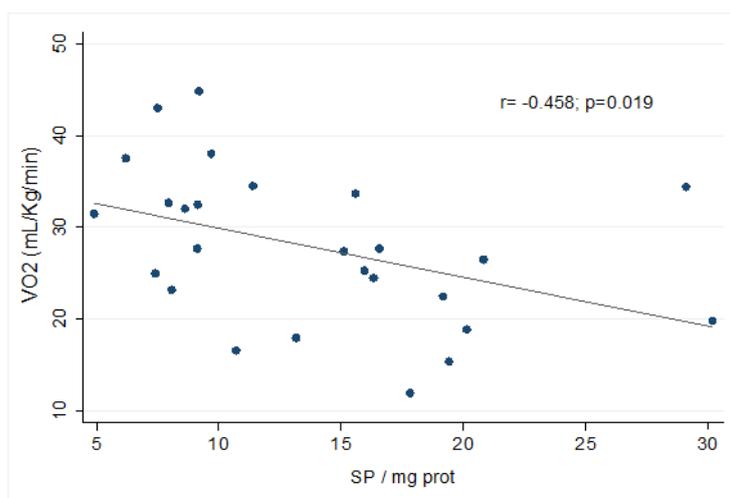
- Agrupación de fibras (n= 35 normal; 9 no normal): en los pacientes con resultado no normal observamos valores significativamente menores de COX/mg proteína (p=0.029), CII+III/CS (p=0.038) y COX/CS (p=0.008).



- Irregularidad en el patrón de enzimas oxidativas (n= 19 normal; 25 no normal): en los pacientes con resultado no normal observamos valores significativamente menores de COX/CS (p=0.021).



Finalmente se hizo un estudio de correlación entre todas las variables cuantitativas, destacando, entre las estadísticamente significativas, las halladas entre VO2 y los valores de SP/mg proteína ( $r=-0.458$ ;  $p=0.019$ ) y entre capacidad funcional y los valores de SP/mg proteína ( $r= -0.423$ ;  $p=0.032$ ).





## 5. DISCUSIÓN

---

Los resultados de nuestro estudio confirman que en la mayoría de los pacientes (72.5%), la tolerancia al ejercicio evaluada con las pruebas ergométricas estaba reducida. El grado de disminución de la capacidad de esfuerzo fue independiente del genotipo y directamente proporcional al grado de obstrucción en el flujo aéreo. En el 40.9% de los pacientes con genotipo leve, la principal causa de la intolerancia al ejercicio no era ventilatoria, proporción que en el subgrupo con genotipo grave alcanzaba el 22.2%. El patrón ergométrico que se observó en estos pacientes es compatible con un patrón miopático leve. El diagnóstico diferencial en estos casos debe hacerse con el decondicionamiento, el desentrenamiento y la insuficiencia cardíaca leve. Teniendo en cuenta que los pacientes no tenían clínica compatible con insuficiencia cardíaca y que el estado de decondición o desentrenamiento quedó descartado por el alto nivel de actividad física que presentaban, estos datos apoyan la hipótesis de que existe una alteración a nivel muscular en los pacientes con FQ. Hay que destacar además que no puede descartarse por funcionalismo que pueda existir una miopatía subyacente en los pacientes con afectación ventilatoria más o menos grave, ya que las alteraciones de los parámetros que la sugieren no llegan a producirse porque el paciente acaba la prueba antes por causa ventilatoria.

Todos los pacientes tenían un estado nutricional aceptable, con un examen neuromuscular y EMG normales, y los valores del estudio de la cadena respiratoria estaban dentro del rango de referencia obtenido previamente en población sana. En el estudio histológico de las biopsias musculares se objetivaron algunos hallazgos patológicos, sin relación significativa con el genotipo o la función pulmonar en ninguno

de ellos, lo que hace pensar que no son debidos propiamente a la enfermedad. Cuando se compararon los pacientes que tenían estos hallazgos con los que no los presentaban, se observaron diferencias estadísticamente significativas en algunos valores de la cadena respiratoria (sistema OXPHOS), que se correlacionaban con las mínimas alteraciones histológicas detectadas y sin evidencias de daño mitocondrial. En este sentido, son ejemplos los valores menores encontrados en los 4 pacientes (9%) que tenían un porcentaje no normal de fibras atroficas y en los 14 pacientes (31.8%) con una alteración en el patrón normal de distribución de los distintos tipos de fibras; ya que tienen mayor cantidad de fibras tipo 2, que son menos oxidativas. Sin embargo, son especialmente llamativas las diferencias halladas en los 15 pacientes (34%) que tenían una cantidad anormal de fibras hipertróficas, con valores significativamente menores en casi todos los complejos de la cadena respiratoria, cuando fueron analizados en función de la cantidad de citrato sintasa (CS). Esto significa que, a pesar de que globalmente es eficiente, su sistema OXPHOS es deficitario comparativamente por unidad mitocondrial. Teniendo en cuenta que tenían una actividad física significativamente mayor, sin diferencias en los resultados de la ergometría, sugiere que estos pacientes han requerido de un mecanismo hipertrófico compensador inducido por el ejercicio físico para mantener su capacidad funcional.

Otros dos aspectos a destacar son los hallazgos, en 9 pacientes (20.5%), de agrupación de fibras, con valores significativamente menores de CII+III/CS y COX/CS; y, en 25 pacientes (56.8%), de irregularidad en el patrón de enzimas oxidativos, también con valores significativamente menores de COX/CS. Si bien el primero sugiere una base patológica neuropática, los resultados normales en el examen neuromuscular y la EMG

nos hacen descartar esta posibilidad. En cuanto al segundo, su significado es incierto dado que los valores de la cadena respiratoria están todos dentro de los valores de referencia en población normal.

Los hallazgos clínicos y neurofisiológicos descartan razonablemente miopatía metabólica, canalopatía muscular, enfermedad de la unión neuromuscular, de la motoneurona o de nervio periférico. Algunos pacientes con síndrome de fatiga crónica presentan hallazgos similares a los objetivados en nuestro estudio: clínica de fatiga precoz con falta de resistencia al ejercicio, normalidad en las enzimas musculares, en el balance muscular, en la EMG y en la biopsia muscular. Son necesarios más estudios para discernir si en FQ la causa de su fatiga es mixta, es decir, central y muscular.

Son varios los estudios que han sido realizados intentando dilucidar la causa de la disminución en la capacidad de esfuerzo de los pacientes con fibrosis quística. En una reciente publicación<sup>95</sup>, se hace una revisión por bloques de los diferentes mecanismos que han sido implicados, tanto mediante estudios *in vitro* como *in vivo*, concluyendo que todos estos datos aportan evidencia suficiente que apoya la existencia de una disfunción mitocondrial, una alteración en el metabolismo mitocondrial y una alteración en la capacidad oxidativa del músculo esquelético en los pacientes con FQ.

Hay un primer grupo de estudios<sup>72, 79, 82, 96, 97, 98</sup> que demuestran la existencia de limitaciones intrínsecas en el músculo esquelético, independientemente de la masa muscular, la función pulmonar o el nivel de actividad física. De hecho, pacientes con FQ que son atletas de competición muestran una reducción en la fuerza y potencia muscular cuando son comparados con atletas aparentemente sanos<sup>99</sup>. La

manifestación de estas alteraciones se han relacionado estrechamente con la función anormal del gen CFTR en el tejido muscular<sup>98, 100</sup>, conduciendo a la existencia de un canal CFTR disfuncional que produce una anómala respuesta a la polarización de la membrana celular. En definitiva, la disfunción del canal CFTR contribuye a un transporte iónico alterado, lo que resulta en una reducción en la magnitud del potencial de acción y una discapacidad en la función del músculo esquelético.

Algunos estudios<sup>81, 101, 102, 103</sup> han confirmado la existencia de una disfunción mitocondrial en las células de los pacientes con FQ, tanto en su morfología como en su metabolismo energético. Junto a otros trabajos<sup>104, 105, 106</sup> que describen la existencia de otros contribuyentes, como alteraciones en la homeostasis del calcio y en la cadena respiratoria, aportan fuertes evidencias de la existencia de una alteración en el metabolismo bioenergético en estos pacientes.

Por otra parte, en la literatura encontramos fuertes evidencias de una disminución de la capacidad oxidativa del músculo esquelético a nivel celular en los pacientes con FQ. En este sentido, algunos grupos<sup>98, 100</sup> han descrito menores concentraciones de ATP en reposo, relacionando esto con una disfunción de la proteína CFTR<sup>107</sup>. La importante reducción en la producción de ATP durante el ejercicio<sup>82</sup> conduciría a un compromiso de la función muscular y contribuiría a la intolerancia al ejercicio. La depleción del ATP puede también afectar al ciclo apertura-cierre y la estabilidad del canal CFTR<sup>108, 109</sup>. Además, el complejo mitocondrial I, una proteína clave de la cadena respiratoria involucrada en la síntesis del ATP, está regulada positivamente por la proteína CFTR y su expresión está reducida en los

pacientes con FQ<sup>103, 104, 110, 111</sup>. Por último, ha sido descrita una regulación negativa de la proteína mitocondrial CISD1, moduladora de la capacidad oxidativa de la célula<sup>112</sup>.

Se han utilizado diferentes métodos para evaluar la funcionalidad del metabolismo mitocondrial *in vivo*. Uno de ellos es la espectroscopia por resonancia magnética con <sup>31</sup>P (<sup>31</sup>P-MRS por sus siglas en inglés), ampliamente utilizada en diferentes poblaciones para estudiar la capacidad oxidativa del músculo esquelético mediante la monitorización de la tasa de recuperación tras el ejercicio de fosfocreatina (PCr). En pacientes con FQ se han documentado alteraciones de esta tasa cuando han sido comparados con controles<sup>82, 106</sup>. Otro método que ha sido utilizado con el mismo fin es la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS por sus siglas en inglés), con una metodología similar y con fuertes correlaciones con la <sup>31</sup>P-MRS<sup>113</sup>, permitiendo una evaluación amplia de la capacidad mitocondrial (una combinación de función mitocondrial y número de mitocondrias). En un estudio<sup>114</sup> realizado con este método se observó que los pacientes con FQ presentaban una reducción del 15% en el metabolismo oxidativo de su músculo esquelético en comparación con controles aparentemente sanos, sin que se pudiese diferenciar si era debida a una reducción en el número de mitocondrias y/o a una disfunción mitocondrial. Hay que tener en cuenta que el aporte de oxígeno hacia la musculatura esquelética implicada en el ejercicio podría verse alterado por problemas vasculares<sup>115</sup>, incluido a nivel microvascular<sup>116</sup>, pero se ha podido objetivar que la respuesta en reposo utilizando NIRS es similar, lo que significa que las vasculopatías no afectan a este método de estudio<sup>95</sup>.

Sin embargo, también encontramos en la literatura estudios que afirman que la capacidad oxidativa del músculo esquelético de los pacientes con FQ no está alterada.

En este sentido, algunos estudios<sup>117, 118, 119</sup> realizados en población infantil y adulta con enfermedad pulmonar leve o moderada, concluyen que estos pacientes tienen similar función muscular que los controles sanos, tanto en metabolismo como en resistencia y fatigabilidad. Por otra parte, hay estudios<sup>82, 99, 106</sup> en los que se ha podido observar que la causa subyacente del menor rendimiento muscular es una masa muscular reducida, más que una disfunción metabólica. En estos casos, la menor contractilidad muscular no persiste cuando se normaliza por el área de la sección transversal del músculo<sup>117, 120</sup>. En base a estos estudios, hay autores<sup>121</sup> que sugieren que son los pequeños déficits cuantitativos (masa muscular), más que los cualitativos (anormalidades intrínsecas del músculo esquelético), los que producen una disminución global de la capacidad de esfuerzo en los pacientes con FQ.

Nuestro trabajo es el único centrado en el estudio anatomopatológico y de la cadena respiratoria mediante la realización de biopsias musculares, contribuyendo de esta manera a ampliar el conocimiento de las posibles causas de la disminución de la capacidad de esfuerzo de los pacientes con FQ. Además, el estudio se ha realizado en una población adulta, con tiempos mayores de evolución de la enfermedad e incluyendo no solo pacientes con genotipos graves sino también aquellos formados por mutaciones más leves, que suelen acompañarse de un fenotipo pulmonar menos grave y por ello son diagnosticados en la edad adulta. Considerar el impacto que tiene la edad sobre la capacidad de esfuerzo de estos pacientes es importante, ya que los resultados obtenidos en un estudio<sup>114</sup> orientan a una significativa relación inversa entre la edad y el metabolismo oxidativo del músculo esquelético en los pacientes con

FQ, de manera que el metabolismo energético muscular se reduce en aproximadamente un 2.5% por año.

Hemos verificado nuevamente que estos pacientes tienen una disminución de su capacidad de esfuerzo y hemos objetivado algunos cambios en la histología de su músculo esquelético. Sin embargo, no hemos hallado datos que apoyen la existencia de una disminución de la capacidad oxidativa del músculo esquelético, secundaria a una disfunción mitocondrial, así como tampoco hemos encontrado diferencias histológicas y/o de la cadena respiratoria en función del genotipo.

Una posible limitación de nuestro estudio es el tamaño de la muestra. A pesar de contar con una unidad de referencia en FQ, en la que se controlan más de 150 adultos, la necesidad de realizar una biopsia muscular, y en menor medida una EMG, condicionó considerablemente el reclutamiento de pacientes. Por otra parte, las agudizaciones frecuentes propias de esta enfermedad, que a menudo desemboca en el trasplante pulmonar, limitaron también la realización de las otras pruebas, sobre todo la ergometría respiratoria. Otra limitación es que no se recogió la medicación que recibieron los pacientes los meses previos a la práctica de la biopsia muscular, teniendo en cuenta que hay tratamientos, como los corticoides, que pueden tener efectos sobre el músculo. En el estudio se utilizó un cuestionario reconocido, validado y auto administrable para conocer la actividad física que realizaban los pacientes pero hay que contar con la posible limitación de que la información que nos facilitaron pudiera no ser del todo precisa. Otra posible limitación podría ser la variabilidad interobservador del estudio anatomopatológico entre las dos patólogas que participaron, si bien se llevaron a cabo las tinciones y técnicas histoquímicas e

inmunohistoquímicas que fueron necesarias para tener un resultado lo más objetivo posible. Por último, hay que tener en cuenta que con el estudio del sistema OXPHOS, se llevó a cabo una importante valoración funcional mitocondrial pero esta, por sí sola, no puede descartar la existencia de una disfunción a ese nivel, y serían necesarios más estudios para descartarla completamente.

Como conclusiones:

- 1) Nuestro estudio confirma la existencia de una disminución de la capacidad de esfuerzo en pruebas de ergometría (capacidad funcional del 75.5%, p25-75= 62.9-86.4) en la mayoría (72.5%) de los pacientes adultos con FQ.
- 2) No hay correlación entre la intolerancia al ejercicio y genotipo.
- 3) Ausencia de correlación entre la intolerancia al ejercicio y fuerza musculoesquelética medida con la escala del Medical Research Council.
- 4) El análisis cuantitativo e histoquímico de las biopsias musculares mostró hallazgos que no se pueden atribuir como causa de la intolerancia al ejercicio que presentan estos pacientes.
- 5) Las alteraciones en los estudios enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial son inespecíficos y descartan la hipótesis de disfunción mitocondrial sugerida en la década de los 90.
- 6) Son necesarios más estudios a nivel celular para descartar la existencia de una disfunción mitocondrial en los pacientes con FQ y formular nuevas hipótesis, como ha ocurrido en otras enfermedades que cursan con intolerancia al ejercicio.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

- <sup>1</sup> Gartner S, Cobos N. Cribado neonatal para la Fibrosis Quística. *An Pediatr (Barc)*. 2009;71(6):481-2.
- <sup>2</sup> Bousoño C, Pérez J. (2012). Fibrosis Quística: del ayer al hoy. En Salcedo A, Gartner S, Girón RM, García MD (editores), *Tratado de Fibrosis Quística* (pp. 17-27). Editorial Justim S.L.
- <sup>3</sup> Andersen D. Cystic Fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: clinical and pathological study. *Am J Dis Child*. 1938;56:344-99.
- <sup>4</sup> Farber S. Some organic digestive disturbances in early life. Pathological changes associated with pancreatic insufficiency. *Michigan Med Soc*. 1945;44:587-94.
- <sup>5</sup> Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child*. 1946 Jul;72:62-80.
- <sup>6</sup> Bodian HL. Fibrocystic disease of the pancreas. A congenital disorder of mucus production. London, Heinemann W ed. 1952:67-146.
- <sup>7</sup> Di San't Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas its clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics*. 1953;12(5):549-63.
- <sup>8</sup> Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis using pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*. 1959;23(3):545-9.
- <sup>9</sup> Dooley RR, Guilmette F, Leubner H, Patterson PR, Shwachman H, Weil C. Cystic fibrosis of the pancreas with varying degrees of pancreatic insufficiency. *AMA J Dis Child*. 1956;92(4):347-68.
- <sup>10</sup> Bishop HC, Koop CE. Management of meconium ileus, resection, Roux-en Y anastomosis and ileostomy irrigation with pancreatic enzymes. *Ann Surg*. 1957;145(3):410-4.
- <sup>11</sup> Noblett HR. Treatment of uncomplicated meconium ileus by gastrografen enema: a preliminary report. *J Pediatr Surg*. 1969;4(2):190-7.

- <sup>12</sup> Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature*. 1983;301(5899):421-2.
- <sup>13</sup> Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, Nielsen LS, Williamson R. Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis syntenic. *Clin Genet*. 1985;28(4):265-71.
- <sup>14</sup> Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*. 1985;230(4729):1054-7.
- <sup>15</sup> White R, Woodward S, Leppert M, O'Connell P, Hoff M, Herbst J, et al. A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature*. 1985;318(6044):382-4.
- <sup>16</sup> Farrall M, Law HY, Rodeck C H, Warren R, Stanier P, Super M, et al. First trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis with linked DNA probes. *Lancet*. 1986;1(8495):1402-5.
- <sup>17</sup> Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.
- <sup>18</sup> Welsh MJ. Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia. *FASEB J*. 1990;4(10):2718-25.
- <sup>19</sup> Drumm ML, Pope HA, Clift WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, et al. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell*. 1990;62(6):1227-33.
- <sup>20</sup> Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, Naismith AL, Sun SZ, Ackerley C A, et al. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell*. 1991;64(4):681-91.
- <sup>21</sup> Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153(2):S4-S14.

- <sup>22</sup> Colombo C, Littlewood J. The implementation of standards of care in Europe: State of the art. *J Cyst Fibros*. 2011;10(Suppl 2):S7-15.
- <sup>23</sup> Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, Laxova A, Zeng L, Lai HC, et al. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics*. 2001;107(1):1-13.
- <sup>24</sup> Cobos N, Gartner S. Epidemiología de la fibrosis quística. En: Dapena FJ, ed. *Fibrosis Quística: atención integral, manejo clínico y puesta al día*. Granada: Alhulia, 1998. p. 31-40.
- <sup>25</sup> Casals T. Epidemiología y patogénesis. En: Sociedad Científica de lucha contra la fibrosis quística, ed. *Manual de Fibrosis Quística*. 2003. p. 13-9.
- <sup>26</sup> Frederiksen B, Lanng S, Koch C, Hoiby N. Improved survival in the Danish Center-Treated Cystic Fibrosis patients: Results of aggressive treatment. *Pediatr Pulmonol* 1996; 21: 153-8.
- <sup>27</sup> Kulich M, Rosenfeld M, Goss CH, Wilmott R. Improved survival among young patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2003; 142: 631-6.
- <sup>28</sup> Salcedo A. Unidades de Fibrosis Quística: organización y funcionamiento. *An Esp Ped* 1999; Supl 133: 59-61.
- <sup>29</sup> White NL, Higgins CF, Trezise AE. Tissue-specific in vivo transcription start sites of the human and murine cystic fibrosis genes. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 363-9.
- <sup>30</sup> Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109: 121-4.
- <sup>31</sup> Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz DA, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245: 1073-80.
- <sup>32</sup> Estivill X, Bancells C, Ramos C. for the BIOMED CF Mutation Analysis Consortium. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 1997; 10: 135-54.

- <sup>33</sup> Cystic Fibrosis Mutation Data Base (CFMDB), Hospital for Sick Children, Toronto, <http://www.genet.sickkids.on.ca>; 2016.
- <sup>34</sup> The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (CFGAC). Population variation of common CF mutations. *Hum Mutat* 1994; 4: 167-77.
- <sup>35</sup> Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-4.
- <sup>36</sup> Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274: 21873-7.
- <sup>37</sup> Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, et al. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 1111-20.
- <sup>38</sup> Vankeerberghen A, Wei L, Teng H, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, et al. Characterization of mutations located in exon 18 of the CFTR gene. *FEBS Lett* 1998; 437(1-2):1-4.
- <sup>39</sup> Howell LD, Borchardt R, Kole J, Kaz AM, Randak C, Cohn JA. Protein kinase A regulates ATP hydrolysis and dimerization by a CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) domain. *Biochem J* 2004; 378: 151-9.
- <sup>40</sup> Dowart M, Thibodeau P, Thomas P. Cystic fibrosis: recent structural insights. *J Cystic Fibros* 2004; 3 (supl 2): 91-4.
- <sup>41</sup> Amaral MD. CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci* 2004; 23: 41-8.
- <sup>42</sup> Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002; 1: 13-29.

- <sup>43</sup> Brochiero E, Dagenais A, Prive A, Berthiaume Y, Grygorczyk R. Evidence of a functional CFTR CL- channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287:L 382-92.
- <sup>44</sup> Cantón R, del Campo R. Cystic fibrosis: deciphering the complexity. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(7):793-7.
- <sup>45</sup> Cantón R, Cobos N , de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gartner S, et al; Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(9):690-703.
- <sup>46</sup> Prober C G. The impact of respiratory viral infections in patients with cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy.* 1991;9(1-2):87-102.
- <sup>47</sup> Van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TF, van der Ent C K. Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2005;4 Suppl 2:31-6.
- <sup>48</sup> Burns JL, Gibson RL, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2001;183(3):444-52.
- <sup>49</sup> del Campo R, Morosini MI, de la Pedrosa EG, Fenoll A, Muñoz-Almagro C , Máiz L, et al. Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2207-14.
- <sup>50</sup> Sawicki GS, Rasouliyan L, Ren C L. The impact of MRSA on lung function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(8):734-5.
- <sup>51</sup> Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):29-70.
- <sup>52</sup> Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):299-323.

- <sup>53</sup> Valdezate S, Vindel A, Maiz L, Baquero F, Escobar H, Cantón R. Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(1):113-22.
- <sup>54</sup> Román F, Cantón R, Pérez-Vázquez M, Baquero F, Campos J. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol*. 2004;42(4):1450-9.
- <sup>55</sup> de Vrankrijker AM, Wolfs TF, van der Ent CK. Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2010;11(4):246-54.
- <sup>56</sup> Bittar F, Rolain JM. Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):809-20.
- <sup>57</sup> Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(2):89-104.
- <sup>58</sup> Tunney MM, Field TR, Moriarty TF, Patrick S, Doering G, Muhlebach MS, et al. Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(9):995-1001.
- <sup>59</sup> Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK. The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23(3):319-24.
- <sup>60</sup> Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaiza V, Respalda N, et al. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13(10):1008-11.
- <sup>61</sup> Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132(4):589-95.
- <sup>62</sup> Mickle JE, Cutting GR. Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am*. 2000;84(3):597-607.
- <sup>63</sup> Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, et al; Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353(14):1443-53.

- <sup>64</sup> World Health Organization. Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report of a Joint Working Group of WHO/IC F(M) A/EC FS/EC FTN, 2001 (reprinted in: *J Cyst Fibros.* 2002;1:5-8).
- <sup>65</sup> De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* 2006;61:627-35.
- <sup>66</sup> The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993;329:1308-1313.
- <sup>67</sup> De Gracia J, Mata F, Álvarez A, Casals T, Gartner S, Vendrell M, De la Rosa D, Guarner L, Hermosilla E. Genotype-phenotype correlation for pulmonary function in cystic fibrosis. *Thorax* 2005;60:558-563.
- <sup>68</sup> Hoffstein V, Brown I, Taylor R, McLean P, Zamel N. Maximum flow ratios at mid-vital capacity in young healthy adults. *Chest.* 1986;90:857-60.
- <sup>69</sup> Davis PB, Byard PJ, Konstan MW. Identifying treatments that halt progression of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Pediatr Res.* 1997;41:161-65.
- <sup>70</sup> Landau LI, Phelan PD. The spectrum of cystic fibrosis. A study of pulmonary mechanics in 46 patients. *Am Rev. Respir Dis.* 1973;108:593-602.
- <sup>71</sup> Ries AL, Sosa G, Prewitt L, Friedman PJ, Harwood I R. Restricted pulmonary function in cystic fibrosis. *Chest.* 1988;94:575-79.
- <sup>72</sup> Moser C, Tirakitsoontorn P, Nussbaum E, Newcomb R, Cooper DM. Muscle size and cardiorespiratory response to exercise in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Nov;162(5):1823-7.
- <sup>73</sup> Moorcroft AJ, Dodd ME, Webb AK. Long-term change in exercise capacity, body mass, and pulmonary function in adults with cystic fibrosis. *Chest.* 1997 Feb;111(2):338-43.
- <sup>74</sup> Shah AR, Gozal D, Keens TG. Determinants of aerobic and anaerobic exercise performance in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Apr;157(4 Pt 1):1145-50.

- <sup>75</sup> de Meer K, Gulmans VA, van Der Laag J. Peripheral muscle weakness and exercise capacity in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Mar;159(3):748-54.
- <sup>76</sup> Richardson RS, Sheldon J, Poole DC, Hopkins SR, Ries AL, Wagner PD. Evidence of skeletal muscle metabolic reserve during whole body exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Mar;159(3):881-5.
- <sup>77</sup> A statement of the American Thoracic Society and European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Apr;159(4 Pt 2):S1-40.
- <sup>78</sup> Maltais F, Leblanc P, Jobin J, Casaburi R. Peripheral muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Mal Respir*. 2002 Sep;19(4):444-53.
- <sup>79</sup> Sahlberg ME, Svantesson U, Thomas EM, Strandvik B. Muscular strength and function in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2005 May;127(5):1587-92.
- <sup>80</sup> Taivassalo T, De Stefano N, Argov Z, Matthews PM, Chen J, Genge A, Karpati G, Arnold DL. Effects of aerobic training in patients with mitochondrial myopathies. *Neurology*. 1998 Apr;50(4):1055-60.
- <sup>81</sup> Shapiro BL. Evidence for a mitochondrial lesion in cystic fibrosis. *Life Sci*. 1989;44(19):1327-34.
- <sup>82</sup> De Meer K, Jeneson JA, Gulmans VA, van der Laag J, Berger R. Efficiency of oxidative work performance of skeletal muscle in patients with cystic fibrosis. *Thorax*. 1995 Sep;50(9):980-3.
- <sup>83</sup> Selvadurai HC, McKay KO, Blimkie CJ, Cooper PJ, Mellis CM, Van Asperen PP. The relationship between genotype and exercise tolerance in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Mar 15;165(6):762-5.
- <sup>84</sup> Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003 Aug;35(8):1381-95.

- <sup>85</sup> Wasserman K, Van Kessel AL, Burton GG. Interaction of physiological mechanisms during exercise. *J Appl Physiol* 1967;22:71-85.
- <sup>86</sup> Roca J, Burgos F, Sunyer J, Saez M, Chinn S, Anto JM, Rodriguez-Roisin R, Quanjer PH, Nowak D, Burney P. Reference values for forced spirometry. Group of the European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J*. 1998 Jun;11(6):1354-62.
- <sup>87</sup> Aitkens S, Lord J, Bernauer E, Fowler WM, Lieberman JS, Berck P. Relationship of manual muscle testing to objective strength measurements. *Muscle Nerve* 1989;12:173-177.
- <sup>88</sup> Medical Research Council. Aids to the examination of the peripheral nervous system. London: Her Majesty's Stationery Office, 1976;14.
- <sup>89</sup> Sandstedt P, Nordell LE, Henriksson KG. Quantitative analysis of muscle biopsies from volunteers and patients with neuromuscular disorders. A comparison between estimation and measuring. *Acta Neurol Scand*. 1982 Jul;66(1):130-44.
- <sup>90</sup> Srere PA. Citrate synthase. *Methods Enzymol* 1969;13:3-11.
- <sup>91</sup> Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 1994;228, 35-51.
- <sup>92</sup> Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 1985;153:23-36.
- <sup>93</sup> King TE. Preparation of succinate dehydrogenase and reconstitution of succinate oxidase. *Methods Enzymol* 1967;10:322-331.
- <sup>94</sup> Sottocasa GL, Kuylenstierna B, Ernster L, Bergstrand A. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J Cell Biol* 1967;32:415-38.
- <sup>95</sup> Rodriguez-Miguel P, Erickson ML, McCully KK, Harris RA. CrossTalk proposal: Skeletal muscle oxidative capacity is altered in patients with cystic fibrosis. *J Physiol*. 2017 Mar 1;595(5):1423-1425.

- <sup>96</sup> Rosenthal M, Narang I, Edwards L, Bush A. Non-invasive assessment of exercise performance in children with cystic fibrosis (CF) and non-cystic fibrosis bronchiectasis: is there a CF specific muscle defect?. *Pediatr Pulmonol*. 2009 Mar;44(3):222-30.
- <sup>97</sup> Troosters T, Langer D, Vrijsen B, Segers J, Wouters K, Janssens W, Gosselink R, Decramer M, Dupont L. Skeletal muscle weakness, exercise tolerance and physical activity in adults with cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2009 Jan;33(1):99-106.
- <sup>98</sup> Lamhonwah AM, Bear CE, Huan LJ, Kim Chiaw P, Ackerley CA, Tein I. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human muscle: Dysfunction causes abnormal metabolic recovery in exercise. *Ann Neurol*. 2010 Jun;67(6):802-8.
- <sup>99</sup> Selvadurai HC, Allen J, Sachinwalla T, Macauley J, Blimkie CJ, Van Asperen PP. Muscle function and resting energy expenditure in female athletes with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Dec 15;168(12):1476-80.
- <sup>100</sup> Divangahi M, Balghi H, Danialou G, Comtois AS, Demoule A, Ernest S, Haston C, Robert R, Hanrahan JW, Radzioch D, Petrof BJ. Lack of CFTR in skeletal muscle predisposes to muscle wasting and diaphragm muscle pump failure in cystic fibrosis mice. *PLoS Genet*. 2009 Jul;5(7):e1000586.
- <sup>101</sup> Feigal RJ, Shapiro BL. Mitochondrial calcium uptake and oxygen consumption in cystic fibrosis. *Nature*. 1979 Mar 15;278(5701):276-7.
- <sup>102</sup> Feigal RJ, Tomczyk MS, Shapiro BL. The calcium abnormality in cystic fibrosis mitochondria: relative role of respiration and ATP hydrolysis. *Life Sci*. 1982 Jan 4;30(1):93-8.
- <sup>103</sup> Valdivieso AG, Clauzure M, Marín MC, Taminelli GL, Massip Copiz MM, Sánchez F, Schulman G, Teiber ML, Santa-Coloma TA. The mitochondrial complex I activity is reduced in cells with impaired cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function. *PLoS One*. 2012;7(11):e48059.
- <sup>104</sup> Shapiro BL, Feigal RJ, Lam LF. Mitochondrial NADH dehydrogenase in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jun;76(6):2979-83.

- <sup>105</sup> Antigny F, Girardin N, Raveau D, Frieden M, Becq F, Vandebrouck C. Dysfunction of mitochondria Ca<sup>2+</sup> uptake in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Mitochondrion*. 2009 Jul;9(4):232-41.
- <sup>106</sup> Wells GD, Wilkes DL, Schneiderman JE, Rayner T, Elmi M, Selvadurai H, Dell SD, Noseworthy MD, Ratjen F, Tein I, Coates AL. Skeletal muscle metabolism in cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia. *Pediatr Res*. 2011 Jan;69(1):40-5.
- <sup>107</sup> Tu J, Le G, Ballard HJ. Involvement of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the acidosis-induced efflux of ATP from rat skeletal muscle. *J Physiol*. 2010 Nov 15;588(Pt 22):4563-78.
- <sup>108</sup> Quinton PM, Reddy MM. Control of CFTR chloride conductance by ATP levels through non-hydrolytic binding. *Nature*. 1992 Nov 5;360(6399):79-81.
- <sup>109</sup> Hwang TC, Kirk KL. The CFTR ion channel: gating, regulation, and anion permeation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Jan 1;3(1):a009498.
- <sup>110</sup> Dehecchi MC, Girella E, Cabrini G, Berton G. The Km of NADH dehydrogenase is decreased in mitochondria of cystic fibrosis cells. *Enzyme*. 1988;40(1):45-50.
- <sup>111</sup> Valdivieso AG, Marcucci F, Taminelli G, Guerrico AG, Alvarez S, Teiber ML, Dankert MA, Santa-Coloma TA. The expression of the mitochondrial gene MT-ND4 is downregulated in cystic fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 May 11;356(3):805-9.
- <sup>112</sup> Taminelli GL, Sotomayor V, Valdivieso AG, Teiber ML, Marín MC, Santa-Coloma TA. CISD1 codifies a mitochondrial protein upregulated by the CFTR channel. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jan 25;365(4):856-62.
- <sup>113</sup> Ryan TE, Southern WM, Reynolds MA, McCully KK. A cross-validation of near-infrared spectroscopy measurements of skeletal muscle oxidative capacity with phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Dec;115(12):1757-66.
- <sup>114</sup> Erickson ML, Seigler N, McKie KT, McCully KK, Harris RA. Skeletal muscle oxidative capacity in patients with cystic fibrosis. *Exp Physiol*. 2015 Apr 20;100(5):545-52.

- <sup>115</sup> Poore S, Berry B, Eidson D, McKie KT, Harris RA. Evidence of vascular endothelial dysfunction in young patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2013 Apr;143(4):939-45.
- <sup>116</sup> Rodriguez-Miguel P, Thomas J, Seigler N, Crandall R, McKie KT, Forseen C, Harris RA. Evidence of microvascular dysfunction in patients with cystic fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016 Jun 1;310(11):H1479-85.
- <sup>117</sup> Gruet M, Decorte N, Mely L, Vallier JM, Camara B, Quetant S, Wuyam B, Verges S. Skeletal muscle contractility and fatigability in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2016 Jan;15(1):e1-8.
- <sup>118</sup> Werkman M, Jeneson J, Helders P, Arets B, van der Ent K, Velthuis B, Nievelstein R, Takken T, Hulzebos E. Exercise oxidative skeletal muscle metabolism in adolescents with cystic fibrosis. *Exp Physiol*. 2016 Mar;101(3):421-31.
- <sup>119</sup> Decorte N, Gruet M, Camara B, Quetant S, Mely L, Vallier JM, Verges S, Wuyam B. Absence of calf muscle metabolism alterations in active cystic fibrosis adults with mild to moderate lung disease. *J Cyst Fibros*. 2017 Jan;16(1):98-106.
- <sup>120</sup> Stein L, Pacht C, Junge S, Kaeding TS, Kück M, Maassen N, Wittke T, Shushakov V. Skeletal Muscle Function in Young Patients With Cystic Fibrosis. *Pediatr Exerc Sci*. 2016 Aug;28(3):364-73.
- <sup>121</sup> Hulzebos HJ, Jeneson JA, van der Ent CK, Takken T. CrossTalk opposing view: Skeletal muscle oxidative capacity is not altered in cystic fibrosis patients. *J Physiol*. 2017 Mar 1;595(5):1427-1428.