

# III CONVENTION D'AUTUNNO DEI RICERCATORI ITALIANI IN FIBROSI CISTICA

**18-19 ottobre 2005. Centro Culturale Marani, Ospedale Maggiore,  
Verona**

Dal 2002 al 2005 sono stati presentati alla Fondazione FFC, con richiesta di finanziamento, 110 progetti riguardanti le seguenti aree di ricerca: 1) Proteina CFTR e nuove terapie per risolvere il difetto di base 2) Batteri emergenti e infezione respiratoria 3) Infiammazione polmonare 4) Genetica molecolare applicata alla diagnosi 5) Ricerca clinica. Hanno ottenuto il finanziamento (con un investimento complessivo da parte della Fondazione di 2.350.00 euro) 53 progetti.

La selezione è avvenuta in questo modo: ogni progetto è stato sottoposto al parere di almeno due esperti internazionali indipendenti. Più di 100 esperti hanno sinora collaborato a questo processo. I ricercatori italiani coinvolti nei progetti sono più di 300, distribuiti in 71 laboratori o centri di ricerca.

Sono state prodotte 26 pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali, 72 comunicazioni in congressi scientifici. La maggior parte delle ricerche è in fase di svolgimento. Alcuni risultati possono essere considerati decisamente buoni, in particolare gli avanzamenti nel campo della correzione farmacologia della proteina difettosa e nell'identificazione di nuove mutazioni, tappa indispensabile, oltre che per altri scopi, alla realizzazione di un progetto di screening dei portatori FC.

Il 18 e 19 ottobre la Fondazione ha organizzato l'incontro dei ricercatori, che hanno presentato l'andamento e i risultati dei loro progetti.

A proposito di ricerca scientifica, Luciano Vettore ha scritto (Notiziario FFC n. 12, aprile 2005): *“Sicuramente le scoperte richiedono talento e anche un po' di fortuna; in realtà, ogni scoperta dopo che è stata fatta sembra scontata, quasi banale; molti altri prima dello scopritore si erano imbattuti nello stesso fenomeno, ma non lo avevano riconosciuto o correttamente interpretato: il merito dello scienziato di talento è quello di vedere ciò che altri non hanno visto; ma perché ciò accada è necessario che concorrano più circostanze favorevoli, alcune delle quali sono casuali, ma molte possono (e debbono) essere preordinate. Oggi ogni scoperta è frutto di un lavoro di gruppo: anche se ancora e sempre le idee geniali sono appannaggio di pochi, non esiste più la figura del ricercatore solitario e i risultati vengono quando si ha la capacità di mettere in comune volontà, intelligenze, impegno. Perché ciò accada molti altri, oltre al ricercatore, debbono farsi carico della ricerca scientifica. Serve un'organizzazione efficiente e risorse adeguate. E non si possono fare soltanto le ricerche con risultati positivi garantiti, semplicemente perché queste non esistono. In questo senso la ricerca è anche una scuola di umiltà perché ogni ricercatore deve accettare il rischio dell'insuccesso. E affinché tale rischio-sempre presente-sia previsto e contenuto, è necessario un estremo rigore intellettuale ed etico, una grande attenzione e capacità di valutazione critica di ciò che si vuole studiare e di ciò che si crede di scoprire.”*

Chi riporta queste frasi ed è stato invitato a scrivere un commento sulla Convention è un collaboratore della Fondazione: è quindi evidente l'esistenza di un “conflitto di interessi” che può limitare l'imparzialità di una valutazione che è tutta positiva. Questo collaboratore si occupa però di divulgazione scientifica e in questa veste si sente di rappresentare una specie di anello di congiunzione fra le famiglie dei malati e la ricerca scientifica e di poter fare un breve commento “dalla finestra”.

Il ruolo che la Fondazione si è data in questi anni è quello di predisporre in senso metodologico e organizzativo le “circostanze favorevoli” di cui parla Vettore, al fine di poter fare in Italia della ricerca scientifica di qualità. Nello svolgimento di questo ruolo la Fondazione ha stimolato competitività, ha favorito collaborazioni fra gruppi di ricerca situati in centri e istituzioni di diverse

località, ha creato (e questo è stato particolarmente evidente nel corso dei lavori della Convention) un clima di scambio di conoscenze, di aggregazione e impegno; ha operato e intende operare, se le sarà possibile, in futuro (è stato stimato che per dare un impulso più decisivo alle ricerche dovrebbero essere messi insieme nel 2006 almeno 2 milioni di euro) con queste caratteristiche: selezione e rigore scientifico, serietà e trasparenza.

Per questo la Fondazione può dire ai suoi sostenitori finanziari: ecco dove sono andati a finire i vostri soldi. Ai ricercatori: è premiato il merito, non interessano gli schieramenti e le strategie di potere.

Alle famiglie dei malati: siamo sulla buona strada, anche in Italia si può fare della buona ricerca e si possono sperare brillanti risultati.

*Dr Graziella*

*Borgo*

*Per dare una idea panoramica dei temi affrontati nella Convention, riportiamo un sommario delle presentazioni introduttive redatto dai moderatori delle cinque sessioni in cui si è articolato l'incontro.*

### **I Sessione: GENETICA MOLECOLARE**

*Moderatore: Prof. Pierfranco Pignatti Direttore Sezione di Biologia e Genetica; Dipartimento Materno-Infantile, Università di Verona*

In questa sessione sono stati presentati 9 progetti di gruppi di ricerca italiani sui principali aspetti genetici della fibrosi cistica. Le ricerche mostrano come le mutazioni nel gene CFTR portate da una persona possono avere una correlazione con il fenotipo determinato, cioè con le manifestazioni cliniche dei casi di fibrosi cistica tipici, di quelli atipici e dei casi di patologie cosiddette "correlate" (cioè condizioni sostenute dal gene CFTR mutato, ma con manifestazioni assai limitate della fibrosi cistica classica), come la ipertripsinemia neonatale e la sterilità maschile. Non sono invece state identificate mutazioni del gene CFTR in una patologia potenzialmente "correlata" ed indagata con uno specifico progetto finanziato dalla Fondazione: una forma di calcolosi renale con iperossaluria e ipocitraturia **Lupo**, Verona).

Sono state identificate nuove mutazioni che permettono di migliorare l'analisi genetica in fibrosi cistica (**Castaldo**, Napoli, **Rosatelli**, Cagliari). Lo studio di un tipo particolare di mutazioni del gene della fibrosi cistica, dovute a difetti di maturazione dell'RNA messaggero (**Pagani**, Trieste, **Strom**, Roma), indica che anche mutazioni CFTR che non alterano direttamente gli aminoacidi nella proteina CFTR possono essere causa di malattia, e vanno perciò analizzate con attenzione, e che è possibile intervenire in altri geni che regolano la maturazione dell'RNA per tentare di correggere il difetto. Sono stati identificati alcuni tipi di espressione genica coordinata da più geni, che correlano con diversi genotipi CFTR, ed alcuni geni che si associano a particolari segni clinici della fibrosi cistica, come la ostruzione intestinale o la poliposi nasale (**Novelli**, Roma).

Sono stati riportati esperimenti per la determinazione di mutazioni del feto mediante analisi del DNA del feto circolante nel sangue materno (**Cremonesi**, Milano): queste analisi avrebbero il vantaggio di poter essere effettuate con maggiore facilità e minor rischio rispetto ad analisi

genetiche dirette sul feto (con la cosiddetta “villocentesi”). Infine, sono stati discussi approcci terapeutici innovativi basati su estratti di piante medicinali o su interventi con molecole che possono ingannare il sistema genetico cellulare a vantaggio del paziente (**Gambari**, Ferrara).

## II Sessione: **FISIOPATOLOGIA CFTR E TERAPIE DEL DIFETTO DI BASE**

*Moderatore: Prof. Antonio Cao Direttore Istituto di Neurogenetica e Neurofarmacologia del CNR, Università di Cagliari. Presidente Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica.*

Nella sessione sulla fisiopatologia della proteina CFTR e sugli interventi correttivi del difetto di base sono stati presentati e discussi diversi lavori scientifici concernenti due categorie fondamentali di ricerca, con rilevanza clinica nel campo della fibrosi cistica. Una prima categoria ha riguardato la fisiopatologia della proteina CFTR contenente la mutazione  $\Delta F508$ , la più frequente mutazione CF in quasi tutte le popolazioni, ed i tentativi farmacologici e non farmacologici di correzione di questo difetto.

Grande interesse hanno suscitato quelle ricerche riguardanti il ruolo di proteine cellulari nel condizionare la localizzazione della proteina CFTR sulla superficie cellulare, ove essa può espletare la sua funzione di canale del cloro. La aumentata espressione di una di queste proteine, che ha funzioni di scambio Iodio/Idrogeno, è risultata capace di ripristinare l'espressione apicale del gene CFTR contenente la mutazione comune  $\Delta F508$  e di stimolarne le residue funzioni di canale del cloro (progetto di **Valeria Casavola** di Bari).

Del pari, di estrema rilevanza sono state un gruppo di ricerche che hanno portato ad individuare delle sostanze chimiche (tra cui le 1-4 diidropiridine), già in uso per altri scopi nell'uomo (il trattamento dell'ipertensione nel caso delle diidropiridine), capaci di stimolare l'attività del canale CFTR mutato per il trasporto del Cloro. Nella stessa linea, lo stesso gruppo di ricercatori ha anche individuato attraverso lo screening di un vastissimo numero di sostanze chimiche non ancora usate nell'uomo diversi composti (tra cui ariltiazoli e bisaminometil-bitiazoli) capaci di indurre la localizzazione nella membrana del CFTR contenente la mutazione  $\Delta F508$  e di stimolare la sua capacità, come quella di altri geni mutati, di regolare il trasporto del cloro (**Luis Galletta** di Genova). Queste ricerche non hanno ancora implicazioni pratiche ma aprono la strada verso il trattamento farmacologico di mutazioni del CFTR in modo specifico.

L'altra categoria di ricerche ha riguardato la terapia genica, di cui distinguiamo due varianti: quella additiva, in cui si aggiunge un gene normale alle cellule contenenti un gene mutato, e quella sostitutiva, in cui si corregge tramite un processo chiamato ricombinazione omologa le sequenze DNA del gene malato con sequenze normali introdotte con particolari meccanismi nelle cellule (**Federica Sangiuolo**, Roma). Per quanto riguarda la terapia genica additiva, risultati promettenti si sono osservati con l'uso di vettori lentivirali che sono stati capaci di penetrare con efficienza entro le cellule dell'epitelio respiratorio e di permanere in esse per un periodo prolungato sia pure dopo una fase di silenziamento (**Massimo Conese** di Milano, e **Giulio Cabrini** di Verona).

Nel complesso si può ragionevolmente concludere che nel campo della terapia innovativa con approcci diversi si vanno realizzando, grazie anche al supporto della Fondazione, importanti sia pur lenti progressi, che consentono di esprimere un cauto ottimismo per il futuro.

## III Sessione: **RICERCA CLINICA ED EPIDEMIOLOGICA**

*Moderatore: Dr Roberto Buzzetti Specialista in Statistica Medica, esperto in Epidemiologia e in EBM. Membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica*

La sessione ha potuto spaziare dalla epidemiologia genetica, alla tipizzazione con tecniche di biologia molecolare dei germi patogeni, alle implicazioni cliniche, come il diabete, la malattia epatiche; fino allo studio della qualità della vita e ai problemi del registro italiano fibrosi cistica.

La distribuzione delle mutazioni genetiche presenti sul gene CFTR coinvolto nella patologia della Fibrosi Cistica (FC) mostra una grande variabilità geografica tra le popolazioni del mondo, dell'Europa e a livello nazionale. In Italia si possono identificare 4 raggruppamenti che coinvolgono le regioni nord-orientali, nord-occidentali, centro-meridionali e Sardegna. Obiettivo del progetto di **Piazza** (Torino): aggiornare le frequenze delle mutazioni nelle regioni italiane, e inserire queste informazioni in uno scenario europeo, anche per valutarne l'origine ancestrale in rapporto ai movimenti delle popolazioni nella storia dell'Europa.

Come è noto, le infezioni polmonari sono la principale causa di morbilità e mortalità e la colonizzazione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) è associata a un lento ma progressivo decremento della funzionalità polmonare. Il 29% dei pazienti tra 2 e 5 anni e l'81% dei pazienti tra i 26 e i 30 anni sono colonizzati da Pa, e l'eradicazione del germe è possibile solo con un trattamento antibiotico precoce, tuttavia i pazienti sottoposti a terapia eradicante possono essere nuovamente colonizzati da Pa. Il progetto di **Taccetti** (Firenze) si propone principalmente di determinare il periodo durante il quale il paziente, sottoposto con successo a trattamento antibiotico eradicante, rimane libero da Pa; e studiare le successive colonizzazioni da Pa in pazienti sottoposti a terapia eradicante: si tratta di ceppi nuovamente acquisiti o di crescita di ceppi preesistenti non eradicati?

Sempre di *Pseudomonas* si occupa il progetto di **Manno** (Genova), con lo scopo di operare una comparazione tra epidemiologia italiana ed europea e di studiare la diversità genetica tra Pa isolati da FC, da altre infezioni e da fonti ambientali.

Un'altra causa di infezioni ospedaliere e comunitarie, anche in pazienti FC, è lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA). **Campana** e collaboratori (Firenze) si pongono una serie di obiettivi, tra cui la valutazione della sensibilità agli agenti antimicrobici, lo studio dell'epidemiologia molecolare dei ceppi MRSA, delle vie di trasmissione, in vista di un chiarimento sulla storia naturale dell'infezione, e dell'instaurazione di opportune misure di prevenzione, monitoraggio e terapia.

Con il protrarsi della sopravvivenza, diabete mellito e intolleranza al glucosio sono divenute complicanze comuni della FC, con effetto negativo sullo stato clinico e l'attesa di vita. Il trattamento precoce con insulina sarebbe utile nel diabete in FC, ma mancano indicazioni chiare per la selezione dei pazienti e il tipo di intervento. Manca in particolare la chiarezza delle conoscenze sulla storia naturale del diabete in FC, e sul peso relativo dei difetti della secrezione insulinica e della resistenza all'insulina, e sull'effetto del trapianto di polmone e fegato sulla tolleranza al glucosio. A queste carenze conoscitive vorrebbero avviare gli studi di **Colombo** (Milano).

**Strazzabosco** (Padova e Bergamo) invece è interessato alle manifestazioni cliniche dell'epatopatia, che riguardano il 30% dei pazienti FC e sono in grado di comprometterne sopravvivenza e qualità di vita. La terapia farmacologica dell'epatopatia attualmente è limitata all'acido Ursodeossicolico (UDCA), di cui sono poco noti i meccanismi di azione. Il progetto presentato vorrebbe chiarire tale meccanismo, ma anche studiare nuovi approcci terapeutici: sarà forse possibile stimolare la secrezione biliare sfruttando vie secretorie alternative a quella del CFTR; ad esempio utilizzando gli effetti della Glibenclamide, oggi utilizzato come farmaco antidiabetico.

La qualità della vita (QDV), da tutti sempre citata, è l'oggetto del progetto che fa capo a **Nobili** (Milano). Nonostante l'importanza di conoscere la percezione soggettiva dei pazienti in termini di "disabilità" e benessere, attualmente disponiamo di pochi strumenti adatti all'età evolutiva.

Uno strumento francese, un questionario, è in grado di misurare le dimensioni della QDV: esso si compone di alcune "aree" generiche (sintomi fisici, emotività, ruolo sociale, vitalità, socialità e percezione della salute) e altre specifiche per FC (immagine corporea, disturbi dell'alimentazione, interferenza delle cure, sintomi respiratori, sintomi digestivi e peso). Si vuole pertanto tradurre e validare il questionario nella realtà italiana per un utilizzo sia clinico sia di ricerca.

Infine il progetto di **Bossi** (Milano) sul Registro Italiano FC (RIFC). Dal 1988 RIFC censisce i pazienti FC (più di 4.300) per quanto riguarda dati anagrafici, modalità di diagnosi, tipizzazione genetica e anamnesi. Dal 1998 sono stati aggiunti i dati su follow-up clinico (trapianto d'organo, complicanze, spirometria, dati antropometrici e microbiologici); ma purtroppo le informazioni sono incomplete e non tutte di qualità. Si è resa necessaria la figura di un "data manager" che coordinasse il lavoro di raccolta e invio dei dati da parte dei Centri. Questo progetto contribuirà in modo decisivo a rivedere le modalità di raccolta ed inserimento dati, correggere e recuperare le informazioni essenziali, aumentare la qualità delle informazioni di carattere demografico e relative alla diagnosi, recuperare dati mancanti relativi al follow-up. Permetterà inoltre di studiare un gruppo di pazienti particolarmente interessanti, come quelli diagnosticati in età adulta (10%).

#### IV Sessione: **MICROBIOLOGIA E INFEZIONE**

*Moderatore: Dr Vittorio Venturi Responsabile laboratorio di di Batteriologia dell'International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Padriciano Trieste*

I pazienti affetti da fibrosi cistica possono andare incontro ad infezioni polmonari molto serie, che spesso degenerano in infezioni permanenti, dovute a batteri patogeni opportunisti. Questi si adattano in maniera molto efficiente al microambiente presente nei tessuti polmonari fibrocistici formando comunità batteriche stabili e difficilmente eradicabili a causa della resistenza di questi microorganismi agli antibiotici conosciuti. Diverse specie batteriche si sono dimostrate associate a queste infezioni, le più comuni e gravi sono normalmente causate da *Pseudomonas aeruginosa* e da specie appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (BCC). La sfida attuale per gli scienziati coinvolti nella ricerca su questa malattia, ed in particolare di quelli che la studiano dal punto di vista microbiologico, è quella di capire i meccanismi che permettono ai batteri l'adattamento all'ambiente polmonare e di individuare i passaggi da "colpire" con nuove molecole per rendere questa colonizzazione, e la conseguente infezione, meno efficiente. I progetti finanziati dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica presentati nella sessione "Microbiologia ed Infezione" sono concentrati su questo tipo di studio.

Il progetto coordinato dal dott. **G. Bertoni**, di Milano (FFC #10/2004) conta di identificare e disegnare molecole di RNA antisense che potrebbero impedire la traduzione di proteine essenziali per *P. aeruginosa* impedendogli così la crescita. Questo tipo di strategia è anche studiata ed utilizzata sulle cellule eucariotiche, sia animali che vegetali. In condizioni di laboratorio sono 306 i geni identificati come essenziali in *P. aeruginosa* ed è perciò possibile che le proteine associate a questi geni possano essere dei possibili "target" per nuovi composti antimicrobici.

Il progetto coordinato dalla dott. **A. Bevivino** di Roma (FFC #11/2004) prevede test effettuati *in vitro* e su modelli animali atti a valutare la patogenicità di isolati clinici ed ambientali di batteri appartenenti al BCC. I primi risultati hanno confermato un maggior grado di virulenza dei ceppi clinici, probabilmente dovuta all'adattamento che questi hanno "sopportato" per adeguarsi al microambiente polmonare.

Il progetto seguito dalla dott. **A. Bragonzi** di Milano (FFC #8/2003) ha lo scopo di studiare l'adattamento di *P. aeruginosa* alle condizioni di anaerobiosi, in quanto si ritiene che questa sia la condizione che i batteri inglobati nel biofilm si trovano ad affrontare durante l'infezione polmonare. Attualmente si ritiene che lo stress anaerobico innalzi la produzione di esopolisaccaridi da parte di *P. aeruginosa* e riduca la sua motilità.

Attenzione e' rivolta anche ad individuare rapidamente quali sono i batteri coinvolti in una certa infezione polmonare ed e' questo l'oggetto di ricerca coordinato dal dott. **R. Fani** di Firenze (FFC #9/2003), che sta cercando un metodo rapido ed economico per discriminare fra i batteri del *Burkholderia cepacia* complex (BCC) responsabili dell'infezione.

La ricerca coordinata dalla dott. **G. Riccardi** di Pavia (FFC #12/2004) e' focalizzata sullo studio di determinate molecole proteiche che formano delle pompe di efflusso situate sulla membrana batterica interna. Queste pompe si occupano di espellere le molecole antibiotiche presenti all'interno della cellula, e stanno ricevendo un'attenzione crescente da parte del mondo scientifico, in quanto la resistenza agli antibiotici da parte di questi microorganismi e' un problema molto grave nella lotta alle infezioni da loro causate.

Il progetto coordinato dal dott. **V. Venturi** di Trieste, Padriciano (FFC #10/2003, #9/2005) riguarda lo studio della comunicazione cellulare batterica, sia in *Pseudomonas* che in *Burkholderia*, in un processo noto come "Quorum Sensing". Questo sistema di comunicazione e' legato alla densita' cellulare della comunita' batterica e permette l'espressione coordinata di determinati geni, tra i quali quelli che determinano la virulenza e la formazione del biofilm (cosi' si chiama l'insieme di microcolonie batteriche difese entro una speciale pellicola gelatinosa, ndr). L'inattivazione del sistema Quorum Sensing renderebbe le comunita' batteriche molto meno aggressive e piu' suscettibili alle cure antibiotiche. Questo progetto, approfittando del fatto che specie di *Pseudomonas* e del *Burkholderia* BCC possono infettare sia specie animali che vegetali utilizzando lo stesso set di enzimi e fattori di virulenza, prevede anche la messa in opera di un modello di infezione vegetale che permetta un rapido screening per l'individuazione di tutti i fattori coinvolti nella patogenicita', colonizzazione e virulenza.

Infine la dott.ssa **B. Colonna** di Roma sta studiando, all'interno del progetto FFC #7/2005, i fattori di virulenza di un altro microorganismo patogeno emergente: *Stenotrophomonas maltophilia*. La ricerca cerchera' di individuare le proteine indotte (i) dalle alte temperature associate all'ambiente polmonare fibrocistico e (ii) dalla crescita in biofilm. L'individuazione di queste proteine e' il primo passo per l'isolamento e/o il disegno di nuovi composti antimicrobici.

#### V Sessione: **INFIAMMAZIONE**

**Moderatore: Prof. Giorgio Berton** *Direttore Sezione di Patologia Generale, Dipartimento di Patologia, Università di Verona. Membro del Comitato Scientifico della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica.*

I meccanismi polmonari di difesa contro agenti patogeni sono basati sia su fattori solubili presenti in quello che viene chiamato liquido di superficie delle vie aeree ("airway surface liquid" (ASL) degli autori inglesi) sia sull'azione di cellule, innanzitutto i macrofagi alveolari, presenti nelle vie aeree. L'ASL contiene diverse proteine ad attività anti-batterica che rappresentano una prima linea di difesa aspecifica contro le infezioni. Interagendo direttamente con componenti superficiali di diversi microrganismi i macrofagi alveolari, ma anche le cellule epiteliali delle vie aeree, vengono attivate a produrre diverse molecole biologicamente attive – in particolare citochine - il cui ruolo è quello di indurre il reclutamento dal sangue periferico di cellule delle difese innate, in particolare granulociti e cellule dendritiche, che svolgono un ruolo rispettivamente effettore (microbicida) e regolatore dello sviluppo della risposta immunitaria.

L'infiammazione polmonare rappresenta, come in altri distretti dell'organismo, una risposta finalizzata ad eradicare l'agente patogeno, ma, al tempo stesso comporta il rilascio di molecole quali derivati tossici dell'ossigeno, enzimi litici, derivati dei fosfolipidi di membrana, che determinano danno alle cellule del tessuto e innescano il processo della fibrosi, vale a dire la formazione di tessuto di tipo cicatriziale costituito da fibre collagene, che danneggia progressivamente la fine architettura del parenchima polmonare alterando infine la sua irrorazione e

gli scambi gassosi. Proprio per questa sua doppia natura protettiva, ma anche dannosa, la risposta infiammatoria è stata classicamente definita una “lama a doppio taglio”.

Vi è un generale consenso che nei soggetti affetti da fibrosi cistica (CF) la risposta infiammatoria è sì indotta dalle ricorrenti infezioni dovute alle caratteristiche alterazioni del muco bronchiale dovute al difetto di funzione della CFTR, ma risulta anche eccessiva diventando responsabile del danno polmonare. Questa nozione identifica il controllo dell’infiammazione polmonare come un possibile importante obiettivo terapeutico per limitare la progressione della malattia. La comprensione dei meccanismi che regolano questa risposta infiammatoria, sia in senso di induzione che di controllo negativo sono quindi essenziali per l’identificazione di nuovi bersagli terapeutici.

Alcuni gruppi di ricercatori italiani finanziati dalla FFC stanno affrontando il problema delle difese anti-batteriche del polmone e dei meccanismi di induzione e regolazione della risposta infiammatoria con ricerche di grande interesse. **Dehecchi** (Verona), **Zazzeroni** (L’Aquila) e **Raia** (Napoli) stanno indagando i meccanismi di trasduzione del segnale che regolano la trascrizione di geni implicati nella sintesi di citochine pro-infiammatorie. Nel complesso, le ricerche condotte dimostrano chiaramente che cellule esprimenti CFTR mutata esprimono citochine a livelli più elevati di cellule normali e ciò è dovuto ad una abnorme attivazione di due meccanismi di regolazione della trascrizione genica, rappresentati dal fattore di trascrizione NF-κB (**Dehecchi e Zazzeroni**) o dalla MAP chinasi p38 (**Raia**). Di rilievo è l’osservazione che, *in vitro*, farmaci già identificati come in grado di correggere l’alterazione di CFTR DF508 (**Dehecchi**), l’inibizione di NF-κB (**Zazzeroni**) e inibitori della p38 (**Raia**) inibiscono efficacemente la produzione di molecole pro-infiammatorie. La trasduzione del segnale risultante nell’attivazione di NF-κB viene anche indagata nel contesto dell’effetto terapeutico dell’antibiotico azitromicina (AZM), non dovuto alla sua azione anti-microbica (**Melotti**, Verona). Questi studi hanno confermato un’abnorme attivazione di NF-κB in cellule CF e suggeriscono che AZM possa regolare negativamente la produzione di citochine pro-infiammatorie; inoltre, questo stesso gruppo ha iniziato interessanti studi tesi ad identificare, mediante analisi massiva dell’espressione genica, geni modulati da AZM. Il ruolo di AZM come molecola in grado di modulare eventi CFTR-dipendenti verrà studiato all’interno di un progetto finanziato nel 2005 e teso a chiarire l’effetto di AZM e altri macrolidi sul trasporto ionico CFTR-mediato in cellule muscolari cardiache (**Giordano**, Cesena -Bologna).

Un importante aspetto della regolazione del processo infiammatorio è quello rappresentato dalla sua inibizione mediante molecole endogene, prodotte cioè dall’organismo stesso. Due diversi gruppi stanno indagando rispettivamente il ruolo di una proteina chiamata SOCS-3 (**Bazzoni**, Verona) e di un particolare derivato dell’acido arachidonico, la lipoxina A4 (**Romano**, Chieti), come regolatori negativi della risposta infiammatoria indotta da derivati microbici. SOCS-3 è stato identificato come un importante inibitore dell’attivazione di granulociti neutrofilici e la comprensione dei meccanismi molecolari della sua azione potrebbe consentire l’identificazione di nuovi bersagli terapeutici. La lipoxina A4 è già stata identificata come inibitore infiammatorio la cui produzione è alterata nella CF e interessanti sviluppi potrebbero derivare da un’analisi dettagliata del suo effetto su cellule normali e CF. Siccome uno dei meccanismi del danno infiammatorio è basato sulla produzione di radicali tossici dell’ossigeno, potrebbero essere di rilievo ricerche finanziate nel 2005 (**Pompella**, Pisa), e tese a chiarire l’interrelazione tra sostanze anti-ossidanti (glutazione, vitamina C) e la regolazione del loro ingresso in cellule epiteliali.

Il liquido di superficie delle vie aeree (ASL) svolge un ruolo importante nelle difese contro l’infezione polmonare. Un’analisi dettagliata delle proteine presenti nel ASL di soggetti normali e affetti da CF, e della modulazione della loro sintesi, da parte di citochine pro-infiammatorie è stata iniziata da un paio d’anni (**Zegarra-Moran**, Genova) e ha portato all’identificazione di almeno 180 polipeptidi, la cui caratterizzazione e analisi comparata in condizioni normali e patologiche può rappresentare una tappa importante per l’identificazione di nuovi bersagli terapeutici. In

connessione con questi studi, un progetto finanziato nel 2005 (**Biassoni**, Genova) si propone di caratterizzare in dettaglio due peptidi ad attività anti-microbica presenti nel ASL.

## **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE SULLA CONVENTION**

Fare a termine di un congresso delle considerazioni conclusive è un'arte estremamente difficile. Tenterò di fare del mio meglio, ma voglio sottolineare immediatamente che l'analisi critica che farò può essere falsata dai miei interessi primari per la ricerca clinica genetico-molecolare. Credo di interpretare l'impressione di tutti i congressisti dicendo che abbiamo partecipato a due giornate estremamente interessanti e stimolanti sotto il profilo intellettuale.

In tutte le aree di ricerca sulla fibrosi cistica presentate sono state discusse alcune ricerche di notevole rilievo. Nell'ambito della fisiopatologia e della genetica molecolare vorrei citare gli studi riguardanti i processi di splicing del RNA, le analisi mutazionali tese a definire i microarrangiamenti e le mutazioni associate a difetto di splicing, le interazioni tra CFTR ed altre proteine cellulari, lo screening di farmaci capaci di attivare con modalità diverse il CFTR affetto da mutazioni specifiche, i progressi lenti ma continui della terapia genica. L'analisi dei geni modificatori del fenotipo è estremamente ardua e necessita di vaste casistiche per dare risultati concreti. Nel campo della clinica va ribadito il ruolo del registro italiano dei pazienti CF, tramite il quale si sta realizzando uno studio interessante sui pazienti diagnosticati in età adulta, dimostrando come, in queste forme a diagnosi tardiva, si tratti per lo più di forme attenuate della malattia. Nel campo della microbiologia e della infiammazione le novità di rilievo hanno riguardato l'individuazione di geni cruciali per la virulenza di *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* con la tecnica del RNA antisense, che potrebbero a lungo termine consentire di individuare nuovi tipi di molecole ad azione antibiotica, lo sviluppo possibile di composti che inibiscano il quorum sensing, e l'analisi dei meccanismi della risposta iperinflammatoria tipica del paziente CF, lo studio di molecole a potenziale attività antinfiammatoria ed infine l'analisi con tecnologie raffinate del liquido alla superficie degli epitelii respiratori.

Va sottolineato che in tutti i campi è stato fatto largo uso di nuove tecniche, tra cui l'analisi con "microarray" di DNA ed RNA, analisi di proteomica e studi di silenziamento in vitro di geni specifici con la tecnica della RNA interferenza.

Nel complesso si può ritenere, anche dalla valutazione delle ricerche pubblicate, che i ricercatori finanziati dalla Fondazione stiano contribuendo allo sviluppo delle nostre conoscenze nell'ambito della CF.

Un altro aspetto positivo è quello dello sviluppo di nuove collaborazioni tra gruppi con competenze diverse, fenomeno questo che è stato certamente stimolato dagli incontri organizzati dalla Fondazione. In sostanza quindi un bilancio positivo per la ricerca, per il quale dobbiamo ringraziare in modo particolare il Presidente Vittoriano Faganelli e il Direttore Scientifico della Fondazione per la ricerca sulla Fibrosi Cistica, Gianni Mastella.

