

Notizie

FFFC

FONDAZIONE PER LA RICERCA SULLA FIBROSI CISTICA ONLUS
 Italian Cystic Fibrosis Research Foundation
 Presso Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona

N. 6 AGOSTO 2003

Bolettino quadrimestrale della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica Onlus

Settimana della Ricerca Italiana per la Fibrosi Cistica

20-26 ottobre 2003

Sta prendendo forma il grande evento che la Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, in collaborazione con la Lega Italiana Fibrosi Cistica, organizza quest'anno **dal 20 al 26 ottobre**. Dopo anni di attività diversificate, la Fondazione ha deciso di intraprendere la strada della comunicazione al fine di creare verso il grande pubblico più conoscenza della fibrosi cistica e dei suoi bisogni di ricerca. Questo intenso programma intende porre solide fondamenta a sostegno della ricerca e della raccolta di fondi da destinare a progetti avanzati rigorosamente selezionati da commissioni di esperti internazionali. Attraverso il programma di comunicazione, affidato al coordinamento dell'agenzia Del Debbio srl e alla creatività delle agenzie Alkimia e Millimetro di Milano, abbiamo come obiettivo per questo primo anno quello di creare una base di notorietà intorno alla malattia ed alla ricerca ad essa connessa, sulla quale costruire poi azioni diversificate durante tutto l'anno.

Informazione dunque innanzitutto. Informare per raccogliere fondi. Informare per divulgare l'enorme lavoro di ricerca in continua evoluzione. Informare per prevenire e curare. Informare per trovare solidi alleati che possano permettere la continuità del lavoro di ricerca e in definitiva la sconfitta della malattia.

Il concetto scelto per la campagna di comunicazione è quello del 'realizza i tuoi sogni'.



20-26 ottobre settimana della ricerca italiana per la fibrosi cistica

Vorrei.

- respirare senza tossire
- correre a perdifiato
- fare il pilota da grande
- diventare un papà e poi un nonno
- non fare più fisioterapia
- non prendere più medicine
- viaggiare senza dovermi curare
- non andare più in ospedale
- guarire dalla fibrosi cistica

I tuoi sogni hanno un prezzo. Dacci il tuo contributo.

In questo numero

Settimana della Ricerca Italiana CF	pag. 1
La grande competizione italiana	pag. 2
Stato di avanzamento dei progetti finanziati nel 2002	pag. 5
Report sul Seminario di Primavera	pag. 8
Convention d'Autunno dei ricercatori italiani CF	pag. 14
Convegno Gruppo Italiano Fibrosi Cistica	pag. 14
Laboratori Italiani dedicati alla ricerca CF:	
il laboratorio del S. Raffaele di Milano	pag. 15
Il percorso formativo CF: concluso il 5° modulo	pag. 16
Echi dal Congresso Europeo Fibrosi Cistica - Belfast	pag. 16
I pionieri della ricerca in Fibrosi Cistica: Paul Quinton	pag. 19

Appuntamenti autunno 2003

25- 27 settembre	6° Modulo Percorso Formativo CF - Verona
16-19 ottobre	17° Congresso CF Nord America Anaheim - California
20-26 ottobre	Settimana Ricerca Italiana CF
13 novembre	Convegno Gruppo Studio Italiano CF - Verona
14-15 novembre	Convention Ricercatori Italiani CF (15 nov. Sessione per laici) - Vr
15 novembre	Simposio su "Nutrizione artificiale e fibrosi cistica" - Trieste
28 novembre	3° Modulo Corso Fisioterapisti CF - Verona

La Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica collabora con la Lega Italiana Fibrosi Cistica

I suoi sogni hanno un prezzo. Vorrei. Dacci il tuo contributo

IL PROGRAMMA DI COMUNICAZIONE

- Campagna stampa su periodici e quotidiani durante la settimana dal 20 al 26 ottobre 2003.
- Spot tv durante la settimana sulle reti Mediaset.
- Spot radiofonico durante la settimana sulle maggiori emittenti nazionali.
- Serata di beneficenza promossa da Mediaset.
- Annunci all'interno dei telegiornali.
- Presenza di rappresentanti della Fondazione durante trasmissioni tv.
- Organizzazione di una conferenza stampa per il lancio dell'iniziativa e attività di relazioni pubbliche durante il periodo.
- Annuncio e locandina elettronica dell'iniziativa su alcuni siti internet (www.fibrosicisticaricerca.it, www.tgcom.it, www.fibrosicistica.it, home page del sito "Cene di beneficenza" organizzate su base locale).

IL PROGRAMMA DI RACCOLTA FONDI

- Donazioni attivabili attraverso numero verde, che verrà fatto conoscere diffusamente
- Organizzazione di grandi cene di sostegno in varie città italiane dedicate a raccolta fondi
- Vendita di oggetti significativi in alcune piazze e centri commerciali di varie province
- Iniziative creative locali da parte delle Delegazioni della Fondazione e di Gruppi di Volontariato

Le caratteristiche chiave del messaggio su cui si è lavorato sono state la positività, la speranza, l'emozionalità, un futuro possibile, la sollecitazione, il coinvolgimento personale e la motivazione alla mobilitazione. Realizzare il sogno di un malato di fibrosi cistica vuol dire trovare una cura, possibile solo mediante la Ricerca.

*La Fondazione
attende volontari
disponibili
ad attivarsi
per le iniziative
di raccolta fondi
nella settimana:
si prega contattare
gli incaricati
della Fondazione
al n. 045 807 3599
o via e-mail
fondazione.ricercafc
@azosp.vr.it*

La grande competizione italiana *per la ricerca sulla fibrosi cistica*

analisi e selezione dei progetti operata dal Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione, si è proceduto ad una revisione da parte di 48 esperti internazionali (almeno due revisori per ciascun progetto, quasi tutti stranieri). Alla fine il Comitato, componendo le proprie valutazioni con quelle dei revisori, ha identificato 12 progetti da finanziare parzialmente (con un contributo compreso tra il 20% e il 60% del budget proposto).

La maggior parte dei progetti finanziati sono multicentrici, cioè basati sull'aggregazione di due o più gruppi di ricerca. Complessivamente sono coinvolti 30 gruppi o partners di ricerca ripartiti su 9 regioni italiane e una regione germanica (Lombardia 5, Veneto 4, Liguria 4, Lazio 3, Toscana 2, Friuli

A seguito di un bando di concorso emanato il 1° dicembre 2002, sono pervenuti alla Fondazione 39 progetti di ricerca, in gran parte di assai buona qualità: vi erano coinvolti una cinquantina di laboratori o gruppi di ricerca, circa 200 ricercatori, operanti in 14 Regioni italiane. L'evento ha testimoniato l'alto interesse dei ricercatori italiani (clinici, biologi, genetisti, farmacologi, biofisici, microbiologi) verso le problematiche emergenti della fibrosi cistica. Questa si è rive-

lata come una eccezionale opportunità per far convergere su tematiche CF le competenze scientifiche di cui il nostro Paese dispone largamente. Un tale concorso di progettualità ha superato fortemente le aspettative e purtroppo le risorse a disposizione della Fondazione erano piuttosto limitate. E' stato pertanto necessario operare una rigorosa selezione per identificare i progetti più qualificati da finanziare nel corrente anno. Non è stato facile: dopo una prima

Venezia Giulia 2, Puglia 1, Sicilia 1, Campania 1, Tubingen 1). I leaders di progetto hanno cooptato complessivamente per questi progetti 117 ricercatori. I contributi della Fondazione verranno utilizzati per personale nuovo (8 borse di studio o con-

tratti istituiti dalla Fondazione) e per materiale di consumo.

Di seguito forniamo un prospetto delle linee di ricerca promosse dalla Fondazione e dei progetti finanziati nell'ambito di tali linee. Appare chiaro da que-

sto prospetto che le linee di ricerca privilegiate avranno un seguito di progetti (nuovo bando di concorso nel dicembre 2003) e di risultati se si recluteranno risorse sufficienti nella campagna nazionale che è stata recentemente lanciata.

LE LINEE DI RICERCA PROMOSSE E FINANZIATE DALLA FONDAZIONE

1

LINEE DI RICERCA

Conoscere i geni coalizzati con o contrastanti quello della fibrosi cistica (geni modificatori): per spiegare i diversi modi di manifestarsi della malattia e per curarla eventualmente attraverso questi geni

NECESSITÀ PER PROGETTI
euro 150.000

I geni modificatori:
studio multicentrico basato su analisi di famiglie e tecniche genetiche innovative (Prof. G. Novelli, Roma, Verona, Napoli: euro 30.000)

PROGETTI FINANZIATI NEL 2003

2

LINEE DI RICERCA

Eradicare i batteri che aggrediscono i polmoni: conoscere quali sono, come sono fatti, si trasmettono, agiscono nell'infezione e come interferire sulla loro sopravvivenza e sulla loro trasmissione

PROGETTI FINANZIATI NEL 2002
Burkholderia cepacia: batterio emergente, riconoscerlo per trattarlo efficacemente (progetto Prof. R. Fontana, Verona: euro 18.000)

NECESSITÀ PER PROGETTI
euro 300.000

PROGETTI FINANZIATI NEL 2003
Pseudomonas aeruginosa: sua regolazione genica e infezione polmonare. studio dei geni che regolano l'attività del batterio e la sua aggressione ai tessuti polmonari (Dr.ssa A. Bragonzi, Milano, Tubingen: euro 45.000).
Test diagnostico rapido per identificare le varianti di B.cepacia: un supporto possibile ai laboratori per semplificare il riconoscimento dei ceppi di B.cepacia che causano infezione importante in CF (Dr R.Fani, Firenze, Genova, Roma: euro 30.000)
Il sistema di regolazione di B.cepacia nell'infezione polmonare CF: uno studio per conoscere come i batteri B.cepacia si annidano nel tratto respiratorio, si aggregano ed attaccano il polmone (Dr V.Venturi, Trieste: euro 30.000)

3

LINEE DI RICERCA

Contrastare l'infiammazione dei polmoni: conoscere i complicati processi che infiammano il polmone, determinandone la progressiva distruzione, per individuare cure adeguate per controllarli

NECESSITÀ PER PROGETTI
euro 350.000

Azitromicina: un antibiotico con effetti molteplici, da conoscere, potenzialmente prezioso per la cura della malattia polmonare CF (Progetto Dott. P. Melotti, Verona: euro 211.000)

PROGETTI FINANZIATI NEL 2003

PROGETTI FINANZIATI NEL 2003
Proteomica dei fluidi del tratto respiratorio: nuovissima metodologia per conoscere tutte le proteine secrete nel tratto respiratorio, con l'obiettivo di apprendere i processi infiammatori polmonari e curarli (Dr.ssa O.Zegarra, Genova, Siena, Torino: euro 55.000)

Possibile effetto dell'acido folico sulla stabilità di membrana di cellule respiratorie, sull'infiammazione e sulla funzione CFTR (Prof. L.M. Bambara, Verona: studio pilota, finanziamento fuori concorso: euro 8.000)

PROGETTI FINANZIATI NEL 2003
Screening di tutti i farmaci già approvati per identificare quelli eventualmente curativi del difetto di base CF (Dr. L. Galletta, Genova, Milano: euro 60.000)

Studio farmacologico di sostanze attivatrici del trasporto ionico: premessa sperimentale necessaria per testare l'effetto clinico di nuovi farmaci curativi del difetto di base CF (Dr. O. Moran, Genova, Palermo: euro 60.000)

NECESSITÀ PER PROGETTI
euro 350.000

4

LINEE DI RICERCA

Sviluppare nuovi farmaci e nuove strategie che colpiscano il difetto di base della malattia: per giungere a cure risolutive prima dello sviluppo di complicanze senza ritorno o per attenuare comunque il decorso della malattia

5

Dare impulso a studi di trasferimento del gene CFTR normale: per curare alla radice le cellule CF incapaci di produrre la proteina CFTR normale

euro 200.000

Minicromosomi:

nuovi vettori artificiali per la terapia genica della fibrosi cistica (Progetto Prof. F. Ascensioni, Roma: **euro 131.000**)

Lentivirus:

nuovo vettore virale per la terapia genica della fibrosi cistica (Progetto Dott. M. Conese, Milano: **euro 132.000**)

6

Sviluppare nuovi metodi per identificare agevolmente tutte le mutazioni e le varianti del gene CFTR: per diagnosticare correttamente anche le forme minori o atipiche e per supportare adeguatamente la consulenza genetica alle famiglie

euro 150.000

Lo stato di portatore predetto tramite la variante M470V del gene CFTR:

una modalità per calcolare il rischio genetico nei familiari CF quando una mutazione non è nota (Prof. P.F. Pignatti, Verona, Roma: **euro 20.000**).

Errori nel passaggio da DNA a mRNA (pre-mRNA splicing): una modalità ancora poco conosciuta nel determinare l'alterazione genetica di base in CF (Dr. F. Pagani, Trieste: **euro 40.000**)

7

La proteina CFTR: difettosa o mancante, come funziona e non funziona, come viene regolata, come ne soffrono gli organi colpiti

euro 400.000

Regolazione della proteina CFTR (interazione con altre proteine): conoscere aspetti nuovi di funzionamento della proteina in causa nella CF (Dr.ssa V. Casavola, Bari: **euro 50.000**)

Patogenesi e trattamento della malattia epatica in CF: capire e spiegare, per curare, come il difetto di base innesca i processi che portano a cirrosi biliare in molti pazienti CF (Dr. M. Strazzabosco, Padova, Bergamo: **euro 60.000**)

8

Epidemiologia della fibrosi cistica: conoscere l'evoluzione della malattia e l'effetto delle cure su larga popolazione di malati

euro 100.000

Un programma informatico per gestire il Registro Nazionale Fibrosi Cistica (Dr.ssa A. Bossi, Milano: **euro 20.000**)

Finanziamento impegnato nel 2002:

euro 492.000

Finanziamento impegnato nel 2003:

euro 508.000

Fondo necessario nel 2004:

euro 2.000.000

La Fondazione intende inoltre sostenere nel 2003-2004 alcuni progetti di formazione e informazione per ricercatori ed operatori sanitari per un costo complessivo di euro 100.000 (nel 2002 e 1° semestre 2003 è stata investita per tale attività la somma di euro 116.000).

TITOLI ORIGINALI, RESPONSABILI DI PROGETTO E PARTNERS DEI PROGETTI FINANZIATI NEL 2003

1. CFTR regulation by protein-protein interaction. (Resp. V. Casavola, Dip. Fisiologia Università di Bari; Partner M. Zoccolo, Ist. Veneto di Medicina Molecolare, Padova).
2. Activators of the CFTR ionic transport: identification and molecular modelling of the binding sites. (Resp. O. Moran, Ist. Biofisica CNR, Genova; Partners O. Zegarra, Lab. Genetica Molecolare "Gaslini", Genova; V. Martorana, Ist. Biofisica CNR, Palermo)
3. Screening of drugs approved for human use to identify novel pharmacological tools for cystic fibrosis. (Resp. L. Galletta, Lab. Genetica Molecolare Ist. "G. Gaslini", Genova; Partners M. Mazzei, Dip. Scienze Farmaceutiche Università di Genova; M. Conese, Ist. Terapia Sperimentale CF, Osp. S. Raffaele, Milano).
4. Identification of CF modifier genes by family studies and microarray analysis. (Resp. G. Novelli, Dip.to Biologia Sez. Genetica, Università Torvergata, Roma; Partners P.F. Pignatti, Dip.to Materno-infantile, Sez. Biologia e Genetica, Università di Verona; F. Salvatore, Dip. Biochimica e Biotecnologie, Università di Napoli "Federico II").
5. Molecular pathology of CFTR pre-mRNA splicing: dia-

gnostic and therapeutic aspects. (Resp. F. Pagani, Internat. Centre Genetic Engineering & Biotechnology, Padriciano Trieste).

6. Assessing the possible utilization of the CFTR-M470V genotyping for CF risk determination. (Resp. P.F. Pignatti, Dip.to Materno-infantile, Sez. Biologia e Genetica, Università di Verona; Partners C. Castellani, Centro Fibrosi Cistica, Verona; G. Modiano Dip. Biologia, Università Torvergata, Roma).
7. Proteomics of the airway surface liquid: implications for cystic fibrosis. (Resp. O. Zegarra, Lab Genetica Molecolare, Ist. G. Gaslini, Genova; Partners G. Candiano, Lab. Fisiopatologia-uremia, Ist. G. Gaslini, Genova; L. Bini, Dip. Biologia Molecolare, Università di Siena; V. De Rose, Malattie Respiratorie, Dip. Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino).
8. Gene regulation and adaptive mutation of *Pseudomonas aeruginosa* in a chronic lung infection model for cystic fibrosis. (Resp. A. Bragonzi, Ist. Terapia Sperimentale Fibrosi Cistica, DIBIT Osp. S. Raffaele, Milano; Partner G. Doering, Inst. fur Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene, Universität di Tubingen).
9. Development of a rapid diagnostic test to discriminate *B. cepacia* complex species and genomovars in routine clinical analysis involving CF patients.

(Resp. R. Fani, Dip. Biologia Animale e Genetica, Università di Firenze; Partners G. Manno, Lab. Malattie Infettive, Dip. Pediatria Ist. G. Gaslini, Università di Genova; S. Tabacchioni, Sez. Genetica e Genomica Vegetale, ENEA, Roma; G. Taccetti, Centro Fibrosi Cistica, Firenze)

10. The quorum sensing regulon of the emerging fibrocystic bacterial pathogen *B. cepacia*. (Resp. V. Venturi, Internat. Centre Genetic Engineering & Biotechnology, Padriciano Trieste).
11. Pathogenesis and treatment of cystic fibrosis-related liver disease. (Resp. M. Strazzabosco, Osped. Riuniti di Bergamo e Ist. Veneto di Medicina Molecolare, Padova).
12. Construction of an annually updated hypertest allowing flexible access to aggregated data from the Italian Cystic Fibrosis Registry (ICFR). (Resp. A. Bossi, Ist. Statistica Medica e Biometria, Università di Milano).

Biochemical and physiopathological aspects of plasma membrane of human bronchial epithelial cells expressing DF508 mutation before and after supplementation of methylated folic acid and B12 vitamin. (Resp. L.M. Bambara, Medicina Interna, Policlinico G.B. Rossi, Verona. Studio pilota fuori concorso).

Stato di avanzamento dei progetti CF finanziati nel 2002

Diamo di seguito un breve resoconto sullo stato di avanzamento dei progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione nel 2002. I reports sono stati preparati dai responsabili di progetto.

1. MINICROMOSOMI: UN NUOVO APPROCCIO PER LA TERAPIA GENICA DELLA FIBROSI CISTICA

F. Ascenzioni (Univ. La Sapienza, Roma), *O. Zagarra* (Ist. Gaslini, Genova), *M. Conese* (DIBIT, S. Raffaele, Milano). Durata progetto 2 anni. Finanziamento euro 131.000.

I cromosomi artificiali, detti anche minicromosomi, rappresentano, almeno idealmente, i migliori vettori di terapia genica in quanto permettono l'utilizzo del gene terapeutico con i propri elementi regolativi in un contesto del tutto simile a quello che in natura ospita i geni e ne permette l'espressione, ovvero i cromosomi. Per verificare il fondamento di questa ipotesi, abbiamo allestito un piccolo cromosoma, pari a circa 1/50 di un cromosoma umano, contenente l'intero gene CFTR ed i suoi elementi di controllo. Questi ultimi consistono di frammenti di DNA posti a monte del gene che ne assicurano una appropriata funzionalità.

Il minicromosoma da noi preparato è stato studiato in un ospite intermedio, cellule di hamster cinese (criceto), nel quale ha dato risultati promettenti in termini di funzionalità, sia del minicromosoma stesso che del gene CFTR. Le nostre ricerche sono ora volte al trasferimento in cellule umane in coltura recanti la mutazione FC e che mostrano i difetti di trasporto degli elettroliti, tipici dei pazienti FC. A tale scopo abbiamo analizzato le caratteristiche

funzionali di linee cellulari FC (omozigoti DF508) derivate da epitelii bronchiali e da pancreas per poter poi analizzare gli effetti del minicromosoma. Stiamo inoltre mettendo a punto diversi protocolli per il trasferimento del minicromosoma e per la selezione dei cloni FC che lo contengono.

La nostra ricerca ha come obiettivo a breve termine l'analisi del minicromosoma e dei suoi possibili effetti terapeutici in sistemi in vitro (colture cellulari) e successivamente in sistemi modello animali (topi DF508 e/o KO per in CFTR). Per poter effettuare questa seconda parte del lavoro, che ragionevolmente richiederà almeno un altro anno di sperimentazione, si stanno acquisendo le competenze necessarie per l'analisi funzionali del CFTR nei modelli murini.

2. VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA, EFFICACIA E SICUREZZA DI VETTORI LENTIVIRALI NEL TRASFERIMENTO DEL GENE CFTR IN SISTEMI MODELLO DI EPITELIO RESPIRATORIO CON FIBROSI CISTICA

M. Conese (Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H S. Raffaele, Milano). Durata del progetto 3 anni. Finanziamento euro 132.000.

La terapia genica rappresenta un approccio risolutivo per il trattamento della Fibrosi Cistica (FC). I metodi attualmente disponibili per il trasferimento del gene responsabile

della FC, ovvero il CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), un canale del cloro espresso dalle cellule epiteliali, presentano delle importanti limitazioni.

I lentivirus ricombinanti rappresentano dei vettori molto promettenti per il trasferimento genico nelle cellule epiteliali perché essi sono capaci di infettare cellule non proliferanti, come quelle respiratorie, ed assicurano la persistenza dell'espressione genica. Inoltre non ci sono evidenze che i vettori lentivirali generino nell'ospite una risposta infiammatoria ed immunitaria.

Nei pazienti FC, la malattia è caratterizzata da infezioni respiratorie causate da batteri opportunisti (principalmente *Pseudomonas aeruginosa*) che portano al danneggiamento del tessuto respiratorio e, per ultimo, a deficienza respiratoria. Pertanto, l'infezione può essere considerata come un valido surrogato per la valutazione dell'efficacia terapeutica dell'inserzione del gene CFTR nelle cellule dell'epitelio respiratorio FC.

Durante il primo anno, il nostro studio si è concentrato su due modelli. Il primo consiste nella somministrazione locale (cioè attraverso la trachea) di lentivirus che esprimono un gene marcatore il cui prodotto (proteina) può essere visualizzato mediante tecniche standard di istochimica. La rilevazione della proteina a livello delle cellule dei bronchi e degli alveoli dimostra che il vettore virale riesce a tra-

sferire il gene marcatore all'epitelio respiratorio senza apparente danno dell'epitelio stesso. Questi risultati, se confermati, saranno i primi in questo senso, visto che i precedenti ricercatori hanno dovuto causare un danno dell'epitelio, mediante mezzi fisici o chimici, per ottenere che i lentivirus trasferissero il gene.

Nel secondo modello si sono impiantati tessuti respiratori (polmoni e trachea) di origine fetale al di sotto della cute di topi immunocompromessi, i quali non possono quindi rigettare il trapianto. I tessuti fetali così impiantati si sviluppano e si differenziano come nell'individuo normale. Inoltre, i topi non soffrono di tale impianto. L'infezione con *Pseudomonas aeruginosa* in questi tessuti è stata valutata come numero di colonie batteriche vive che si riuscivano a recuperare dai tessuti stessi. I risultati mostrano che si devono ancora trovare le condizioni ottimali per avere una rimozione completa dei batteri dai tessuti respiratori in queste condizioni sperimentali. Sono in corso esperimenti con cariche batteriche diverse e tessuti di diverse età maturative.

Nel secondo anno il gene CFTR verrà inserito nel vettore lentivirale ed usato per infettare i tessuti respiratori FC. In questi tessuti verrà analizzata l'espressione del CFTR nonché la sua funzionalità come canale del cloro. Poiché uno dei nostri scopi è di verificare che il CFTR abbia un'efficacia terapeutica nei confronti dell'infezione e dell'infiammazione respiratoria, analizzeremo l'effetto del CFTR su questi parametri.

3. RUOLI NON BATTERICIDI DELL'AZITROMICINA: RILEVANZA PER LA TERAPIA DELLA FIBROSI CISTICA

(P. Melotti, Lab. Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Verona). Durata progetto 3 anni. Finanziamento euro 211.000.

Era stato osservato che il trattamento con l'antibiotico azitromicina (AZM) migliora, anche a livello di funzioni cellulari, le condizioni di alcuni pazienti con fibrosi cistica (FC). Questo miglioramento sembrerebbe essere associato all'aumento di espressione di un gene chiamato MRP1, appartenente alla stessa famiglia di CFTR (il gene le cui mutazioni causano la FC). E' stato così ipotizzato che l'aumentata espressione di MRP1 potrebbe compensare, almeno parzialmente, il difetto presente in tale malattia. Tale fenomeno rappresenta l'oggetto di un progetto di ricerca triennale, finanziato dalla Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, in corso di svolgimento dal luglio 2002 presso il Laboratorio di Patologia Molecolare del Centro Fibrosi Cistica di Verona.

Nel 1° anno di attività abbiamo formato un nuovo gruppo di ricerca dedicato allo scopo e reclutato alcuni giovani ricercatori. Il primo risultato del nostro lavoro è stato la scoperta che la sequenza di DNA che regola l'espressione del gene MRP1 è variabile nei 24 pazienti studiati. Si tratterà ora di conoscere la diversa risposta all'AZM dei pazienti stessi e di analizzare poi se la variabilità di tale risposta da soggetto a soggetto è associata a qualche specifica sequenza identificata.

Un'eventuale associazione di specifiche sequenze del gene MRP1 con il miglioramento di alcuni parametri clinici e laboratoristici durante la terapia con AZM potrebbe permettere di trattare con tale farmaco solo i soggetti che ne potrebbero trarre beneficio, con evidenti vantaggi sia per i pazienti che per il sistema sanitario.

Si è inoltre avviata la ricerca di quali geni l'AZM sia in grado di regolare in cellule di epitelio respiratorio con le caratteristiche della FC. Attualmente una fase di questo studio è svolta presso l'Università di Ferrara in collaborazione con il dott.

Massimo Negrini, responsabile di un laboratorio di ricerca all'avanguardia in questo tipo di analisi. Trovare quali tra i numerosissimi geni espressi dalle cellule vengano modificati dal trattamento con questo farmaco potrebbe essere paragonabile a cercare un ago in un pagliaio, ed in effetti il nostro intento sarebbe stato difficilmente proponibile fino a pochissimi anni fa, quando il progetto genoma non era ancora completato e non era disponibile la tecnica nota come "analisi di microarrays". Quest'ultima consiste in una sofisticata tecnologia che analizza contemporaneamente il livello di espressione, nel nostro caso, di circa 43.000 geni umani concentrati in un rettangolo di pochi centimetri di lato. Tra i geni in tal modo analizzati, quelli che risulteranno regolati dal farmaco ci indirizzeranno per cercare di comprendere i meccanismi con i quali l'AZM può migliorare le condizioni di alcuni pazienti con FC. La comprensione del meccanismo d'azione dell'AZM potrebbe inoltre suggerire nuovi approcci farmacologici atti a compensare il difetto molecolare tipico della FC.

4. MARKERS TASSONOMICI E DI VIRULENZA DI CEPPI DI BURKHOLDERIA CEPACIA ASSOCIATI ALLE INFEZIONI RESPIRATORIE DI PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

Relazione Conclusiva

(R. Fontana, G. Golini, Università di Verona, Dipartimento di Patologia - Sezione di Microbiologia, Servizio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Verona). Durata progetto 2 anni. Finanziamento euro 18.078.

L'infezione da *Burkholderia cepacia* (B.c.) rappresenta un evento potenzialmente dannoso per il paziente affetto da fibrosi cistica (FC), per le pesanti conseguenze in termini sia di morbilità sia di mortalità. La riduzione dell'incidenza di tali

infezioni si è avuta quando, dimostrando la possibilità di infezioni crociate fra i pazienti di uno stesso centro, si sono adottate, di conseguenza, strette misure di controllo e di segregazione fra pazienti.

La precisa identificazione di B.c. è pertanto fondamentale per la corretta gestione del paziente FC. Nonostante siano stati messi a punto numerosi terreni e protocolli per la coltura e identificazione di questo microrganismo, nessuno garantisce la sua univoca identificazione ed altri batteri gram-negativi vengono frequentemente ed erroneamente identificati come B.c.

Recentemente alcune tecniche di analisi molecolare sono state applicate alla tassonomia (classificazione) di B.c., portando all'identificazione di distinti genomovar (termine coniato per contraddistinguere ceppi apparentemente simili ma geneticamente distinti) e nuove specie. Obiettivo del progetto è stato l'applicazione delle tecniche di biologia molecolare allo studio dell'epidemiologia dei diversi genomovar e/o specie di B.

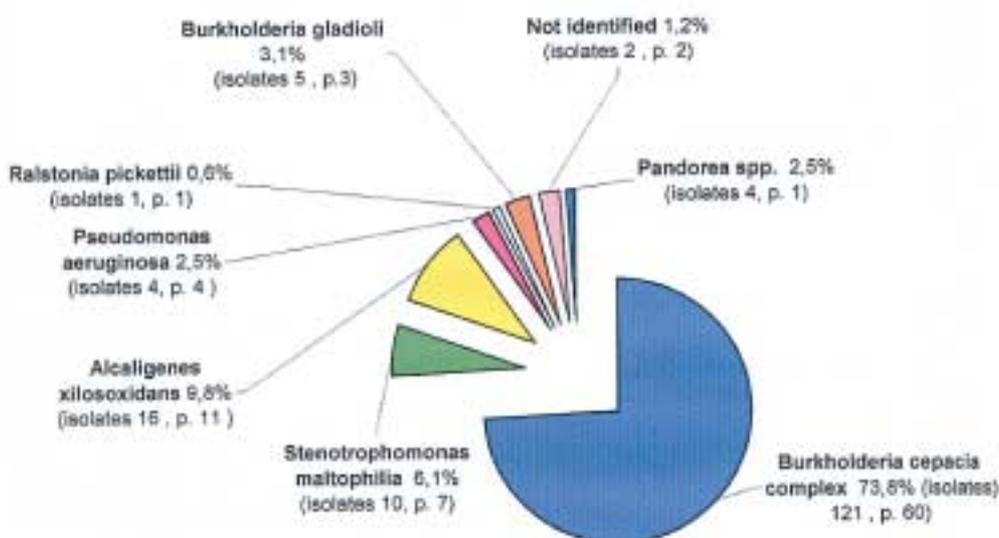
cepacia complex nei pazienti FC del Centro di Verona e della correlazione tra genomovar e maggiore patogenicità e trasmissibilità. 163 ceppi isolati da 82 pazienti e identificati come B.c. mediante prove biochimiche sono stati ridenominati mediante analisi dei profili di restrizione del gene dell'rRNA16S generati dall'enzima Ddel e del gene recA generati dagli enzimi HaeIII e MnlI. Una elevata percentuale (26%) di ceppi biochimicamente identificati come B.c. non sono stati confermati come tali dall'indagine genetica, suggerendo la necessità di estendere quest'ultimo tipo di indagine a tutti i batteri gram-negativi non-fermentanti isolati da pazienti FC. I nostri risultati indicano che le maggiori incongruenze si sono riscontrate per *A. xilosoxydans*, *S. maltophilia* e *B. gladioli* (9.8%, 6.1%, 3.1% rispettivamente).

I 121 ceppi geneticamente confermati come appartenenti a B.c. complex provenivano da 60 pazienti. L'analisi dei RFLP del gene recA li ha così suddivisi: 10 ceppi provenienti da 5 pazienti appartenevano al genomovar I,

7 ceppi da 3 pazienti al genomovar II, 45 ceppi da 27 pazienti al III-A, 57 ceppi da 33 pazienti al genomovar III-B e infine 2 ceppi da 2 pazienti al genomovar V.

Infine, dato che all'interno del genomovar III-B si possono distinguere vari profili, si è visto che al tipo H appartengono 33 ceppi di 23 pazienti, al tipo J appartengono 16 ceppi di 9 pazienti e infine al tipo I appartengono 8 ceppi di 6 pazienti. Nessun ceppo possedeva il marker di virulenza cblA, associato alla produzione del pilo cavo, mentre il 37,9% possedeva il marker BCESM riscontrato in ceppi virulenti epidemici. I genomovar III-A e III-B si sono confermati come i più diffusi nella popolazione FC afferente al Centro di Verona, risultato in linea con l'andamento epidemiologico di altri centri nazionali ed internazionali. Il nostro studio ha anche confermato l'elevato grado di resistenza agli antibiotici dei ceppi appartenenti al genomovar III, caratteristica questa associabile alla maggiore gravità delle infezioni da questi causate.

Identificazione con metodi genetici di 163 isolati batterici (da 82 pazienti CF) precedentemente riconosciuti come B.cepacia (solo il 73,8% sono risultati appartenere realmente al complesso B. cepacia)



Seminario di primavera

PROGRESSI RECENTI E SVILUPPI FUTURI NELLA RICERCA SULLA FIBROSI CISTICA

VERONA - 9-10 Maggio 2003



Il Seminario si è svolto in due sessioni, la prima dedicata a ricercatori ed operatori sanitari, presso la sede della Fondazione, la seconda per laici, presso il Centro Marani dell'ospedale di Verona, con un' ampia partecipazione di pubblico molto attivo nella discussione. Qui riassunti sono alcuni aspetti delle relazioni presentate.

Introduzione al seminario

Prof. Antonio Cao

Direttore dell'Istituto CNR di Neurogenetica e Neurofarmacologia di Cagliari.

Presidente del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica

In questi ultimi 15 anni abbiamo assistito ad un grande progresso nel campo delle nostre conoscenze sulla Fibrosi Cistica, specie nel settore della genetica e della biologia molecolare, ma anche nel campo, sicuramente più difficile ed arduo, della ricerca clinica. Anche la ricerca di nuove terapie molecolari ha fatto sicuramente notevoli passi avanti nel gettare le basi razionali per questa terapia ma non ha ancora raggiunto il livello di applicabilità clinica. Questi tre argomenti: La ricerca clinica, la ricerca genetica e la ricerca di nuove terapie molecolari costituiscono il programma del "Seminario di primavera" organizzato dalla Fondazione per

la ricerca sulla Fibrosi Cistica.

Il tema della ricerca clinica sarà affrontato dal Prof. Steven Conway del Centro regionale di Leeds del Regno Unito. Tra gli argomenti che verranno trattati, quelli più interessanti e promettenti per far progressi nel trattamento, sono l'uso degli antibiotici di tipo macrolidico per il loro marcato effetto diretto sul processo infiammatorio tipico del polmone dei pazienti con CF; i regimi terapeutici eradicanti che pospongono e forse potrebbero prevenire la colonizzazione del polmone da parte della *Pseudomonas Aeruginosa*, la prevenzione e il trattamento dell'Osteoporosi, che ha un impatto estremamente negativo sulla qualità di vita del paziente e la messa a punto di nuovi sistemi di nebulizzazione. L'argomento del ruolo della infiammazione nella progressione della patologia polmonare è anche oggetto di diversi progetti che sono stati presentati alla valutazione critica del Comitato Scientifico della Fondazione per la ricerca sulla Fibrosi Cistica. Queste ricerche cliniche potrebbero risultare in un allungamento della vita media ed in un miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

Il secondo grande tema riguarda la genetica molecolare, nel cui campo si sono realizzati negli ultimi anni i più importanti progressi, che verrà trattato dal Prof. Claude Ferenc del Laboratorio INSERM di Brest. I temi più rilevanti in questo settore sono l'ulteriore definizione dello spettro di mutazioni causa di CF, la messa a punto di tecnologie accurate ed automatizzate di diagnosi molecolare come la D-HPLC, la chiarificazione del meccanismo patogenetico di ogni specifica mutazione quale presupposto di future terapie farmacologiche o molecolari ma soprattutto l'identificazione di geni capaci di modificare il fenotipo. Un discreto numero di progetti di ricerca presentati al Comitato Scientifico della Fondazione riguardano tematiche molecolari, in particolare identificazione di geni modificatori del fenotipo, sviluppo di nuovi farmaci mutazioni-specifici disegnati sulla base della specifica patogenesi molecolare e metodologie di identificazione di mutazioni in zone non ancora analizzate del gene o delle sue sequenze regolatrici. Le ricerche di biologia molecolare hanno avuto fino ad ora un notevole impatto sulla pre-

venzione della CF tramite consultazione genetica, screening neonatale, screening a cascata, diagnosi prenatale e preconcezionale. La definizione della patogenesi molecolare mutazione specifica e l'identificazione di geni modificatori potrebbe ulteriormente migliorare le nostre attuali conoscenze sulle correlazioni genotipo-fenotipo ma forse aprire anche una strada per nuovi approcci terapeutici.

L'ultimo grande argomento della giornata riguarderà la terapia genica, che fino ad ora si è fondata sull'uso di vettori adenovirali, vettori derivati dall'"adeno-associated virus" (AAV) e vettori costituiti da liposomi. L'argomento verrà svolto dalla

zione sulla membrana cellulare.

Nonostante i risultati modesti fino ad ora ottenuti con queste terapie alternative occorre sottolineare che, grazie alle ricerche di questi anni, si sono potute stabilire le basi biologiche di questi approcci terapeutici ed individuare le problematiche e gli ostacoli. E' pertanto lecito nutrire per il futuro un ragionevole ottimismo riguardo possibili successi ottenibili sia tramite il miglioramento dei vettori in sperimentazione, l'uso di nuovi vettori, strategie di diverso tipo di riparazione del RNA e di ricombinazione analoga e/o uso di nuovi farmaci attivi sulla proteina CFTR.



Un momento della sessione scientifica presso la sala convegni della Fondazione. In primo piano da sinistra: Prof.ssa Pamela Zeitlin e Prof. Claude Ferec

Prof.ssa Pamela Zeitlin del Johns Hopkins School of Medicine. I risultati della terapia genica sono stati deludenti, ivi compreso quelli recentemente ottenuti con l'uso di vettori derivati dalla AAV. Vi sono indubbiamente numerosi ostacoli verso il successo della terapia genica specifici della CF tra cui la localizzazione basolaterale dei recettori per l'AAV, le difficoltà nel trasporto del vettore al nucleo e l'eventuale effetto negativo sul costrutto di proteasi e di anticorpi neutralizzanti. Accanto a questi fattori vanno ricordati ostacoli più generali alla terapia genica tramite vettori quali la modesta efficienza della transfezione, la scarsa espressione del gene transfettato e la sua possibile rapida inattivazione. Accanto alla terapia genica vanno sviluppandosi terapie farmacologiche alternative, cui abbiamo accennato in precedenza, volte a regolare la funzione del gene CFTR, ad attivare il trasporto ionico della proteina CFTR o la sua localizza-

RECENTI E SIGNIFICATIVI PROGRESSI NELLA RICERCA CLINICA IN FIBROSI CISTICA

Prof. Steven Conway
Direttore della Regional Paediatric Cystic Fibrosis Unit
St. James Hospital
Leeds, Gran Bretagna

Mi è stato chiesto di discutere con voi di alcuni importanti sviluppi nell'ambito clinico della fibrosi cistica, concentrandomi sui trattamenti che avranno un impatto sull'assistenza ai malati ora e nei prossimi pochi anni, ma anche con uno sguardo ai possibili sviluppi futuri. Naturalmente c'è una grande quantità di argomenti tra cui scegliere, dal momento che parliamo del trattamento di una malattia che colpisce così tante e diverse parti del corpo. Tuttavia mi limiterò alle seguenti aree:

1. Antibiotici macrolidi, per esempio azitromicina, claritromicina, eritromicina: come agiscono? Qual è il loro ruolo nel trattamento CF?
2. Importanza dei regimi di eradicazione batterica e di segregazione dei pazienti: fino a qual punto dovremmo adottare la segregazione?
3. Osteoporosi (ossa rarefatte): quale ne è la causa in fibrosi cistica? Come dovremmo tentare di prevenirla? Come dovremmo trattarla?
4. Strumenti "adattativi" per l'aerosolterapia delle vie aeree: migliorano le cure ai pazienti?

1. IMPIEGO DI ANTIBIOTICI MACROLIDI NELLA FIBROSI CISTICA

Al fine di comprendere i benefici che si possono ottenere dal trattamento con il gruppo degli antibiotici macrolidi, è innanzitutto necessario descrivere brevemente che cosa accade una volta che si sia stabilita una infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa*. Con il persistere dell'infezione noi troviamo che i batteri crescono in microcolonie e si sviluppano nella forma cosiddetta "mucoide", caratterizzata dalla secrezione di alginato, una pellicola gelatinosa che li avvolge e li protegge. Questa viene descritta come modalità di crescita "in biofilm". La *Ps. aeruginosa* all'interno del biofilm è molto resistente sia agli antibiotici sia alle difese immunitarie del paziente.

Spostiamoci per un momento al Giappone e ad una malattia chiamata "Panbronchiolite diffusa (DPB)". Questa è una malattia degli adulti che ha molte somiglianze con la fibrosi cistica, per esempio la tosse persistente, lo sputo purulento, la sinusite cronica e le bronchiectasie. Circa il 70% dei pazienti con DPB hanno infezione cronica da *Ps. aeruginosa* e i batteri mostrano lo stesso comportamento di crescita in biofilm mucoide che noi vediamo nella CF. Per puro caso si trovò che il trattamento con eritromicina (un antibiotico appunto del gruppo macrolidi) in pazienti con DPB e infezione cronica da *Ps. aeruginosa* miglioravano la loro sopravvivenza a 5 anni dal 26% al 94%. Potrebbero l'eritromicina o altri antibiotici macrolidi ottenere lo stesso effetto in fibrosi cistica? Se così fosse essi potrebbero agire con qualcuna delle seguenti modalità.

- a. Le singole unità di Ps. aeruginosa "parlano" le une con le altre per formare i biofilms, usando un sistema di segnali chiamato "quorum sensing". I macrolidi bloccano questi segnali.
- b. Basse concentrazioni di macrolidi inibiscono la produzione di alginato e pertanto la formazione di biofilms mucoidi.
- c. I macrolidi inibiscono la motilità batterica, impedendo così la formazione di biofilm. Ancora una volta sono necessarie per questo basse concentrazioni di farmaco.
- d. In CF c'è una eccessiva risposta infiammatoria all'infezione polmonare. I macrolidi bloccano questa risposta infiammatoria e possono di conseguenza ridurre il danno polmonare.
- e. I macrolidi compromettono l'attitudine di Ps. aeruginosa ad attaccarsi alle cellule respiratorie e possono così ridurre la gravità dell'eventuale infezione.
- f. I macrolidi riducono la viscosità dello sputo cosicché l'espettorazione può essere più facile.

Discuterò dei più importanti studi clinici condotti con macrolidi in fibrosi cistica. In sintesi, questi dimostrano un miglioramento della funzione respiratoria, una migliore qualità di vita, meno infiammazione, meno uso di antibiotici per vena e meno giornate di degenza in ospedale con il trattamento a base di macrolidi. Ma non tutti i pazienti traggono beneficio da tale trattamento ed alcuni possono andare addirittura peggio. Inoltre, noi non conosciamo ancora quale sia la sicurezza di questi farmaci nel lungo termine. Forse il loro uso dovrebbe essere riservato ai pazienti che mostrano una scarsa risposta al trattamento convenzionale o come aggiunta al trattamento della colonizzazione precoce?

2. INFEZIONE DA PSEUDOMONAS AERUGINOSA: SEGREGAZIONE DEI PAZIENTI ED ERADICAZIONE DELL' INFEZIONE PRECOCE.

L'infezione da Ps. aeruginosa è associata con una peggiore funzione respiratoria, una più forte morbilità ed una sopravvivenza più corta. Negli USA la maggioranza dei bambini CF sono infetti da Ps. aeruginosa. In Francia l'età media della prima infezione da Ps. aeruginosa è di 5 anni. Ma con una combinazione di trattamento intensivo della prima infezione e delle successive

infezioni intermittenti da Ps. aeruginosa e la separazione in ospedale dei pazienti con infezione da quelli senza infezione da pseudomonas, la prevalenza di infezione cronica può essere dilazionata nel tempo per anni (e forse prevenuta?). Questo fu inizialmente dimostrato dal Centro CF di Copenaghen e io vi mostrerò i loro dati. Noi abbiamo seguito il loro indirizzo e, mediante la pratica di screening neonatale (1975), di trattamento intensivo dei primi isolamenti di Ps. aeruginosa dai pazienti (1985), e segregazione dei pazienti con e senza infezione da pseudomonas (1991), noi abbiamo ridotto la prevalenza di infezione cronica da Ps. aeruginosa nel nostro reparto pediatrico dal 24% al 18% nel corso degli ultimi 11 anni. Similmente, la prevalenza di infezione cronica nei bambini al di sotto degli 11 anni di età è caduta dal 24% al 4%. Vi mostrerò i nostri dati e discuterò i nostri protocolli di trattamento.

Io credo che questa riduzione del tasso di infezione da Ps. aeruginosa sia il più importante successo ottenuto nelle cure della fibrosi cistica negli anni recenti ed il suo frutto sarà raccolto per molti anni. Se sostanzialmente noi dilazioniamo o preveniamo l'infezione cronica noi dilazieremo o preverremo la reazione infiammatoria associata con l'infezione e il danno polmonare. Io credo che noi vedremo in seguito aumentare la sopravvivenza media di questi bambini ben oltre i 40 - 45 anni che sono stati predetti per loro.

Nei bambini con fibrosi cistica quindi l'infezione cronica da Ps. aeruginosa non è inevitabile.

Io discuterò con voi anche la questione dei ceppi trasmissibili di Ps. aeruginosa, di recente riportati. Che cosa significano questi per l'assistenza al paziente? Sono essi clinicamente importanti? Dovremmo noi modificare la nostra pratica a causa di essi?

3. OSTEOPOROSI

Sulla base di parecchi recenti studi noi sappiamo oggi che l'osteoporosi (ossa rarefatte) colpisce molti adulti con fibrosi cistica. Questo è importante perché l'osteoporosi sarà silente finché queste ossa più fragili non si romperanno, con conseguente dolore. Se le costole si fratturano la tosse e la fisioterapia saranno dolorose e difficoltose, compromettendo pertanto la rimozione

delle secrezioni bronchiali.

Vi sono tre domande cui bisogna dare risposta:

- a. L'osteoporosi è anche un problema dei bambini con CF o è solo confinata agli adulti?
- b. Che cosa causa l'osteoporosi?
- c. Come possiamo trattarla nel migliore dei modi?

Io discuterò la letteratura nel tentativo di rispondere a queste domande e mostrerò alcuni dati nuovi ottenuti da nostri studi su bambini e su adulti presso il Centro di Leeds. Io sostengo che in tutti i bambini CF, a parte quelli che stanno realmente bene, l'osteoporosi è un problema, che la causa di essa è multifattoriale (dipende da parecchi fattori) e che la famiglia dei farmaci bifosfonati mostra risultati promettenti nel trattamento di questa condizione. Sono necessari però studi clinici randomizzati di questi farmaci nell'osteoporosi CF prima che il loro impiego diventi generalizzato senza una adeguata base di evidenza.

La prevenzione dell'osteoporosi dovrebbe essere un obiettivo maggiore. Io discuterò l'importanza di una nutrizione ottimale, specialmente con l'apporto di calcio e vitamina D (ma discuterò anche la probabile importanza della vitamina K nella salute dell'osso), l'importanza dell'attività fisica e del tempestivo trattamento di ogni nuova infezione respiratoria.

4. EROGAZIONE "ADATTATIVA" DI AEROSOL ALLE VIE AEREE (ADAPTIVE AIRWAYS DELIVERY - AAD)

Parecchi farmaci nella cura della fibrosi cistica sono somministrati mediante nebulizzazione, una procedura noiosa ed universalmente impopolare. Molta parte dell'aerosol viene dispersa quando si impiega una tecnica inalatoria inadeguata e molto tempo viene sprecato, mentre l'aerosol fuoriesce, per tossire, per parlare, etc. La nuova tecnica AAD genera aerosol solo quando il paziente respira correttamente nella mascherina ed eroga il farmaco solo nella prima metà dell'atto inspiratorio. Questa tecnica inoltre si adatta al modello individuale di respiro, cosicché se il paziente attua respiri più lunghi e più profondi più aerosol sarà somministrato ad ogni inspirazione. Il risultato è che c'è meno dispersione di aerosol e che il trattamento può essere completato più rapidamente. Questo dovrebbe, noi lo speriamo, permettere ai pazienti un piano di trattamento più

semplice e pertanto più facile per essi da accettare e praticare.

Riferirò dei risultati di uno studio internazionale che compara il trattamento mediante il sistema AAD con quello basato su un nebulizzatore convenzionale. Lo studio ha coinvolto oltre 250 pazienti. La maggior parte dei pazienti preferiva l'apparecchio AAD e attuava con esso più correttamente il loro trattamento. Benché non si siano trovate differenze nell'impiego di antibiotici, nel numero di giorni di degenza in ospedale, o nella funzione polmonare con i due diversi sistemi di nebulizzazione, c'è stata tuttavia qualche evidenza che lo strumento AAD era complessivamente più efficiente ed aveva un effetto positivo sulla FEV1 sia nel breve che nel lungo termine.

Io sono certo che i pazienti preferiranno usare il sistema AAD. È probabile che essi assumeranno con questo sistema più trattamento, dal momento che esso è più rapido e più facile. Più trattamento, assunto con meno dispersione, dovrebbe portare a un migliore stato di salute. Sarà molto interessante valutare questo nuovo sistema di erogazione di aerosol nell'uso clinico giorno per giorno.

RECENTI PROGRESSI NELLA RICERCA GENETICA APPLICATA ALLA DIAGNOSI E POTENZIALMENTE ALLA TERAPIA DELLA FIBROSI CISTICA

Prof. Claude Ferec

Professore di Genetica e Direttore dell'Istituto EMI U 0115 di "Genetica Molecolare ed Epidemiologia Genetica" presso l'Università di Brest, Bretagna - Francia

La fibrosi cistica è la più comune malattia severa su base genetica autosomica recessiva che colpisce i bambini nelle popolazioni di origine caucasica. La malattia porta ad infezioni polmonari croniche e a disturbi digestivi, quali l'insufficienza pancreatica e occlusioni intestinali.

L'aspettativa mediana di vita dei pazienti è fortemente aumentata nel corso dei 50 anni trascorsi, ma la fibrosi cistica rimane una malattia letale e costituisce un serio problema di salute pubblica.

Il gene responsabile della CF, identificato nel 1989, è il gene denominato "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)". Esso codifica per una proteina di 1480 ami-

noacidi, chiamata CFTR. In aggiunta alla mutazione DF508, che interessa circa il 66% di tutti gli alleli CF nel mondo, più di mille mutazioni, distribuite sui 27 esoni del gene CFTR, sono state a tutt'oggi riportate dal Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (<http://www.genet.sickkids.on.ca>).

Queste mutazioni sono situate nell'intera sequenza codificante del gene ma anche nel suo promotore. Tuttavia, ci sono regioni del gene dove le mutazioni sono più comuni, come quelle che codificano per alcune parti della proteina denominate "Nucleotide Binding Fold" e "Regulatory Domain".

Mutazioni CF sono state trovate anche in altre malattie, come l'assenza congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD), che comporta infertilità da azoospermia nei maschi, le bronchiectasie disseminate o la pancreatite cronica.

1. LO SVILUPPO DI NUOVE TECNOLOGIE PER L'ANALISI DI MUTAZIONI CFTR

Nel corso degli ultimi 10 anni, lo sviluppo di tecnologie avanzate per l'identificazione di mutazioni è stata estremamente produttiva, con la messa a punto di tecniche potenti come la "Polymerase Chain Reaction (PCR)", la tecnica "Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)", le scissioni chimiche ed enzimatiche, la "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)", e più recentemente la "Denaturing Ion-paired Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography (D-HPLC)". La tecnica ideale per l'identificazione di mutazioni richiede di essere sensibile (assenza di risultati falsi negativi ndr), specifica (assenza di risultati falsi positivi ndr) e robusta. La tecnica DGGE è stata probabilmente la tecnica più potente a disposizione per l'identificazione di mutazioni puntiformi (in genere quelle che interessano un singolo aminoacido della catena proteica ndr) ma essa richiede molto tempo. Questa è la ragione per cui noi abbiamo sviluppato la tecnica D-HPLC, che permette la separazione di "homoduplexes" da "heteroduplexes" nelle molecole di DNA in doppia elica. Noi abbiamo dimostrato che la sensibilità di questa tecnica è del 100%.

2. LE CLASSI DI MUTAZIONI CFTR

Questo nuovo mezzo migliora fortemente il tasso di rivelazione delle mutazioni, permettendo di assegnare i genotipi (la base genetica della malattia ndr) ad una di cinque classi di mutazioni, sulla base dei risultati dell'analisi molecola-

re. Le mutazioni di Classe 1 compromettono la biosintesi della proteina. Ci si aspetta che il 50% delle mutazioni CFTR impedisca una appropriata sintesi di proteina normale: sono queste le cosiddette mutazioni "non senso" o "stop", le mutazioni "frameshift" (che modificano la struttura del gene ndr) o quelle che determinano un accoppiamento aberrante di RNA messaggero ("missplicing"). Questa classe di mutazioni include i fenotipi (espressione clinica della malattia ndr) più severi, in causa dell'assenza di proteina sintetizzata. La più comune di queste mutazioni è la G542X (nel Veneto e Trentino-Alto Adige è assai frequente la mutazione R1162X ndr). Alcune mutazioni di Classe 1 comportano peraltro anche alcuni tra i fenotipi meno gravi: sono le mutazioni precedentemente incluse nella classe 5, dovute a "missplicing", che consentono peraltro la produzione di una piccola quantità di proteina CFTR normale.

Una possibile via per correggere una mutazione di classe 1 sarebbe la sua sostituzione con una tecnica di terapia genica. Inoltre, studi recenti hanno mostrato che l'aggiunta di antibiotici aminoglicosidi (es. gentamicina) potrebbe sopprimere alcuni codoni "stop" (piccole porzioni di DNA che comandano l'interruzione di sintesi della catena proteica ndr) e un trattamento sistemico con gentamicina nei pazienti CF potrebbe determinare un piccolo incremento della secrezione di cloro dipendente da CFTR.

Le mutazioni di Classe 2 determinano un alterato sviluppo della proteina pur sintetizzata che porta in definitiva ad una mancanza di proteina funzionante a livello di membrana cellulare. Alcune delle cosiddette mutazioni "missense" (che comportano nella proteina la sostituzione di un aminoacido con un altro ndr) e la mutazione DF508 sono incluse in questa classe. La mutazione DF508 determina un alterato avvolgimento ("misfolding", alterata conformazione spaziale della proteina ndr) e pertanto una errata collocazione nella cellula della proteina matura. Il "misfolding" di questa proteina mutante porta alla sua degradazione selettiva ad opera del sistema di controllo di qualità della cellula. La terapia per le mutazioni di classe 2 richiederebbe farmaci con la capacità di aumentare i livelli di proteina funzionante sulla membrana cellulare.

Le mutazioni di Classe 3 colpiscono la regolazione (apertura e chiusura ndr)

del canale del cloro. La proteina è correttamente trasportata alla membrana cellulare ma poi non risponde alla stimolazione da parte di AMP ciclico. Queste mutazioni, localizzate a livello delle frazioni di proteina denominate "nucleotide binding fold" compromettono probabilmente il legame dell'ATP per l'attivazione del canale. La G551D è il prototipo di tali mutazioni. Ci si può aspettare che la terapia per queste mutazioni debba richiedere una attivazione della proteina CFTR parzialmente funzionante che è presente sulla membrana cellulare.

La Classe 4 include mutazioni che consentono un corretto trasporto alla membrana cellulare di una proteina CFTR che risponde agli stimoli di attivazione ma che genera una ridotta corrente di cloro.

L'ultima classe, la Classe 5, recentemente proposta, comprende mutazioni di stabilità proteica, che comportano una proteina mancante degli ultimi 70-98 aminoacidi nella regione terminale C. L'analisi del processo di biosintesi ha dimostrato che gli ultimi 82 aminoacidi non sono essenziali per lo sviluppo di conformazione della proteina ma l'emivita della CFTR troncata è ridotta di 5-6 volte.

Ci si può aspettare per i futuri approcci terapeutici che vengano probabilmente disegnate nuove molecole, dirette allo specifico difetto molecolare della proteina CFTR che sta alla base e che la determinazione del preciso genotipo sia critica nella scelta di tale terapia.

3. LO SCREENING NEONATALE CF

Negli anni passati noi abbiamo anche

dimostrato la fattibilità dello screening neonatale in Bretagna, impiegando un protocollo a due gradini che combina l'analisi IRT (tripsina immuno-reattiva ndr) con l'analisi di mutazioni CFTR. Le analisi di IRT e di mutazioni possono essere fatte utilizzando piccolissimi campioni di sangue essiccato sulla stessa carta da filtro. Questo approccio analitico è utile in ogni popolazione che presenti la maggior parte delle mutazioni attualmente conosciute.

4. MALATTIE ASSOCIATE A CFTR

Gli individui con CBAVD (atresia bilaterale congenita dei vasi deferenti - infertilità maschile ndr) portano frequentemente mutazioni nel gene CFTR ma non mostrano abitualmente le classiche manifestazioni CF. Circa il 70% dei pazienti con CBAVD hanno una mutazione e il 15% ne posseggono due. La proporzione di pazienti con CBAVD che hanno l'allele 5T (una particolare mutazione intronica che porta alla mancanza dell'intero esone 9 nell'RNA messaggero e quindi impedisce in larga misura, ma non completamente, la sintesi di CFTR normale ndr) è 5-6 volte più alta che nella popolazione normale. I pazienti CBAVD non hanno in genere malattia polmonare poiché essi conservano comunque una certa quantità di RNA messaggero CFTR normale nel tessuto polmonare.

Più recentemente si è trovato che anche la pancreatite cronica è associata a mutazioni nel gene CFTR e diversi studi hanno riportato una frequenza variabile tra il 20% e il 30% di mutazioni CFTR nei casi di pancreatite cronica sporadica.

La fibrosi cistica è un disordine com-

plesso associato ad uno spettro ampio e complesso di manifestazioni cliniche. Il tipo di mutazioni nel gene CFTR è con chiarezza direttamente legato al fenotipo clinico CF per quanto riguarda la funzione pancreaticca (ma non altrettanto per la funzione polmonare ndr). La conoscenza del difetto molecolare associato al gene CFTR ha fortemente migliorato la nostra attitudine a fare una diagnosi clinica corretta ed un corretto accertamento di fibrosi cistica. I nuovi mezzi molecolari finora sviluppati hanno molto migliorato la consulenza genetica per la fibrosi cistica, lo screening neonatale, la diagnosi pre-natale e noi ci aspettiamo per il prossimo futuro che la fisiopatologia della CF sia chiarita e che nuove terapie siano proposte per curare definitivamente questa malattia, grazie alla scoperta del gene CFTR.

LE TERAPIE MIRATE AL DIFETTO DI BASE DELLA FIBROSI CISTICA, con particolare riguardo alle ricerche in campo di terapia genica

Prof. Pamela Zeitlin

Professore di Pediatria, Direttore della Divisione "Eudowood" di Scienze Respiratorie Pediatriche, The Johns Hopkins University Hospital, Baltimora - Stati Uniti d'America

La prof.ssa Zeitlin ha offerto una panoramica delle terapie potenzialmente utili a correggere il difetto di base della CF, sulle quali ha investito molto della sua attività di ricerca e di divulgazione scientifica negli ultimi anni. Tuttavia questo sommario si riferisce soltanto alle conoscenze sviluppate con l'impiego di un nuovo vettore virale, il virus adeno-associato (AAV).

1. LA TERAPIA GENICA DELLA FIBROSI CISTICA: ABBIAMO FATTO QUALCHE PROGRESSO DA QUANDO IL GENE È STATO IDENTIFICATO?

Fin quasi dal momento in cui il gene CFTR fu identificato, sequenziato e pubblicato nel 1989, gli scienziati medici avevano predetto che la guarigione della malattia tramite terapia genica poteva essere raggiunta. Una serie di differenti vettori genici furono disegnati e testati, ma pochi di essi sono sopravvissuti alle sperimentazioni pre-cliniche e a quelle cliniche iniziali, dette di fase 1. L'obiettivo è quello di raggiungere un trasferimento stabile



La sessione divulgativa al Centro Marani. Sul podio il prof. Steven Conway. A destra il prof. Antonio Cao e il prof. Gianni Mastella

alle cellule epiteliali delle vie aeree e con un adeguato livello di espressione di CFTR normale. Si è assunto che livelli maggiori del 10% di CFTR normale dovrebbero essere sufficienti a correggere le proprietà elettriche dell'epitelio delle vie aeree (1).

Sfortunatamente rimangono significative barriere contro una efficace terapia genica per la fibrosi cistica.

Vi sono due differenti sistemi di somministrazione del vettore che hanno avuto qualche successo nelle prime sperimentazioni cliniche: i liposomi cationici non virali e il virus adeno-associato sierotipo 2 (AAV2). La mia conversazione sarà focalizzata sul vettore virale AAV2.

2. IL VETTORE VIRALE ADENO-ASSOCIATO (AAV2) PER LA TERAPIA GENICA CF

L'AAV2 fu scoperto per la prima volta come un "contaminante" nelle colture cellulari di adenovirus e per la prima volta identificato nell'uomo durante un'epidemia di infezione da adenovirus (2). Non si sono visti sintomi di malattia associati direttamente all'AAV e questo sembra pertanto essere un virus innocuo. L'AAV è un "dependivirus" (virus dipendente ndr) della famiglia dei parvovirus. Esso manca della capacità di replicazione, il che significa che esso deve contare su funzioni aggiuntive da parte di virus di supporto (helper virus) per poter riprodursi. Le funzioni di helper virus possono essere fornite sia da un adenovirus che da un herpesvirus. Questo consente un teorico margine di sicurezza, poiché un vettore genico virale AAV2 puro non può replicarsi nell'epitelio respiratorio umano. L'AAV è molto piccolo, circa 20 nm (nanometri), e contiene appena due geni virali, rep e cap. Questi geni possono essere rimossi e sostituiti con il cDNA che si vuole impiegare per il trasferimento genico.

L'AAV2 selvaggio, dotato di rep e cap, si integra preferibilmente a livello del sito AAVS2 nel genoma umano (3). Questa integrazione appare essere sicura (senza effetti biologici dannosi ndr) e può avvenire con copie multiple del virus. Il virus integrato appare anche essere in equilibrio stabile con le forme episomiche (extra-cromosomiche) del virus. Anche l'AAV2 ricombinante con CFTR cDNA (il virus in cui è stata inserita la sequenza DNA del gene CFTR ndr) si integra, ma il sito S2

non è più quello privilegiato (4). Le copie episomiche appaiono essere stabili e dominanti rispetto alle copie integrate in colture cellulari. Questa combinazione di copie integrate ed episomiche pare conferire espressione persistente del gene, che raggiunge il suo picco a 28 giorni e può durare per mesi, in dipendenza dalla riserva di tessuto disponibile e dalla natura del cDNA inserito nel vettore.

La Targeted Genetics Corporation, Seattle WA USA, ha sviluppato il vettore genico tgAAVCF. Questo vettore usa le sequenze ITR come promotore e il cDNA umano CFTR in tutta la sua lunghezza.

Il primo studio clinico cominciò alla Johns Hopkins School of Medicine testando il tgAAVCF con somministrazione nasale e bronchiale. 25 soggetti ricevettero una dose singola secondo un protocollo "dose finding" (basato sulla ricerca della dose utile ndr) che dimostrò sicurezza e trasferimento del gene. Non ci fu invece consistente evidenza di espressione del gene (attività del gene con produzione di RNA messaggero ndr) attraverso l'analisi RT-PCR. Un secondo studio clinico fu condotto presso l'Università di Stanford sui seni paranasali, impiegando sia la dose singola che la dose ripetuta (5). Furono studiati 25 soggetti e venne dimostrata sia la sicurezza della somministrazione che il trasferimento genico nel lungo termine. Si ottenne indicazione di efficacia in base al reperto di un minor numero di episodi di sinusite nei seni trattati con il vettore genico rispetto a quelli trattati con placebo.

Uno studio con dose singola per via aerosolica fu in seguito condotto negli USA nell'ambito del "Cystic Fibrosis Therapeutics Network". Un totale di 16 soggetti ricevettero per nebulizzazione sia il placebo che il farmaco in studio. Fu dimostrata sia la sicurezza della somministrazione che l'effettivo trasferimento genico. Recentemente è stato completato nell'ambito dello stesso Network un trial clinico di fase II per via aerosolica con dose ripetuta. Tre dosi alla distanza di un mese hanno portato ad un significativo miglioramento della FEV1 un mese dopo la prima dose, in comparazione con il placebo. Circa allo stesso tempo le concentrazioni di IL-8 (interleukina-8, sostanza ad effetto infiammatorio ndr) nello sputo provocato si sono abbassate. Questo effetto era meno pronuncia-

to ad un mese dopo la seconda dose. Nonostante tutto, questi risultati sono incoraggianti ed ora si sta allestendo un trial clinico di follow-up in un più largo gruppo di pazienti.

3. LE BARRIERE CHE OSTACOLANO UNA EFFICACE TERAPIA GENICA

L'epitelio delle vie aeree possiede recettori a livello di membrana cellulare che legano i capsidi (involucro ndr) del vettore AAV2. I recettori usati da AAV sierotipo 2 sono concentrati sulla membrana basolaterale delle cellule. Questo riduce l'efficienza di un vettore somministrato per aerosol alla membrana cellulare che guarda il lume bronchiale (membrana apicale). Una volta che il virus sia internalizzato nella cellula, esso deve viaggiare verso il nucleo ed entrare nel nucleo. Sembrano esservi delle limitazioni all'efficienza di questo trasporto. Nel nucleo, il destino più comune del virus è la costituzione di un episoma (minuto corpuscolo al di fuori dei cromosomi ndr), tuttavia una frazione di genomi virali può integrarsi con il genoma della cellula ospite secondo modalità random (a caso). Le vie aeree CF sono ostruite a causa di infezione ed infiammazione. Le proteasi (enzimi che agiscono sulle proteine, liberati dai leucociti o dai batteri) possono contrastare l'efficacia del trasferimento genico attaccando le proteine del capsido virale. Anticorpi neutralizzanti il capsido sono stati trovati negli studi clinici sull'uomo e questi appaiono aumentare con la ripetizione delle dosi. La risposta immunitaria potrebbe in definitiva limitare l'utilità di ripetere le somministrazioni.

Tra gli approcci rivolti a migliorare la terapia genica con AAV vanno annoverati l'impiego di sierotipi AAV alternativi che siano in grado di riconoscere recettori della membrana apicale, farmaci costituiti da piccole molecole che siano in grado di migliorare il trasporto di AAV al nucleo, il pretrattamento con antiproteasi ed antibiotici per ripulire le vie aeree prima della somministrazione, la pseudotipizzazione del vettore per consentire somministrazioni ripetute nonché la soppressione immunitaria transitoria, fatta al momento della somministrazione del vettore.

Convention d'autunno dei ricercatori italiani CF

Secondo annuncio

Verona
14 - 15 novembre 2003

Sede della Fondazione
e Centro Marani,
Ospedale Maggiore,
P.le Stefani 1

Viene confermato l'incontro a Verona dei Ricercatori italiani CF organizzato dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica.

Il programma prevede:

- Relazioni di due ricercatori stranieri su grandi temi emergenti di ricerca CF.
- Reports sullo stato di avanzamento dei progetti di ricerca finanziati dalla Fondazione nel 2002:
 - F. Ascenzioni (Roma), O. Zegarra Moran (Genova), M. Conese (Milano):
Minicromosomi, nuovo vettore per la terapia genica CF.
 - M. Conese, E. Copreni (Milano):
Efficienza ed efficacia di Lentivirus come vettore per la terapia genica della fibrosi cistica.
 - P. Melotti (Verona):
Azitromicina: possibile ruolo diverso da quello antibiotico.

- R. Fontana, G. Golini (Verona):
Nuovi Marcatori tassonomici di Burkholderia cepacia complex.

- Reports su risultati preliminari dei progetti finanziati dalla Fondazione nel 2003: invito verrà rivolto ai leaders di progetto che desiderano presentare eventualmente tali risultati per un confronto con altri ricercatori.

La sessione scientifica si svolgerà il venerdì 14 novembre dalle ore 10 alle 18,30 presso la sede della Fondazione.

Una sessione informativa per laici avrà luogo il sabato 15 novembre dalle ore 10 alle 13 presso il Centro "Marani. Sono Invitati pazienti, familiari amici e sostenitori.

Convegno del Gruppo di Lavoro Italiano FC

Verona
13 novembre 2003

Centro Culturale Marani,
Ospedale Maggiore,
P.le Stefani 1

**STRUMENTI E PRATICHE PER MIGLIORARE
LE CURE NELLA FIBROSI CISTICA E NELLE
MALATTIE RESPIRATORIE CRONICHE**

Programma - Ore 9 - 13,30

- Strumenti per la misura della qualità di vita in CF: proposta di studio multicentrico (R. Nobili, Milano)
- Strumenti per la misura della qualità di vita nell'asma: ricerca e prassi clinica (L. Indinnimeo, Roma)
- Prevenzione e controllo delle infezioni crociate nei Centri CF (F. Festini, Firenze)
- Applicazione delle linee guida basate sull'evidenza (L. Ballini, Modena)
- Le cure domiciliari nelle malattie croniche: esperienze a confronto (D. Fogazza, Palermo)
- La cartella clinica CF informatizzata: esperienza di un Centro CF (D. Salvatore, Potenza).

Segreteria organizzativa: Dr. C. Braggion (E-mail: cbraggion@qubisoft.it - tel 045 807 2294 - Fax 045 807 2242)

Laboratori italiani dedicati alla ricerca FC

L'Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis presso l'H S. Raffaele di Milano

L'Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis è stato creato nel 2000 dall'Associazione Lombarda Fibrosi Cistica allo scopo di promuovere la ricerca scientifica nell'ambito della terapia genica della fibrosi cistica. Nell'Istituto, attualmente diretto dal Dr. M. Conese, vi lavorano 7 operatori tra biologi, tecnici di laboratorio e tesisti.

Le linee di ricerca in corso in questo momento sono:

- **Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica.** In questo progetto vengono utilizzati xenotrapianti di tessuto respiratorio umano e topi immuno-

competenti al fine di verificare che il gene CFTR, trasdotto mediante lentivirus ricombinanti, sia capace di controllare l'infezione ed infiammazione delle vie respiratorie.

- **Sviluppo di un approccio non virale per il trasferimento del gene CFTR nell'epitelio respiratorio di pazienti con fibrosi cistica.** Lo scopo finale di questo progetto è quello di trovare una formulazione di DNA associata ad un vettore cationico non immunogeno che superi la barriera mucosa delle vie respiratorie dei pazienti FC.

- **Valutazione di un nuovo approccio alla terapia genica della fibrosi cistica mediante mini-cromosomi,** in collaborazione con la Dott.ssa F. Ascenzioni (Università "La Sapienza" di Roma) e la Dott.ssa O. Zegarra-Moran (Istituto G. Gaslini di Genova). Il progetto prevede la caratterizzazione di mini-cromosomi che trasportano il locus genetico CFTR e la loro introduzione in cellule e in modelli di topi FC.

- **Valutazione di nuove molecole ad attività anti-batterica e rilevanti per un approccio terapeutico dell'infezione respiratoria nella fibrosi cistica.** In questo progetto viene studiata in particolare la pentrassina 3, facente parte dell'immunità naturale, ed i suoi effetti di modulazione dell'interazione dei batteri con le cellule respiratorie.

I progetti sono finanziati da: Associazione Lombarda Fibrosi Cistica, Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, Lega Italiana Fibrosi Cistica, Telethon, Comunità Europea.

La Dott.ssa Copreni intenta al lavoro sull'isolatore per animali con infezione respiratoria



Personale dell'Istituto (da sinistra): Salvatore Carrabino, Annalisa Bagnacane, Gemma Migneco, Sante Di Gioia, Marianna Penzo, Elena Copreni, Massimo Conese



Il percorso formativo CF

Concluso il 5° Modulo

Si è svolto dal 29 al 31 maggio scorso il 5° modulo del Percorso Formativo multidisciplinare, promosso e organizzato dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica, dedicato ad operatori sanitari e ricercatori attivi nel campo della fibrosi cistica. Il Percorso, strutturato in 6 moduli di 3 giorni ciascuno è iniziato nel settembre 2002 e si concluderà nel settembre 2003. Gli obiettivi di questo 5° modulo erano mirati a integrare le informazioni provenienti dai singoli pazienti e dalla esperienza clinica dei partecipanti con le conoscenze più aggiornate, esaustive e metodologicamente corrette, circa l'efficacia e l'appropriatezza degli interventi clinici. I partecipanti al corso hanno appreso tra l'altro, anche con esercitazioni al computer, le principali opzioni tecnologiche a disposizione della ricerca bibliografica (banche dati biomediche) e, a grandi linee, i principali elementi per valutare criticamente la letteratura scientifica primaria e secondaria, ragionando sull'applicabilità ai singoli pazienti delle indicazioni della letteratura. Al centro dei confronti in aula vi è stata la discussione sulla "Evidence-based Medicine", cioè la medicina basata sulle prove di efficacia. Un tema questo cruciale se si intende andare oltre l'empirismo e la semplice "esperienza personale", pur indispensabile, nella scelta degli interventi diagnostici e terapeutici più appropriati. Non tutto è provato in medicina ma la verifica di quanto è sufficientemente provato è garanzia di vantaggio e sicurezza per il malato e per gli investimenti dell'organizzazione sanitaria.



I partecipanti al 5° modulo del percorso formativo CF nel giardino della Fondazione

Echi dal Congresso Europeo CF di Belfast

Una città strana Belfast, con ancora i segni di un conflitto plurisecolare tra i suoi abitanti, cuore di una regione, l'Irlanda del Nord, generosa e ribelle ma rimasta ai margini delle comunicazioni tra popoli. Qui, sulla riva del fiume Lagan, in un clima grigio di

(a destra) La sede della Conferenza:
Belfast Waterfront Hall sul fiume Lagan

(sotto) Il Municipio di Belfast



4 - 7 giugno 2003



vento e sottile pioggia, raramente rischiarato da finestre di sole, si è svolta la 26a Conferenza Europea sulla Fibrosi Cistica.

Larga la partecipazione italiana, supportata anche da contributi scientifici di buon livello, rimane questo un appuntamento prezioso per cogliere il polso del mondo CF europeo, per

conoscere i gruppi che si stanno muovendo più agilmente, per scambiare opinioni tra operatori sanitari e ricercatori che si incontrano una volta l'anno, per "vendere e comprare" idee e contributi potenzialmente utili ai nostri pazienti e allo sviluppo della ricerca. Non è mancata la preziosa iniezione di contributi nordamericani.

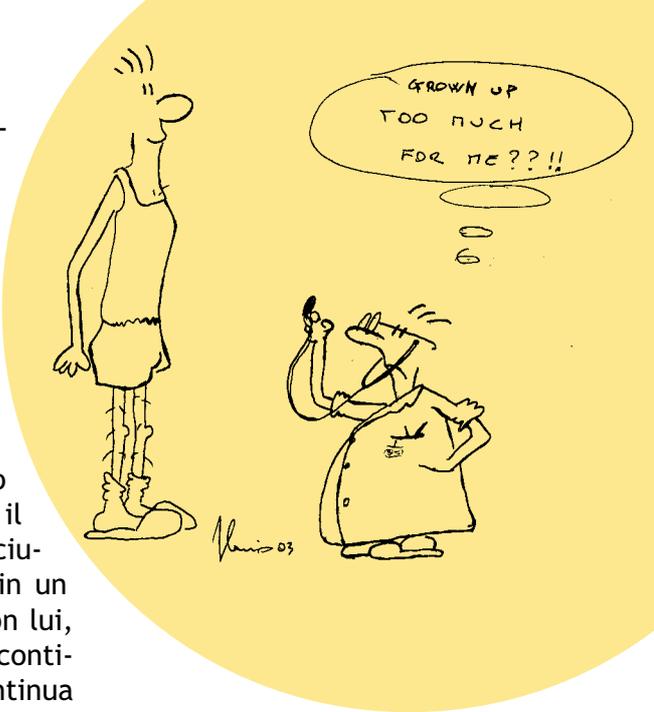
Di questo evento daremo qui un profilo molto essenziale, giusto per cogliere le tematiche più rilevanti che sono state trattate.

I PIONIERI E LA STORIA. La Conferenza si è aperta con una lettura di G. Mastella, che ha ripercorso a grandi linee le fasi pionieristiche della storia europea della fibrosi cistica, con riferimento anche ai personaggi che hanno dato il via alla comunità scientifica europea CF negli anni '60 e '70: da E. Rossi di Berna a A.P. Norman di Londra a F. Hennequet di Parigi e molti altri, in gran parte scomparsi. Si tratta di un percorso di studio e di costruzione di modelli di cura che hanno fatto registrare nel corso di oltre 40 anni un drammatico allungamento della vita delle persone CF, come testimoniato dall'analisi statistica di sopravvivenza della figura che riportiamo in fondo pagina, elaborata sui dati dei malati afferenti al Centro CF Veneto dagli anni '50, con risultati del resto non dissimili da quelli ottenuti in altri paesi europei, specie del Nord.

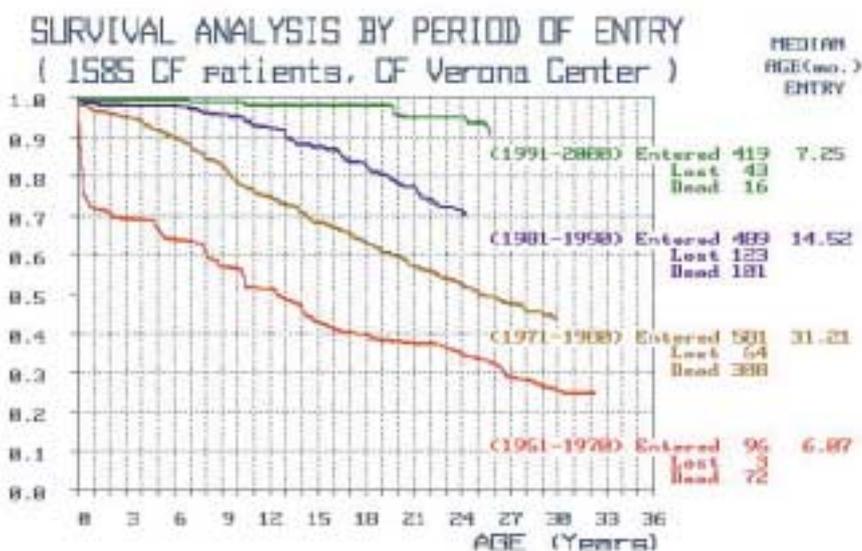


Le curve indicano il venir meno dei pazienti CF afferenti al Centro Veneto CF dal 1950 al 2000 con l'avanzare dell'età (age-anni) : essi sono raggruppati in 4 periodi di 10 anni ciascuno (curve a diversi colori), dal 1951 al 2000, in base all'epoca in cui sono entrati al Centro. I pazienti entrati nell'ultimo decennio hanno una previsione di vita di gran lunga superiore a quelli dei decenni precedenti. Nel periodo 1951-70 il grosso della mortalità era concentrata nei primissimi anni di vita. Oggi l'attesa media di vita è vicina ai 40 anni. Nella scala verticale a sinistra, 1.0 = 100%, 0.0 = 0%.

GLI ADULTI. Questa accresciuta sopravvivenza ha fatto sì che oggi i Centri CF europei assistano mediamente più adulti che bambini. Sul tema dell'assistenza agli adulti CF vi sono stati a Belfast vari momenti di confronto. In sostanza, l'adulto è meglio assistito nel centro pediatrico con il personale che lo ha conosciuto fin da bambino e che in un certo senso è cresciuto con lui, in un percorso quindi di continuità di cure come continua nella sua evoluzione è la malattia? Oppure è più appropriato l'ambito terapeutico della pneumologia dell'adulto? La tendenza più diffusa, ma ancora discussa, sembra quella di affidare l'adulto CF all'equipe che cura adulti, con un programma di transizione dal centro pediatrico a quello pneumologico che dia continuità al trattamento e sicurezza al malato. Probabilmente la soluzione più ragionevole è quella di un Centro unico con sezioni separate per bambini da un lato ed adolescenti-adulti dall'altro.



LO SCREENING NEONATALE. Si stanno ormai accumulando dati a sostegno del beneficio che lo screening neonatale comporta nell'evoluzione della malattia, soprattutto sotto il profilo nutrizionale e della crescita ma anche sotto quello più complessivo dello star bene. Su questo vi è stato un ragionevole consenso nell'incontro di Belfast. Già nella lettura inaugurale sono state portate testimonianze che la popolazione CF venuta a diagnosi per screening acquisisce meno frequentemente ed in media più tardivamente l'infezione da Pseudomonas aeruginosa e da B. cepacia, mantiene nel tempo più elevati valori di funzione respiratoria associati a minor danno radiologico polmonare e tende ad una più lunga sopravvivenza.



GENETICA. Benché vi sia oggi un diffuso interesse per i cosiddetti geni modificatori, cioè geni diversi dal CFTR che possono influire positivamente o negativamente sul decorso della malattia, poco di questo è stato prodotto a Belfast. Si segnalano peraltro alcuni contributi sulle varianti del gene MBL che possono portare a bassi livelli di una sostanza protettiva contro le infezioni, la "lectina legante mannosio": i pazienti CF con deficit di questa sostanza avrebbero un andamento più grave della malattia polmonare. Altrettanto dicasi per le varianti di alcuni geni implicati in alcune attività metaboliche dell'organismo.

NUOVE TERAPIE. Si tratta di studi mirati a possibili terapie del futuro. Negli studi di terapia genica, tornati per nuove strade alla ricerca laboratoristica, l'attenzione maggiore è oggi rivolta a scoprire nuovi vettori per il trasporto del gene normale alle cellule malate. I nuovi vettori dovrebbero consentire maggiore stabilità del trasferimento genico, maggiore efficienza del gene trasferito, minori reazioni infiammatorie di rigetto da parte dell'organismo. In quest'area si sono avuti interessanti contributi anche da parte di gruppi di ricerca italiani. Tra i vettori più interessanti segnaliamo: minicromosomi, Lentivirus, un vettore non virale denominato polietilenimina, alcuni lipidi derivati da amino-glicosidi, un papilloma-virus umano, un adenovirus 2 di origine canina.

Degni di interesse sono gli sforzi rivolti a produrre sinteticamente alcuni peptici antimicro-

bici, tra cui le cosiddette beta-defensine, simili a quelli secreti naturalmente dalle cellule respiratorie, da usare eventualmente come antibiotici verso i ceppi multiresistenti di B.cepacia.

Vi sono stati reports su risultati preliminari, peraltro ancora poco valutabili, con alcuni vaccini anti-Pseudomonas aeruginosa. Si sta anche sperimentando una immunoglobulina specifica anti-Pseudomonas, ricavata dai polli (IgY).

Un potenziale effetto terapeutico sul trasporto di cloro in CF viene attribuito ad una sostanza, il tiotropio bromuro, già impiegato nel trattamento della bronchite cronica ostruttiva.

Primi dati di sicurezza e forse di contenimento della risposta infiammatoria sono stati forniti su un nuovo farmaco ancora nelle prime fasi di sperimentazione, capace in vitro di neutralizzare la dannosa elastasi prodotta dai leucociti neutrofili nell'infezione polmonare: un "inibitore dell'elastasi neutrofila".

BATTERI, INFEZIONE, INFIAMMAZIONE.

Una valanga di contributi sono venuti dai laboratori europei di microbiologia centrati su vari aspetti di un batterio ancora poco conosciuto che sta dando dei problemi nella malattia polmonare CF, la Burkholderia cepacia.

Ultimamente, e la Conferenza di Belfast ce ne ha dato la conferma, sotto la voce B.cepacia si trovano in realtà diverse specie batteriche apparentemente simili ma tra loro diverse nel profilo genetico ed in parte anche come aggressività nei confronti del polmone CF (si parla oggi di "B.cepacia complex"). Almeno 10 specie o

varianti genomiche ("genomovars") sono state finora riconosciute. Sono state proposte diverse modalità di analisi batteriologica e di identificazione genetica. L'importanza di identificare correttamente le diverse specie deriva dal fatto che probabilmente si potranno adottare in futuro criteri differenziati di trattamento ma anche di segregazione dei pazienti: alcune varianti sono più facilmente trasmissibili di altre, alcune sono forse più trattabili.

La Pseudomonas aeruginosa è considerata in genere poco trasmissibile tra paziente e paziente, salvo situazioni di prolungato e intenso contatto. Tuttavia stanno emergendo in Inghilterra e in Australia ceppi cosiddetti "epidemic" cioè più facilmente trasmissibili e quindi meritevoli di un accurato monitoraggio degli ambienti di cura.

Una curiosità: l'estratto di ginseng riduce nello Pseudomonas l'espressione di fattori necessari alla sua colonizzazione, rendendolo quindi più innocuo, mentre un farmaco denominato "Recoxib" avrebbe una straordinaria capacità di attenuare la virulenza di Pseudomonas. Si tratta di proposte finora studiate solo in vitro.

FISIOTERAPIA. Una interessante proposta di linee guida sul trattamento fisioterapico del lattante e bambino piccolo con fibrosi cistica ma senza sintomi ci è venuto dai fisioterapisti inglesi. Tale trattamento deve essere molto flessibile: si dovrebbe privilegiare un approccio "olistico", cioè basato sulle prestazioni complessive del bambino, con enfasi sull'e-

I pionieri della Fibrosi Cistica

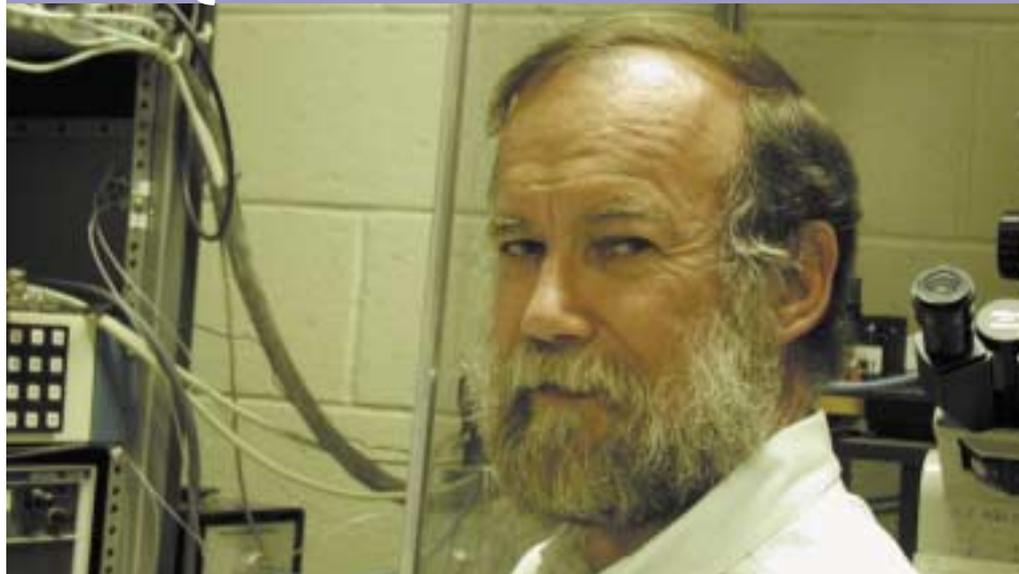
PAUL QUINTON

ducazione al movimento ed all'esercizio fisico. Sarebbe da evitare, secondo i terapeuti inglesi, la prescrizione di un regime routinario stretto di terapia drenante: questo andrebbe instaurato invece al comparire di sintomatologia respiratoria.

NUTRIZIONE, DIABETE, FEGATO, OSSA. Viene data conferma che il riconoscimento precoce di diabete Cf e il suo precoce trattamento con insulina determina una migliore composizione corporea ed una maggiore stabilità della funzione polmonare. La povertà di insulina nel paziente Cf comporta tra l'altro una considerevole riduzione di appetito.

La malattia epatica Cf rimane sempre oggetto di studio, anche nel tentativo di prevenirla o di attenuarne il decorso. Interessante è apparso uno studio epidemiologico irlandese da cui si ricava che la diagnosi precoce protegge dallo sviluppo di questa complicanza, che si ritroverebbe invece più frequentemente nei pazienti con diagnosi tardiva.

Il problema della mancanza di appetito, come noto, è cruciale in larga parte di pazienti Cf: vengono portati dati incoraggianti sull'effetto stimolante l'appetito di due farmaci, la ciproptadina, un blando antistaminico, e il megestrol, un ormone progestinico. Sempre vivo è l'interesse di studio per l'osteoporosi-osteopenia, particolarmente rilevante negli adulti e ancor più nei pazienti trapiantati. Tuttavia ancora non emergono criteri sperimentati per prevenire una tale complicanza.



Paul Quinton, biologo e fisiopatologo cellulare, rappresenta nella storia della ricerca biologica CF un passaggio chiave, una svolta che ha aperto nuove strade alla ricerca. Nel 1983, studiando i meccanismi molecolari che regolano la funzione della ghiandola del sudore, egli scopre il nucleo fondamentale del difetto di base a livello di cellule epiteliali: il difetto di trasporto del cloro, da cui derivano alterazioni nella composizione del sudore e di tutti i secreti prodotti dagli epitelii e ghiandole di vari organi. Circa 15 anni dopo, con la scoperta del gene CFTR, si sarebbe identificato nella proteina CFTR, codificata da tale gene, il canale di trasporto del cloro, mancante o malfunzionante nel malato con fibrosi cistica. Recentemente egli ha richiamato l'interesse dei ricercatori alle anomalie di secrezione di un altro elettrolita, il bicarbonato, che potrebbero spiegare alcuni aspetti problematici del difetto molecolare. Paul Quinton dedicò e sta dedicando a questi studi di finissima bio-

logia cellulare e molecolare non solo la sua straordinaria professionalità di scienziato ma anche una sensibilissima umanità ed anche le proprie ghiandole del sudore, che egli preleva regolarmente con microbiopsia dalla pelle delle sue braccia. Paul è stato ed è un grande amico dei ricercatori CF veronesi. Assieme a lui, Gianni Mastella, Giorgio Berton e Giulio Cabrini organizzarono a Verona (Villa Quaranta) nel 1987 un convegno internazionale sulla ricerca di base CF: eravamo quasi alla vigilia della scoperta del gene CFTR (1989) e si incontrarono allora a Verona quasi tutti gli attori principali della ricerca CF di quel tempo, europei, nordamericani ed australiani. Quel convegno (i cui contenuti sono pubblicati in un volume edito da G. Mastella e P.M. Quinton: "Cellular and Molecular basis of Cystic Fibrosis" San Francisco Press, Inc., San Francisco CA, USA, 1988) fu premonitore di eventi di ricerca che sarebbero esplosi con una progressione inattesa negli anni immediatamente successivi.



fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus

Sede: presso Ospedale Maggiore Borgo Trento - P.le Stefani, 1 - 37126 Verona - (dietro il Centro Culturale "Marani")

CONSIGLIO DI AMMINISTRAZIONE

Presidente **Vittoriano Faganelli**
 Vicepresidente **Carlo Delaini**
 Consiglieri **Valerio Alberti**
Luigi Bozzini
Donato Bragantini
Giuseppe Ferrari
Matteo Marzotto
Gianni Mastella
Sergio Ricciardi
Alessandro Riello
Michele Romano
Luciano Vettore

COMITATO DI CONSULENZA SCIENTIFICA

Presidente **Antonio Cao**
 Consulenti **Giorgio Berton**
Roberto Buzzetti
Lucio Luzzatto
Nello Martini
 Direttore Scientifico **Gianni Mastella**

SERVIZI DELLA FONDAZIONE

Segreteria generale **Emanuela Capri**
 Revisore dei Conti **Roberto Vantini**
 Tesoriere **Enzo Fabietti**
 Segretariato per la Comunicazione **Tecla Zarantonello**
 Segretariato Attività Promozionali **Piero Armani**
 Comitato Marketing Sociale **Luca Capelli**

Presidenza e Segreteria:

Tel. 045 8073438 - Fax 045 8073568
 cell. 348 2735532
 E-mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it

Segretariato Comunicazione e Comitato Marketing:

Tel. 045 8073599
 E-mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it

Direzione Scientifica :

Tel. 045 8073567 - Cell. 347 6287890
 E-mail: gianni.mastella@mail.azosp.vr.it

Segretariato Attività Promozionali:

Tel. 045 8073604-3605
 Fax 045 8073568

Sito internet:

www.fibrosicisticaricerca.it

LA NOSTRA FRONTIERA:

contribuire a debellare la fibrosi cistica promuovendo una ricerca scientifica qualificata.

ABBIAMO UN PIANO:

aiutateci a realizzarlo!

I PROGRAMMI DELLA FONDAZIONE NEL 2003 E 2004 A SOSTEGNO DI RICERCA E FORMAZIONE, RICHIEDONO INGENTI RISORSE

INVESTIMENTI DELLA FONDAZIONE NEL 2002

PER RICERCA, FORMAZIONE, AGGIORNAMENTO

• Finanziamento 4 progetti di ricerca:	€ 492.000
• Sostegno attività di ricerca del Centro veneto CF (convenzione Fondazione-Azienda Ospedaliera):	€ 285.000
• Percorso formativo CF, Seminari, Pubblicazioni:	€ 96.000
Totale:	€ 873.000

Visitate il SITO INTERNET DELLA FONDAZIONE
www.fibrosicisticaricerca.it

Si chiede di dare diffusione a questo Notiziario tra amici e conoscenti, segnalandoci eventualmente il loro indirizzo, perché lo possano ricevere periodicamente a casa.

Notiziario quadrimestrale della Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica - Onlus

Presso Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona

DIRETTORE RESPONSABILE
 Andrea Sambugaro

REDAZIONE
 Tecla Zarantonello

CONSULENZA SCIENTIFICA
 Gianni Mastella

REALIZZAZIONE GRAFICA
 Giovanna Dolfini

STAMPA
 Tipolitografia Artigiana
 Via Monte Carega, 8
 San Giovanni Lupatoto (VR)

REGISTRAZIONE
 Tribunale di Verona
 n° 1533 del 13/3/2003

ffc *fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus*

in Collaborazione con

LIGA ITALIANA FIBROSI CISTICA ONLUS **UNIVERRITÀ VERONA**

COSTA POCO FARE MOLTO.

PER INFORMAZIONI:
 sede Fondazione presso l'Ospedale Maggiore Borgo Trento • P.le Stefani, 1 • 37126 Verona
 Tel. 045/8073599 • 045/8073438 • Fax 045/8073568 • e-mail: fondazione.ricercafc@azosp.vr.it
www.fibrosicisticaricerca.it

PER DONAZIONI:

- UniCredit Banca c/c n°9465317 • Ag. di B. Trento • ABI 2008 • CAB 11718
- Banca Popolare Veneta c/c n°48829 • Ag. di B. Trento • ABI 3188 • CAB 11708
- c/c postale n°18841379
- numero verde 800.955.905 attivo tutti i giorni 24 ore su 24 • con carta di credito
- sul sito www.fibrosicisticaricerca.it

La donazione può essere detratta dall'IRPEF nella misura del 19% dell'importo fino ad un massimo di euro 20%. Le imprese o società possono dedurre dal reddito d'impresa un importo massimo di euro 2000 o il 2% del reddito dichiarato (art. 13 del D.L. 46/97).

Tratto dal leaflet della settimana della Ricerca Italiana Fibrosi Cistica