otizia **FONDAZIONE PER LA RICERCA SULLA FIBROSI CISTICA** Italian Cystic Fibrosis Research Foundation **N. 7 DICEMBRE 2003**

Buon Natale 2003

Presso Ospedale Maggiore, Piazzale Stefani, 1 - 37126 Verona

Ai nostri lettori, alle persone con fibrosi cistica e loro famiglie, ai ricercatori e operatori sanitari, ai sostenitori della ricerca CF, insieme uniti nella lotta a guesta malattia, un augurio particolare per un Natale di fiducia e di speranza da parte della Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica e di tutte le persone che vi operano.





Voci dalla ricerca settimana della Ricerca Italiana per la Fibrosi Cistica



stato questo il primo tentativo di far maturare una "consapevolezza" diffusa, su scala nazionale, intorno ad una patologia genetica rilevante ma ancor poco conosciuta e per la quale in Italia c'è ancora scarso investimento di ricerca. E' ancora presto per trarre un bilancio comples-

segue a pag. 2

🕤 Dallo Spot TV della Settimana

questo numero

Voci dalla "Settimana"	pag 1
Un nuovo bando per progetti di ricerca CF 2004	pag 2
Adottare un progetto di ricerca CF	pag 3
Il punto su un problema emergente:	
eradicazione precoce di Pseudomonas	pag 3
Echi dal Congresso Nordamericano CF: Anaheim	pag 4
Notizie dal Congresso della Società Italiana di Genetica Umana	pag 10
Convegno del Gruppo Italiano CF ("per migliorare le cure")	pag 12
Nutrizione artificiale in fibrosi cistica: un convegno a Trieste	pag 14
Convegno di pneumologia a Napoli, con problemi CF emergenti	pag 14
Reports dalla Convention d'Autunno dei Ricercatori Italiani CF	pag 15
Inserto La "Settimana": eventi, gruppi di sostegno, sponsors, media	

Appuntamenti 2004

14-15 maggio Verona

II° Seminario di Primavera su progressi recenti e sviluppi futuri in ricerca CF.

13-17 giugno Birmingham (Inghilterra)

27° Congresso Europeo sulla Fibrosi

14-17 ottobre St Louis (Luisiana, USA)

18ª Conferenza Nordamericana sulla Fibrosi Cistica.

18-24 ottobre

II^a Settimana della Ricerca Italiana per la Fibrosi Cistica.

28-30 ottobre Palermo

Congresso annuale del Gruppo Italiano Fibrosi Cistica.

19-20 novembre Verona

II^a Convention dei Ricercatori Italiani CF.

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

Settimana della Ricerca Italiana per la Fibrosi Cistica



sivo dell'iniziativa. Abbiamo al momento solo delle voci ed alcuni documenti, di cui diamo informazione nell'inserto speciale di questo notiziario, che ci permettono di considerare questo avvio come relativamente soddisfacente, anche se rimane solo un saggio di ciò che potrebbe essere sviluppato nel prossimo anno. Al momento di andare in stampa, una stima del ricavato netto, sul piano economico, si aggira sui

La campagna informativa attraverso le reti televisive si è valsa di uno spot giudicato dagli esperti assai pregevole: purtroppo

500.000 euro.

sono mancate le reti RAI. Alcuni programmi televisivi delle reti Mediaset hanno anche fatto qualche cenno alla campagna. Lo spot radio è stato trasmesso da molte emittenti locali in varie regioni. Numerosi settimanali e quotidiani hanno pubblicato il manifesto della campagna, sono stati invece scarsi gli articoli giornalistici dedicati

all'evento.

Il Manifesto della campagna (Gianluca che sogna ciò che sognano tutti i malati di fibrosi cistica e che affida alla ricerca la realizzazione dei suoi sogni) è stato diffusamente apprezzato e giudicato dai più di notevole impatto emotivo. La diffusione del manifesto e del pieghevole ad esso associato è stata realizzata in quasi tutte le regioni.

Si sono soprattutto attivati gruppi di volontari in varie parti d'Italia, con iniziative le più diverse: cene per la raccolta di fondi; bancherelle per la vendita di gadget (quello ufficiale è stato il cuscino-farfalla alle erbe aromatiche sul tema "dare ali alla speranza"), fiori ed altre invenzioni; concerti e spettacoli teatrali. Questi gruppi (alcuni sono delegazioni ufficiali della Fondazione) rappresentano un nucleo importante per dar seguito ad altre importanti iniziative di solidarietà.

Importante è stato il sostegno di alcuni sponsors (in particolare Verona Fiere, Fondiaria-SAI, Unicredit) per sostenere le spese della campagna. Sono stati raccolti anche segnali importanti di attenta collaborazione da parte della Lega Italiana Fibrosi Cistica.

In conclusione, questa settimana ha promosso energie nuove, ha suscitato nuove speranze di solidarietà diffusa sul problema che ci sta a cuore, ha anche fatto conoscere le difficoltà di un'impresa di sensibilizzazione e di "fund rising" basata quasi esclusivamente sul volontariato, ma ha soprattutto ispirato a molte persone l'idea di un'azione comune su scala nazionale, da sviluppare nel prossimo futuro, per una modalità nuova di affrontare la lotta ad una malattia genetica che ancora non perdona.

Accanto ed insieme alle molte persone e gruppi che hanno collaborato alla campagna, un particolare riconoscimento va riservato ad un grande e generoso Amico, Paolo Del Debbio, che è stato di questa campagna l'ideatore principale e il coordinatore.

Un nuovo Bando

l 10 dicembre 2003 verrà emanato dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica un nuovo bando per applications di nuovi progetti di ricerca da finanziare nel corso del 2004. Il bando avrà scadenza Per progetti di ricerca CF da finanziare nel 2004

al 9 febbraio 2004. Il bando verrà comunicato via Internet a tutti i Centri per la fibrosi cistica, al Gruppo Italiano Fibrosi Cistica, ai principali Istituti universitari e CNR ed altri istituti e laboratori di ricerca biomedica, nochè a tutte le persone che ne faranno richiesta alla Fondazione.

Le linee di ricerca, entro le quali i progetti dovrebbero inserirsi, sono quelle indicate nel numero 6 (agosto 2003) di NOTIZIE FFC.

I progetti presentati saranno selezionati attraverso un triplice vaglio: una prima valutazione da parte del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione, una revisione da parte di esperti indipendenti sulla base di specifiche competenze, una valutazione finale del Comitato di Consulenza Scientifica. Solo progetti di documentata qualità saranno ammessi al finanziamento, per il quale verranno utilizzate le risorse acquisite attraverso la campagna 2003 di raccolta fondi.

La definitiva assegnazione dei grants di ricerca avverrà nel giugno 2004.

Adottate un progetto Ricerca FC

Una proposta alle Delegazioni, ai Gruppi di Sostegno ed ai Grandi Donatori

Ouesta di adottare un progetto di ricerca selezionato dalla Fondazione nel 2004 è un'idea che proponiamo ai sostenitori che intendono finalizzare in modo più mirato il loro sostegno alla ricerca CF. L'adozione potrà essere fatta per l'intero finanziamento del progetto o per un finanziamento parziale. Coloro che intendessero orientarsi a questa iniziativa dovrebbero segnalare la loro intenzione al Segretariato per la Comunicazione della Fondazione (tel 045 807 3599, e-mail fondazione.ricercafc@azosp.vr.it), che provvederà a informarli dei progetti "a disposizione". Ai donatori che avranno scelto questa strada verranno date periodiche informazioni sullo stato di avanzamento del progetto adottato. Il donatore o il gruppo di donatori verranno segnalati come sostenitori di adozione dello specifico progetto nel Notiziario, sul sito web della Fondazione e su eventuali pubblicazioni dei risultati. A tuttoggi tre progetti sono stati già adottati con finanziamento parziale ma sostanzioso: "Minicromosomi, un nuovo approccio alla terapia genica CF" (F. Ascenzioni) da parte della **Bottega delle Donne** di Montebelluna; "Screening di farmaci approvati per uso umano (L. Galietta) e "Patogenesi e trattamento della malattia epatica CF" (M. Strazzabosco) da parte della Fondazione Cariverona.

Facciamo il punto su:

eradicazione precoce di Pseudomonas aeruginosa

Trattamento della prima comparsa di Pseudomonas aeruginosa.

a diagnosi eziologica delle infezioni respiratorie nella fibrosi cistica ha consentito l'ottimizzazione della terapia antibiotica e le aspettative di vita dei pazienti sono incrementate notevolmente. P. aeruginosa rappresenta oggi il principale patogeno per i pazienti affetti da fibrosi cistica e la prevalenza dei colonizzati da parte di questo germe incrementa progressivamente con l'aumentare dell'età. Molti studi hanno ormai dimostrato che la colonizzazione cronica da P. aeruginosa è da ritenere un marker prognostico sfavorevole poiché si accompagna a un più rapido declino delle prove di funzionalità respiratoria e ad una maggiore morbilità e mortalità. Alla luce di questi dati la possibilità di evitare la colonizzazione da P. aeruginosa (o quanto meno di ritardarla) appare un'ipotesi allettante per migliorare ulteriormente le aspettative di vita dei pazienti.

Ritardare la colonizzazione/infezione cronica da Ps. aeruginosa Le possibilità di ritardare l'infezione da P. aeruginosa appare oggi legata alla terapia eradicante. Con questo termine si intende il tempestivo trattamento antibiotico, al momento della prima comparsa del patogeno nelle vie aeree, finalizzato all'eliminazione del germe dalle secrezioni bronchiali prima del suo definitivo insediamento.

Pochi studi ma già incoraggianti Ad oggi solo un numero limitato



Dr. Giovanni Taccetti

di studi ha valutato l'efficacia della terapia eradicante ma risultati preliminari suggeriscono che è effettivamente possibile evitare o ritardare la colonizzazione cronica da parte di questo germe. Non sappiamo ancora quali siano i farmaci (o le associazioni di farmaci) e le vie di somministrazione più efficaci per il trattamento del primo isolamento del baterio, ma i risultati di cui siamo attualmente in possesso sottolineano

più l'importanza della tempestività del trattamento che il tipo di schema terapeutico scelto.

Limiti degli studi sinora fatti

Gli studi finora condotti hanno tuttavia alcuni limiti metodologici. Tutti sono stati eseguiti su un numero molto limitato di pazienti, le metodiche di raccolta delle secrezioni bronchiali non sono uniformi, il tipo di terapia adottato e la durata del trattamento differiscono notevolmente. Anche se il trattamento della prima comparsa di P. aeruginosa si prospetta come un nuovo approccio terapeutico nei confronti del germe, molti punti rimangono ancora da chiarire.

Le risposte che ancora mancano: necessità di larghi studi clinici Rimangono infatti ancora da precisare la percentuale di successo della terapia eradicante, il periodo libero dal germe dopo l'eradicazione, l'entità del declino

della funzione polmonare dopo l'eradicazione, il tipo di flora batterica selezionata dal trattamento a livello delle vie aeree, l'utilità della terapia nel prevenire lo sviluppo di ceppi batterici multiresistenti, e infine il costo della nei confronti di altri terapia schemi terapeutici. Ad ulteriore conferma dell'importanza che potrebbe avere per il paziente questo nuovo approccio all'infezione da P. aeruginosa, la Cystic Fibrosis Foundation ha in programma di lanciare negli Stati Uniti nella seconda metà del 2004 un progetto di studio su larga scala per valutare l'efficacia di un tale trattamento.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Littlewood JM, Miller MG, Ghoneim AT, Ramsed CH. Nebulised colomycin for early Pseudomonas colonisation in cystic fibrosis. Lancet 1985;1: 865.
- 2. Steinkamp G, Tummler B, Malottke R, Von der Hardt H. Treatment of Pseudomonas aeruginosa colonisation in cystic fibrosis. Arch Dis Child 1989; 64: 1022-1028.

- 3. Valerius NH, Koch C, Høiby N. Prevention of chronic Pseudomonas aeruginosa colonization by early treatment. Lancet 1991; 338: 725-26.
- 4. Frederiksen B, Koch C, Høiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with Pseudomonas aeruginosa postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 1997; 23: 330-335.
- 5. Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurkdjian P, et al. Genotypic characterization of Pseudomonas aeruginosa strains recove red from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. Pediatr Pulmonol 2001; 32: 288-292.
- 6. Ratjen F, Döring G, Nikolaizik WH. Effect of inhaled tobramycin on early Pseudomonas aeruginosa colonisation in patients with cystic fibrosis. Lancet 2001; 358 983-4
- 7. Taccetti G, Repetto T, Procopio E, Farina S. Campana S. Early Pseudomonas aeruginosa colonization in cystic fibrosis patients. Lancet 2002; 359: 625-6.

Giovanni Taccetti Centro Regionale Toscano Fibrosi Cistica Ospedale A. Meyer, Firenze

Il Convention Center di Anaheim, sede del 17° Congresso nordamericano CF



Anaheim 16 - 19 ottobre 2003





naheim è una città satellite della grande Los Angeles in California, è la città di Disneyland, un immenso parco divertimenti che ospita a latere Convention anche un grande Center, la sede di questo 17° congresso nordamericano sulla fibrosi cistica.

Organizzato dalla forte Cystic Fibrosis Foundation americana, è questa la più importante occasione internazionale di incontro e scambio tra ricercatori, clinici ed operatori sanitari e sociali che si occupano della malattia e dei malati, provenienti da tutti i continenti (una guarantina dall'Italia). 2800 persone hanno popolato per 3 giorni la sede del congresso, distribuite nelle varie sessioni parallele (fino a 10 sessioni contemporanee) in sale enormi che, nonostante la folta partecipazione, apparivano spesso semivuote.

Come sempre, in questo raduno si ha uno sfruttamento intensivo del tempo, dalle 7 del mattino all'ora tarda della sera: si utilizzano i tempi della prima e della seconda colazione per incontri di lavoro organizzati e la sera è dedicata a meeting satelliti, con l'eccezione dell'ultima sera dedicata ad una sfrenata e danzante "funzione sociale", e le pause tra i vari incontri sono fitte di contatti personali, di discussione e commento alle informazioni del congresso e di ricerca di collaborazioni. Per dare un'idea della mole di iniziative attuate nel congresso, basterà citare alcuni numeri: 7 corsi precongressuali di primo mattino su tematiche emergenti, 11 meetings per categorie professionali (biologi molecolari, genetisti, medici curanti, medici dei centri CF, direttori dei centri, infermieri, fisioterapisti, tecnici respiratori, psicologi, assistenti sociali, farmacisti, dietisti e nutrizionisti), 90 piccole tavole rotonde all'alba su temi molto specifici, 20 simposi (con 6-8 relazioni ciascuno), 31 workshops (con 10 comunicazioni ciascuno), 8 colazioni di lavoro, 2 meetings serali di discussione di casi clinici presentati da giovani medici in formazione, 3 sessioni plenarie, 452 posters.

I risultati di ricerche dell'ultima annata hanno spaziato tra le numerose discipline che contribuiscono a sviluppare nuove conoscenze ed a sperimentare nuovi approcci di diagnosi, cura e assistenza. Oltre il 50% dei contributi hanno interessato la ricerca di base e la genetica. In questo ambito sono stati prodotti nuovi dati sulla funzione della

Paul Quinton, biologo molecolare dell'Università di California in San Diego, in una istantanea scattata alla recente conferenza di Anaheim, assieme a Gianni Mastella, direttore scientifico della Fondazione Ricerca CF proteina CFTR, sui meccanismi che ne favoriscono od ostacolano la maturazione in presenza di mutazioni geniche, sulla interazione tra CFTR ed altre proteine della membrana cellulare, sulla funzione di canali per il cloro alternativi a quello CFTR. Al canale CFTR si sta attribuendo sempre più rilevanza nella funzione di secrezione di bicarbonato accanto a quella del cloro (particolarmente rilevante a livello di pancreas, intestino e condotti biliari): anche in questa prospettiva emerge con ricerche pionieristiche Paul Quinton, lo scopritore dell'anomalia del cloro nelle cellule epiteliali come difetto che sta alla base della fibrosi cistica.

Ma soprattutto stanno emergendo nuove prospettive per interventi terapeutici di correzione della proteina CFTR anomala (farmaci correttori) o per terapie di potenziamento della CFTR mutata con funzione debole (farmaci potenziatori). La ricerca genetica ha dato largo spazio a indagini, peraltro ancora poco conclusive, sui cosiddetti "geni modificatori", i geni cioè che contribuiscono ad aggravare o ad attenuare gli effetti clinici del gene fondamentale mutato. Sulla terapia genica stanno emergendo e si stanno sperimentando nuovi vettori virali, in particolare vari tipi di virus "adeno-associato" (AAV) ed alcuni tipi di lentivirus ed anche un HIV modificato, ma anche altri sistemi innovativi (l'impiego di detergenti per rendere le cellule epiteliali accessibili al vettore e l'uso diretto di DNA compattato).

Una larga messe di contributi ha riguardato lo studio dei processi implicati nell'infiammazione polmonare e delle possibilità di contrastare terapeuticamente la sua azione devastante. Molti studi

sono orientati a nuove conoscenze sui batteri più comunemente in causa nell'infezione polmonare CF ed in particolare sulle modalità con cui essi si adattano all'ambiente respiratorio e vi interagiscono ma anche alle modalità con cui l'organismo ospite risponde all'aggressione batterica, aspetto cruciale e determinante nella



Francis Collins (a destra), direttore dell'Istituto di Ricerca sul Genoma Umano (NIH, Bethesda USA) e co-scopritore del gene della fibrosi cistica, assieme a Bob Beall, presidente della Cystic Fibrosis Foundation statunitense, alla prima sessione plenaria del congresso.

CF. patologia polmonare Naturalmente c'è stata vasta eco per i risultati ottenuti in tre studi clinici con l'impiego di azitromicina nell'infezione polmonare cronica da Pseudomonas aeruginosa: è ormai confermato che questo macrolide è in grado di influenzare beneficamente in gran parte dei casi l'evoluzione della malattia polmonare di fronte ad una infezione cronica da Ps. aeruginosa. Non è peraltro ancora chiarito in quale fase sia conveniente iniziare la terapia e quali effetti indesiderati si possano avere a lungo termine (essendo guesto un trattamento cronico), in particolare sullo sviluppo di eventuali resistenze batteriche, nè è stabilito quando sia conveniente interrompere la cura. Largo dibattito vi è stato sul trattamento precoce della colonizzazione da Ps. aeruginosa: su questo problema, che dispone sinora solo di piccoli studi clinici, si sta avviando negli USA un trial clinico su larga popolazione di pazienti per valutare se l'intervento alla prima comparsa del batterio (anche in assenza di disturbi clinici) sia in grado di ritardare l'infezione cronica e soprattutto di modificare il decorso generale della malattia nel lungo termine.

Abbiamo avuto una entusiastica e stimolante lezione sulle prospettive derivate dalle conoscenze sul genoma umano da parte di Francis Collins, il co-scopritore con Lap-Chi Tsui del gene CFTR nel 1989 ed ora direttore del prestigioso National Human Genome Research Institute presso l'NIH di Bethesda.

Egli ha prospettato tre linee di interesse per la fibrosi cistica: la geno-

mica comparata, disciplina rivolta a trovare identità genomiche tra specie animali diverse, con il prezioso intento di poter selezionare animali utili per sperimentazioni precliniche in condizioni molto simili a quelle del soggetto umano; lo studio dei geni modificatori, reso più agevole dalla conoscenza su larga scala genomica dei cosiddetti "polimorfismi di singoli nucleotidi"; la genomica chimica o farmacogenomica, una nuova via per la scoperta di nuove terapie per la CF, mirate ad incidere più direttamente sul percorso anomalo indotto da mutazioni geniche. Insomma, nella visione di Collins, uno scenario molto attraente per il futuro, basato sulle nuovissime tecnologie genetiche. All'americana, ma con una innegabile carica emotiva, Francis Collins ha concluso il suo dire cantando una canzone da lui stesso composta, accompagnandosi sulla chitarra e con la partecipazione di tutta la sala: dare to dream (osiamo sognare....).

DARE TO DREAM

Dare to dream, dare to dream
All our brothers and sisters
breathing free
Unafraid, our hopes unswayed
Till the story of CF is history

Francis Collins, accompagnandosi sulla chitarra, canta la canzone da lui composta "DARE TO DREAM": Osate sognare - tutti i nostri fratelii e le nostre sorelle con il respiro libero - senza paura, senza vincoli le nostre speranze - fintanto che la storia della fibrosi cistica non apparterrà che alla storia

Per entrare nel merito di alcuni aspetti più specifici emersi dal Congresso, abbiamo chiesto a quattro medici italiani, che curano pazienti CF presso i nostri Centri e ad una biologa molecolare che fa ricerca presso un laboratorio dedicato alla CF, partecipanti al Congresso, di rispondere al quesito:

"QUALI SONO LE TRE NOVITÀ (O QUASI) CHE RIPORTERESTI AI PAZIENTI DEL TUO CENTRO DAL CONGRESSO DI ANAHEIM?"

Hanno risposto:

Dr.ssa Bianca Grosso

(Centro Fibrosi Cistica per Adulti Clinica Mal. Respiratorie, Osp. S. Luigi, Orbassano Torino)

E' emerso chiaramente un continuo progresso negli studi sulle terapie "eziologiche" della fibrosi cistica (terapia genica, correzione del difetto della proteina ecc.) che tiene viva la speranza in una terapia risolutiva, che certamente verrà messa a punto in tempi non lontani. Sembra oggi opportuno segnalare alcuni aspetti che possono contribuire da subito a preservare al meglio la funzione polmonare, in modo da poter trarre il massimo giovamento dalle nuove terapie che si renderanno disponibili.

 Azitromicina (relazione di L. Saiman sui risultati del "Macrolide Study Group").

Sono stati sostanzialmente confermati i risultati promettenti dei precedenti studi sull'uso dei macrolidi (azitromicina) nella FC. Lo studio presentato ha arruolato 185 pazienti, 87 trattati con azitromicina (AZT) (250 mg 3 volte la settimana se peso < a 40 Kg, 500 mg se peso > 40 Kg), 98 trattati con placebo. I pazienti trattati con AZT per 6 mesi hanno mostrato un incremento del FEV1 in media di 97 ml rispetto al basale, contro un incremento medio di 3 ml nel gruppo placebo; inoltre hanno avuto una minore incidenza di riacutizzazioni ed un maggiore incremento ponderale. La relazione ha peraltro sottolineato la disomogeneità di risposta tra i diversi pazienti.

L'analisi dei sottogruppi ha evidenziato una maggiore risposta alla terapia nei pazienti omozigoti DF508 rispetto agli eterozigoti per DF508 con altra mutazione e nei pazienti che non assumevano TOBI.

Quest'ultima differenza può essere spiegata sia da un possibile effetto antinfettivo dell'AZT in pazienti che non assumevano antibiotico sia dalla considerazione che la terapia con TOBI è prescritta in genere ai pazienti più compromessi. Peraltro non è stata osservata differenza significativa di risposta tra i pazienti che all'arruolamento presentavano FEV1 < 60% e quelli con FEV1 > 60% del predetto.

- 2. Terapia delle riacutizzazioni respiratorie (relazione di A. Bush "Raccomandazioni basate sull'evidenza")
- Non c'è evidenza che la terapia antibiotica somministrata al bisogno, cioè solo in occasione delle riacutizzazioni, sia meglio della terapia antibiotica profilattica, somministrata cioè a cadenza fissa (es. ogni 3 mesi) indipendentemente dalle condizioni cliniche.
- Per pazienti selezionati, cioè con una adeguata aderenza alle cure, la terapia antibiotica a domicilio è efficace quanto la terapia effettuata in regime di ricovero ospedaliero.
- La terapia antibiotica deve essere impostata sulla base dell'antibiogramma, quando questo è disponibile. Se vi è stata risposta clinica, successivi riscontri di resistenza non impongono un cambiamento di terapia. In molti pazienti la sensibilità evidenziata all'antibiogramma non correla con la risposta clinica.
- Antibiotici che in vitro risultano singolarmente battericidi possono risultare in vitro antagonisti quando usati in combinazione di tre.
- L'uso di un solo antibiotico è sconsigliato in quanto può essere meno efficace e può indurre più facilmente resistenza.
- Non ci sono evidenze per preferire la somministrazione di aminoglicosidi una, due o tre volte al giorno.
- Durante la terapia endovenosa

l'uso di antibiotici per via aerosolica non dà benefici aggiuntivi.

3. Aztreonam aerosol (due posters, presentati da J. Burns, di studio preliminare su una nuova formulazione di aztreonam per via aerosolica).

Il farmaco (di solito usato per via venosa o intramuscolare) risulta non essere inattivato dalla nebulizzazione; a concentrazione elevata, verosimilmente raggiungibile a livello endobronchiale per via aerosolica, è risultato attivo su ceppi di Ps. aeruginosa multiresistenti e su molti ceppi di B. cepacia, S. maltophilia e A. xylosoxidans; non sembra essere inibito dalle secrezioni FC. Dunque, questo antibiotico per via aerosolica potrebbe rappresentare un'alternativa valida alla tobramicina nel trattamento cronico di infezioni da batteri multiresistenti.

Dr.ssa Vincenzina Lucidi

(Centro Fibrosi Cistica, Ospedale Bambino Gesù, Roma)

1. Glutatione: nuova terapia possibile?

Tra le nuove terapie in corso di studio appare innovativo l'uso possibile del glutatione e di altri antiossidanti (sostanze che neutralizzano i radicali tossici dell'ossigeno che si producono abbondanti nei processi infiammatori). Diversi gruppi lavorano su questo, pur non trattandosi di una terapia in grado di modulare il gene, lasciando capire che non viene esclusa nessuna ipotesi nella ricerca di terapie specifiche per la FC. Sappiamo che il glutatione è un tripeptide, essenziale per la vita e ubiquitario. Presenta almeno 5 funzioni che proteggono il polmone dei soggetti sani: è uno dei principali antiossidanti presente nel corpo umano; è un mucolitico naturale; contribuisce alla lisi batterica dentro i neutrofili; protegge le proteine dallo stress ossidativo; interviene come modulatore della funzione immunitaria

Lo studio clinico multicentrico a doppio cieco, randomizzato e controllato, condotto da Bishop nello Utah, ha avuto dei risultati sorprendentemente positivi. Poiché studi precedenti avevano dimostrato un basso livello del glutatione

nel polmone dei pazienti con FC, gli Autori hanno somministrato a 10 pazienti 66 mg/kg di glutatione ogni giorno per via aerosolica per 8 settimane. I risultati hanno mostrato un miglioramento significativo dei parametri considerati (prove di funzionalità respiratoria, sintomi respiratori, n° delle riacutizzazioni infettive polmonari, ecc), nei pazienti trattati con il farmaco, rispetto a quelli trattati con placebo, tantoché alcuni pazienti hanno continuato la somministrazione del farmaco in un successivo studio aperto. Anche la somministrazione di glutatione per via orale nei bambini con CF e scarsa crescita ha favorito un immediato miglioramento dell'appetito, della crescita staturo-ponderale, senza alcun effetto collaterale. Naturalmente sono necessari ulteriori ricerche per determinare il giusto dosaggio, verificare la sicurezza e l'efficacia del glutatione, prima che possa essere raccomandato su larga scala ai pazienti con CF. Solo dopo l'approvazione della FDA e la comprovata disponibilità di glutatione puro si potranno fare studi clinici su un più largo numero di pazienti. Anche in Europa esistono gruppi di ricercatori già pronti per effettuare trials su larga scala con questo antiossidante.

2. Il test del sudore può sbagliare?

Un semplice ma chiaro studio prospettico del gruppo di Toronto, presentato come poster, riporta i risultati della rivalutazione dei livelli diagnostici del test del sudore. Oggi definiamo patologici valori di Cl > 60 mmol/l. Lo studio della sensibilità (capacità di identificare il malato) e specificità (capacità di riconoscere chi non è malato) di tre diversi livelli del test (Cl>60, >50, >40 mmol/l) ha dimostrato: per i pazienti CF con insufficienza pancreatica questo tradizionale limite ha una sensibilità e specificità superiore al 99%, in quelli invece con sufficienza pancreatica la sensibilità si abbassa addirittura al 64.65%. Se si usa un livello di cutoff per il Cl>50 mmol/l per i pz con sufficienza pancreatica, tale sensibilità sale al 77,51%. Questi risultati dimostrano che gli attuali limiti definiti patologici non permettono la diagnosi di una percentuale considerevole di pazienti con pancreas

funzionante; pertanto è fondamentale ridefinire i valori di riferimento per questo test che ancora oggi rimane il gold standard per la diagnosi di fibrosi cistica. I risultati di questo semplice studio ci confermano ciò che spesso ormai nell'esperienza clinica viviamo, a volte anche con difficoltà di decisione non sempre superabili.

3. Non solo il canale del cloro ma anche quello del sodio.

Già da qualche anno il gruppo di Boucher R.C.(Chapel Hill) aveva evidenziato nei pazienti CF un ruolo importante dei canali del sodio nella patogenesi della malattia. In una sessione su questo argomento sono stati riferiti i progressi oggi raggiunti sul loro ruolo fisiopatologico. I canali epiteliali del sodio (EnaC) sembrano avere un ruolo importante nel controllo della composizione ionica del liquido extracellulare sia nel rene che nelle vie respiratorie. Si suppone che l'EnaC sia una proteina eterotetramerica (le subunità che la compongono sono 2 Alfa, 1 Beta, 1 Gamma). Ouando la subunità alfa viene inattivata, il topo neonato muore precocemente per un danno della clearance polmonare (capacità dei bronchi di rimuovere le secrezioni) e per l'incapacità di riassorbire il liquido polmonare attraverso gli spazi alveolari. In caso di inattivazione della sub-unità gamma invece. l'animale muore per una grave sindrome da perdita di sali ed iperkaliemia (eccesso di potassio): una alterazione simile si osserva anche con l'inattivazione della subunità beta.

Un altro ricercatore, Mall M., lavorando su modelli di topi transgenici, in cui le tre sub-unità (Alfa, Beta, Gamma) sono sovraespresse a livello dell'epitelio polmonare, ha dimostrato che nei topi transgenici con alterato canale del sodio (BetaENaC) l'altezza dello strato di liquido periciliare (cioè intorno alle cilia dell'epitelio bronchiale) e la clearance mucociliare sono significativamente ridotti rispetto ai topi normali, e con una significativa mortalità post natale rispetto a questi ultimi. In tali topi BetaENaC si ha un significativo accumulo di muco, facendo ipotizzare una morte da asfissia determinata dai grossi depositi intrabronchiali di muco. Tutte queste caratteristiche ricordano gli aspetti patogenetici del danno polmonare nei malati CF. Questo modello animale sicuramente potrà contribuire a meglio comprendere la patogenesi di questa malattia e a stimolare nuovi modelli terapeutici.

Dr.ssa Diana Costantini

(Centro Fibrosi Cistica, Clinica Pediatrica "De Marchi", Milano)

1. Azitromicina, ancora.

Lisa Saiman (Columbia University, New York) ha concluso uno studio clinico controllato, cui hanno partecipato numerosi centri CF americani, che dimostra come la somministrazione di azitromicina a pazienti con infezione polmonare cronica da Pseudomonas aeruginosa serva a mantenere mediamente stabile la funzione respiratoria ed inoltre riduca la freguenza delle riacutizzazioni respiratorie, e quindi la necessità di antibiotici per via venosa, e di ospedalizzazione. Rimangono due punti da chiarire, dato che la risposta clinica è molto variabile da caso a caso. Da un lato non si sa quale sia il paziente che se ne gioverà di più: è stata evidenziata infatti una correlazione positiva dell'efficacia terapeutica con i soggetti con genotipo CFTR classico (cioè, in linea di massima ne trarrebbero più beneficio i pazienti con determinate caratteristiche genetiche rispetto ad altri con diversa combinazione di mutazioni CF), ma anche con i pazienti che non utilizzano tobramicina per aerosol. D'altro canto non si sa quale durata debba avere la terapia: pare infatti che dopo un mese dalla sospensione dell'azitromicina i vantaggi osservati in corso di trattamento si riducano sensibilmente.

2. Immunoglobuline IgY per prevenire la colonizzazione da Pseudomonas aeruginosa.

Hans Kollberg (Università di Uppsala, Svezia) apre nuove prospettive per la prevenzione delle infezioni polmonari attraverso l'uso di immunoglobuline Y ricavate dal tuorlo d'uovo di galline immunizzate con antigeni batterici (nello specifico la Pseudomonas aeruginosa). Lo studio, condotto per 8 anni, prevedeva la somministrazione di IgY tramite gargarismo: tale trattamento ha diminuito il numero di colonizzazioni da Pseudomonas aeruginosa e quindi ridotto l'uso di antibiotici, senza mostrare fenomeni di allergia o tossicità (sono stati peraltro esclusi dallo studio i pazienti con allergia all'uovo).

3. Enzimi pancreatici di origine batterica.

In tema di malassorbimento insufficienza pancreatica, abbiamo ascoltato i risultati di uno studio multicentrico americano coordinato da Drucy Borowitz (Ospedale dei Bambini di Buffalo) sull'efficacia e sulla tollerabilità di una nuova preparazione di enzimi pancreatici di derivazione batterica, denominata THERACLEC. Il preparato, a differenza dei tradizionali enzimi estratti da pancreas suino, dimostra una elevata stabilità e resistenza alla degradazione acida dello stomaco. Il farmaco è stato ben tollerato da pazienti, fino alla dose di 5000 Unità Lipasi per chilogrammo, portando ad un assorbimento di grassi del 70%. Questa può essere una efficace innovazione nel trattamento dell'insufficienza pancreatica CF.

Dr. Angelo Miano

(Centro Fibrosi Cistica Ospedale "Bufalini" - Cesena)

1. Necessità di Sviluppo di Nuovi Farmaci

La malattia FC non è ancora stata vinta anche se i progressi degli ultimi anni ne hanno notevolmente migliorato la speranza e la qualità di vita..

Lo sviluppo di farmaci innovativi atti a correggere i difetti genetici e biochimici della malattia diventa obiettivo primario e degno del massimo sforzo in ambito di ricerca e finanziamenti.

Il cammino della malattia avviene con alterazioni che intervengono a diversi livelli, scanditi secondo questa filiera: Gene - CFTR - alterazioelettrolitica - alterazione ambiente pericellulare - infiammazione - infezione - distruzione parenchimale polmonare - insufficienza respiratoria. Ad ogni passo di questo cammino diventa possibile ricercare un intervento terapeutico (con nuovi farmaci) che potrebbe, se non cambiare del tutto, almeno rallentare il destino evolutivo della malattia. Si sa che la messa a punto e la produzione di un farmaco necessita di molto tempo e di ingenti investimenti: dalla individuazione della molecola ai trial clinici, alla approvazione da parte delle autorità competenti ed alla messa in commercio presso le farmacie occorre un lasso di tempo che dura in media circa 8-10 anni. Dunque si deve pensare che ogni nuovo farmaco che giunge alla commercializzazione è stato pensato almeno 10 anni prima. Inoltre solo 1 ogni 10.000 composti, studiati all'inizio come ricerca di base. riesce ad essere distribuito come nuovo farmaco con un costo medio di circa 500 milioni di dollari.

La pipeline della ricerca del "nuovo farmaco" distingue una fase preclinica che interessa lo sviluppo di nuovi composti da valutare in ambito laboratoristico e su animali da esperimento e poi una fase di trial clinico sull'uomo. In questi ultimi anni sono intervenute nuove tecnologie in aiuto al più intenso sviluppo di questa prima fase; esse permettono la automazione e la robotizzazione delle procedure (genomica, proteomica, throughput) nella ricerca di numerose e diverse nuove molecole candidate. Queste nuove tecnologie che valutano velocemente migliaia di composti clinici riescono a testare molte più molecole e ad abbreviare di gran lunga i tempi di questa prima fase di ricerca.

2. Necessità di implementare la ricerca pediatrica CF

La ricerca medica ha risolto notevoli problemi relativi alla mortalità. prevenzione, miglioramento della qualità della vita di tutti noi. Tutto questo non deve fare eccezione per i bambini. E' evidente che c'è, in linea generale, carenza di ricerca clinica pediatrica in medicina. Essa rimane una priorità in ambito FC, poiché le ricerche in questo campo sono dirette a correggere il difetto di base e trattare il più precocemente possibile le manifestazioni cliniche della malattia. Infatti, iniziare le terapie prima della insorgenza delle complicazioni potrebbe comportare un migliore impatto sulla sopravvivenza e sulla qualità di vita dei pazienti.

La ricerca clinica pediatrica rimane però un difficile scoglio da superare, sia per le famiglie che per i ricercatori. Diversamente dall'adulto i bambini non hanno riconoscimento legale autonomo, conoscenza di base e maturità tali da consentire loro il diritto a decidere di partecipare a trial clinici.Ciò, da una parte, ha portato i ricercatori ad avere un atteggiamento oltremodo speciale e ad utilizzare le maggiori protezioni possibili nelle ricerche e, dall'altra, ha portato le industrie farmaceutiche a non coinvolgere pazienti in età pediatria, con il risultato che, nella stragrande maggioranza, i farmaci sperimentati ed approvati negli USA e altrove non hanno indicazioni pediatriche certe. L'NIH ha tentato di porre rimedio adottando politiche tali da portare ad un aumento dei bambini nella ricerca clinica.

- I Comitati Etici dovranno tener conto di queste indicazioni. Lo scopo comunque è quello sì di incentivare ricerche cliniche pediatriche, ma anche di garantire la massima protezione del bambino facendo perno su 3 condizioni categoriche di rapporto rischio/beneficio: a) rischio minimo, b) più del rischio minimo ma con aspettativa di beneficio diretto, c) più del rischio minimo senza aspettativa di beneficio diretto ma con aspettativa di produrre migliore conoscenza della malattia.
- 3. Necessità di implementazione del controllo di qualità nei pro-

cessi di cura

I vari registri nazionali e regionali evidenziano risultati clinici che possono essere diversi da Centro a Centro. Ciò potrebbe essere dovuto a diversità di opinioni scientifiche ma anche a diversità di capacità cliniche ed organizzative. Ouesto è difficile da valutare. Non è difficile invece valutare gli interventi o l'utilizzo di linee guida sulla base delle cosiddette "evidenze", dato che tutto questo può essere sicuramente misurato così come lo sono i risultati conseguenti. Non è possibile fare miglioramenti senza porre mano alle misure.

Ciò pone il problema della verifica dei processi riguardo alle cure dei pazienti. Sono stati illustrati alcuni esempi di esperienze attuate presso alcuni Centri CF americani: dapprima sono stati identificati gli obiettivi da migliorare e poi, a seguito dell'applicazione di semplici raccomandazioni, sono stati verii risultati conseguiti. L'obiettivo dell'esperienza riportata era l'identificazione precoce di tutti i pazienti con CFRD (diabete) e di tutti i pazienti a rischio di malnutrizione. L'individuazione precoce di gueste complicanze permette infatti un precoce intervento che contribuisce a migliorare la condizione clinica dei pazienti. Il metodo utilizzava una semplice "paperbased reminder form" (promemoria) da compilare ad ogni visita... risultati sono stati sorprendenti.

Dr.ssa Elena Nicolis

(Lab. Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Verona)

1. Geni di Pseudomonas e nuove possibilità di cura dell'infezione polmonare.

Nel 2000 è stata resa nota la sequenza dell'intero **genoma di** *Pseudomonas aeruginosa*, il patogeno più comunemente isolato e principale causa di infezione polmonare nei pazienti con FC. Ciò ha reso possibile iniziare uno studio preciso e approfondito sui geni e proteine espresse dal batterio, in relazione ai diversi ambienti colonizzati: è in larga misura utilizzata, per lo studio genetico, la tecnica dei "cDNA microarrays", che per-

mette di analizzare e misurare (con tecniche elettroniche impiegate nella scienza informatica) l'espressione genica di migliaia di geni simultaneamente.

Questa tecnica emergente viene impiegata anche nell'analisi simultanea di moltissime proteine (proteomica), fornendo così una piattaforma per conoscere il contributo proteico dell'intera cellula, FC o normale. Proteomica e genetica dell'infezione da Pseudomonas aeruginosa consentirebbero l'individuazione di una più precisa e più efficace terapia delle infezioni croniche respiratorie.

2. Farmaci antinfiammatori.

Risultati molto interessanti provengono dagli studi per l'identificazione di nuovi farmaci antiinfiammatori. E' stata testata una serie di molecole appartenenti al gruppo dei glicosidi cardiaci su una linea cellulare FC (IB-3) che mostra una stato infiammatorio di base superiore alla corrispondente linea normale (IB-3/S9), indicato da una maggiore espressione della proteina proinfiammatoria IL-8. I risultati individuano dei farmaci che riducono la produzione di IL-8 grazie alla loro capacità di promuovere la corretta localizzazione della CFTR mutata. La ricerca di nuovi farmaci è in piena attività e le strategie utilizzate permettono di indagare su un ampio spettro di molecole, come dimostrano i numerosi risultati preliminari presentati al Congresso.

3. Terapia genica

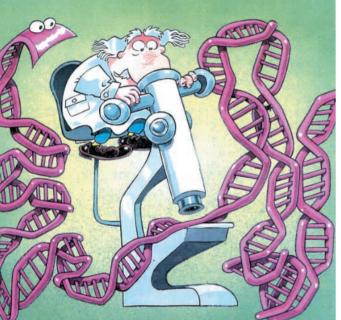
E' stato presentato un aggiornamento, in tema di terapia genica, che attualmente vede i virus adeno-associati (AAV) i più studiati. Sono stati presentati i risultati di trials clinici che dimostrerebbero la sicurezza e l'efficacia, seppur temporanea, della terapia con AAV. Parallelamente la ricerca è rivolta all'identificazione delle barriere che riducono l'efficienza di trasferimento genico e i problemi riguardanti la limitata persistenza, sinora osservata, dell'efficacia terapeutica.

Notizie dal 6° Congressonazionale della Società Italiana di Genetica umana (S.I.G.U.)

Verona, 24 - 27 settembre 2003



Per meglio comprendere lo spazio in cui si muovono la ricerca e l'assistenza della fibrosi cistica in campo genetico, abbiamo chiesto alla Dr.ssa Graziella Borgo, consulente genetica e studiosa di genetica CF, con lunga esperienza clinica in questa malattia, di riassumerci il panorama proposto da questo importante congresso di genetica umana.



Dalla brochure "Fibrosi cistica - per saperne di più" dell'Associazione OFFICIUM di Roma.

Cinquanta anni dalla scoperta del DNA

Si è tenuto a Verona nella splendida sede del palazzo della Gran Guardia il sesto Congresso Nazionale della Società Italiana di Genetica Umana, la società scientifica a cui aderiscono un larghissimo numero di medici e ricercatori da ogni parte d'Italia e che ha come presidente il Prof. PF. Pignatti. Quest'anno il Congresso assumeva una valenza particolare dato il ricorrere del cinquantenario della scoperta della struttura del DNA, la molecola-base dei processi genetici.

Importanti personalità del mondo scientifico hanno messo in luce nelle loro relazioni come tanta parte della medicina sia cambiata in un arco di tempo così breve.
Una frase come "C'è nel suo DNA"

LA GENETICA ALLA BASE DI UNA NUOVA MEDICINA

è entrata nel linguaggio comune: la usano i giornalisti sportivi per spiegare come un certo calciatore sia solito offrire una particolare prodezza ai suoi tifosi; la usa il genitore per spiegare agli amici il comportamento del figlio. La "prova del DNA" tiene col fiato sospeso, fino a che non viene eseguita, gli appassionati di vicende giudiziarie a sfondo nero o rosa.

I mass-media ci fanno sapere che è possibile stabilire da quali incroci di parentela siano nati i figli del faraone Tutankamen e se appartengano proprio a

Billy The Kid, l'inafferabile cowboy, i resti presenti nella tomba.

Settemila malattie genetiche

Sotto gli aspetti di superficie, una realtà in campo scientifico e medico in continua evoluzione: di oltre 7000 malattie è stato identificato il gene responsabile. Sono per lo più malattie rare, ma ricordiamo alcune fra le più comuni: la fibrosi cistica, la neurofibromatosi, l'atrofia muscolare spinale, il ritardo mentale X-fragile, l'emofilia, l'acondroplasia, la corea di Huntington, la retinite pigmentosa, la distrofia muscolare, la microcitemia.

I test genetici

Dalla possibilità di analizzare i singoli geni (e il loro prodotto o la loro funzione) il via alla produzione dei test genetici. Abbiamo così i test genetici diagnostici, finalizzati alla conferma di una diagnosi fatta in base ai sintomi di una certa malattia. Alcuni di questi test sono utilizzati per identificare i portatori sani di un gene alterato; essi presentano un rischio aumentato, rispetto alla popolazione generale, di avere un figlio malato, qualora anche il partner sia portatore dello stesso gene (questo è per esempio il caso della fibrosi cistica, ma non solo). Ci sono anche i test genetici presintomatici, capaci di identificare nel soggetto in buona salute una mutazione genetica che inevitabilmente porterà alla comparsa di una malattia nel corso della vita. Per definizione sono presintomatici i test applicati nel corso di una gravidanza a scopo di diagnosi prenatale: essi hanno diffusione crescente (vedi più avanti). Ma ci sono anche test che servono a diagnosticare, all'interno di famiglie a rischio, gli adulti portatori di geni associati a malattie che esordiranno solo in età

E ci sono i <u>test predittivi di suscettibilità genetica</u>, vale a dire capaci di individuare se, in seguito all'esposizione di certi fattori ambientali o in combinazione con altri fattori genetici scatenanti, abbiamo un rischio più grande di altri di sviluppare una determinata malattia (ad esempio alcuni tipi di tumore o l'ipertensione e le malattie cardiovascolari).

La farmacogenetica

Sul versante della terapia i farma-

cologi, tenendo conto delle nuove conoscenze, allestiscono il campo della farmacogenetica, all'insegna dell'obbiettivo: "a ciascuno il suo farmaco", in base all'assetto genico individuale.

Rischi della genetica

Il rischio diffuso ad ogni livello è quello di un vago sentimento di onnipotenza. Ma in questo campo sapere non è potere: la strada della terapia genica è ancora tutta da percorrere. Sapere non è detto che renda più semplice la vita. Renderà sicuramente più complesse le scelte che ogni individuo è chiamato a fare all'interno della sua vita, all' interno della famiglia e della società. Dobbiamo essere preparati ad affrontare questa complessità: le nuove conoscenze devono diventare bagaglio culturale comune.Per questo il Congresso si è aperto, con una originale e apprezzata iniziativa, al mondo della scuola, con un programma particolare rivolto a studenti e insegnanti. Le nuove conoscenze non devono infondere né attese esagerate né timori infondati: noi solo in parte siamo e saremo ciò che i nostri geni stabiliscono, perché, come ha detto il Prof. Andreoli, per nostra fortuna il nostro cervello è plastico, duttile e capace di evolversi in maniera gene-indipendente.

LABORATORI E SERVIZI DI GENETICA IN ITALIA

369 strutture dedicate alla genetica

La S.I.G.U.ha organizzato il censimento delle strutture di genetica medica operanti in Italia nell'anno 2002 :da questo è risultato che in Italia esistono 160 laboratori di citogenetica,143 laboratori di genetica molecolare e 66 strutture di genetica clinica. Rispetto al precedente censimento dell'anno 2000, il numero dei laboratori è aumentato di circa il 9% . Circa il 10% dei laboratori sono privati, il resto pubblici. Vi è una significativa disomogeneità nella distribuzione dei centri e del numero delle prestazioni sul territorio nazionale, con gradiente decrescente dal nord al sud Italia.

Il numero delle patologie genetiche analizzate è risultato 314; 409 i geni-malattia diagnosticabili con metodi laboratoristici standardizzati. Il basso numero di strutture di genetica clinica rispetto ai laboratori rende conto del fatto che le consulenze genetiche erogate sono state circa 50.000 rispetto a circa 150.000 diagnosi di genetica molecolare eseguite (11.500 in ambito prenatale, di cui ben 5000 sono test per fibrosi cistica, 138,000 in ambito postnatale). Questo vuol dire che i test genetici vengono utilizzati senza che, nella maggior parte dei casi, vi sia una adeguato intervento del genetista per stabilire se sono indicati e se le persone che vi si sottopongono sono informate del loro significato e implicazioni (la consulenza genetica: questa sconosciuta!).

Ciò che manca

Manca sia su scala regionale che nazionale un piano di coordinamento e collegamento delle strutture e delle loro attività (è sbagliato che dappertutto si faccia un po' di tutto, ideale sarebbe una distribuzione territoriale delle competenze); mancano procedure condivise nella erogazione dei test (come e quali test per quali problemi).

LE RICERCHE NEL CAMPO DELLA FIBROSI CISTICA

I geni modificatori

I contributi nel campo specifico della fibrosi cistica indicavano la prosecuzione delle ricerche nell'area dei geni modificatori del fenotipo della malattia: si cercano i geni correlati all'epatopatia FC, quelli correlati al fenotipo polmonare .Si stanno studiando mutazioni CFTR particolari correlate a livelli incerti di test del sudore.

L'infertilità delle coppie

Numerosi contributi scientifici riguardavano i test da eseguire per diagnosticare la causa dell'infertilità nelle coppie (questo problema è presente in una coppia italiana su cinque): tra questi appare ormai largamente diffusa la ricerca delle mutazioni del gene CFTR nel partner maschile. I risultati di queste ricerche da un lato confermano l'esistenza, in maschi adulti in buone condizioni di salute, di forme di malattia FC, rare ma non rarissime, che rimangono non diagnosticate

appunto perché caratterizzate dalla difficoltà ad avere figli come unico sintomo; dall'altro rappresentano una sorta di screening dello stato di portatore del gene CFTR applicato ad una particolare categoria della popolazione.

Mutazioni CF negli immigrati

A livello di studi di popolazione interessante il fatto che popolazioni diverse da quella italiana, come ad esempio quella africana, oggi presente in misura sempre più consistente nel nostro paese, vengono indagate per stabilire frequenza e tipo delle mutazioni del gene CFTR (Verona -Roma). Vengono identificate mutazioni particolari, utili per diagnosticare la malattia FC o i portatori sani presenti anche in questa popolazione. E' definitivamente smentita la vecchia nozione secondo cui questo gene sarebbe caratteristico solo delle popolazioni di origine caucasica ("di pelle bianca").

I TEST PER UN FIGLIO SANO

Centomila test prenatali

Per avere informazioni sul buon esito della gravidanza e realizzare il desiderio di un figlio sano le coppie italiane fanno largo uso dei test prenatali: ne vengono eseguiti più di 100.000 all'anno (dati censimento SIGU). In pratica un neonato su cinque è sottoposto ad una indagine prenatale. Questo fatto è in parte correlato anche all'età in cui la donna affronta la gravidanza: si verifica oggi che circa il 25% delle donne italiane ha un figlio dopo i 35 anni. Questa età è indicata da molti studi ed è stata assunta dal Servizio Sanitario Nazionale come soglia indicante un aumento dell'incidenza di anomalie cromosomiche nel nascituro (la più diffusa è la Trisomia 21 o Sindrome di Down). Di qui il grande interesse della medicina per individuare test prenatali per questo tipo di malattie che siano accurati, eseguibili in tempi precoci di gravidanza, capaci di dare risposte in tempi brevi: la messa a punto di nuove metodiche di laboratorio (QF-PCR) soddisfa queste esigenze.

Ecografia fetale

Inoltre l'ecografia, indagine di

Notizie dal 6° Congressonazionale della Società Italiana di Genetica umana (S.I.G.U.)

carattere non invasivo, assume il ruolo di strumento diagnostico di fondamentale importanza data la scoperta di un nuovo marker ecografico fetale: l'assenza o l'ipoplasia dell'osso nasale (riscontrabile tra l'11° e la 14 a settimana di gravidanza) risulta capace di diagnosticare la presenza di anomalie cromosomiche nel 90-95% dei casi.

CHE COSA C'E' DIETRO L'ANGOLO

Diagnosi genetica pre-impianto

Dietro l'angolo c'è la possibilità di diagnosticare le malattie genetiche, siano esse dovute ad alterazioni del patrimonio cromosomico che alla presenza di singoli geni mutati, nel pre-embrione, ottenuto con la fecondazione in vitro(IVF), dopo soli tre giorni dall'inseminazione, analizzando due cellule prelevate dallo stadio pre-embrionario di 6-10 cellule. Questa tecnica estremamente complessa (chiamata diagnosi genetica preimpianto), indicata per coppie con difficoltà ripro-

duttive e rischio elevato di figli con malattia genetica, presenta rischi, limiti e modeste possibilità di successo (20% per ogni tentativo). Ma permette di evitare l'aborto, possibile dolorosa scelta della coppia che ha avviato una gravidanza e viene a conoscere che il feto è affetto da una malattia genetica. Un numero allarmante di centri privati e uno molto più ristretto di centri pubblici inizia a realizzare questa tecnica anche in Italia, mentre in Parlamento la legge in tema di fecondazione assistita non è ancora stata varata e il dibattito sui problemi etici ad essa connessi è particolarmente acceso.

Terapia cellulare: cellule staminali

Un altro tema, che si profila ricco di prospettive ancora tutte da esplorare, è quello dell'uso delle cellule staminali. La presenza di cellule multipotenti capaci di proliferare e differenziarsi in risposta a stimoli diversi è stata descritta, oltre che a livello embrionario, in varie aree del nostro organismo, ad esempio

nel cervello, nel muscolo, nel tessuto dei vasi per la circolazione del sangue.

Queste cellule potrebbero essere usate per la costruzione in vitro di tessuti ed organi destinati al trapianto o per la realizzazione di una terapia "cellulare" dei distretti del corpo interessati dalle malattie genetiche o per il trasporto del gene normale capace di correggere quello mutato.

Gli esperimenti in corso riguardano per ora soprattutto l'ottimizzazione dei processi di purificazione e manipolazione di queste cellule. Per alcune malattie genetiche (distrofia muscolare, osteogenesi imperfetta) lo stato della ricerca è più avanzato ed è arrivato alla sperimentazione su modello animale: i primi risultati sembrerebbero incoraggianti.

Graziella Borgo Consulente Genetica Già Dirigente Medico del Centro Regionale Veneto Fibrosi Cistica

Convegno del

Gruppo **Itali**ano CF

"Strumenti
e pratiche
per migliorare
le cure nella
fibrosi cistica
e nelle malattie
respiratorie
croniche"

Verona, Centro Marani, 13 Novembre 2003

l Convegno veronese ha risposto alle attese di un incontro multiprofessionale su alcuni temi "caldi", maturati all'interno del Gruppo Italiano Fibrosi Cistica (GIFC). La formula di un setting comune per i diversi operatori sanitari, che operano nei Centri FC, funziona se i temi dell'organizzazione e dello sviluppo dei

Centri sono posti al centro dell'attenzione.

Un tema centrale dell'incontro è stato quello della valutazione della qualità di vita (QDV). Essa include aspetti fisici (percezione della salute e della disabilità, sintomi, dolore) ed aspetti mentali (vitalità, emotività, inserimento

sociale, realizzazione individuale). Valutare le modificazioni nella ODV è di estrema rilevanza nel bilancio costi-benefici di ogni nuova terapia o di nuove proposte diagnostiche e/o organizzative. Ciò nonostante la valutazione della QDV è entrata molto poco nella nostra prassi e nella ricerca. a sottolineare che è tutt'altro che uno strumento valutativo scontato. Rita Nobili (Centro FC. Milano) ha presentato un progetto di ricerca multicentrica, che ha lo scopo di tradurre e validare il CF Questionnaire, già utilizzato negli USA Tale progetto dovrebbe essere formalizzato e proposto ai Centri tra breve. Il questionario ha il duplice vantaggio di essere malattia-specifico e somministrabile a partire dai 6 anni di età. La ricerca ha gli obiettivi di tradurre, validare linguisticamente e culturalmente il questionario nord-americano, di eseguire su un campione ampio di pazienti (circa 150) la sua validazione psicometrica (affidabilità, discriminazione, sensibilità) e di proporre un suo uso estensivo ai Centri per fare una prima "fotografia" della situazione italiana. È stata così lanciata la sfida di poter avere a disposizione uno strumento per "tentare una semplificazione di un concetto complesso senza diventare semplicistici". Nel caso dell'asma l'applicazione dei questionari sulla QDV ha portato sul tappeto una questione cruciale: gli operatori sanitari hanno una visione della malattia molto centrata sui sintomi e gli effetti dei farmaci, che non traducono adeguatamente il vissuto di "limitazione" in diversi aspetti della vita dei pazienti e dei loro genitori. Ciò risulta dall'uso di uno degli strumenti più utilizzati nell'asma, il Paediatric Asthma Quality of Life Questionnaire, che Luciana Indinnimeo (Clinica Pediatrica, Università "La Sapienza", Roma) ci ha mostrato in diverse sue applicazioni.

Il controllo delle infezioni nei Centri FC ha rappresentato il secondo tema fondamentale del convegno, al quale hanno contribuito gli infermieri con due iniziative: una inchiesta sulla situazione attuale dei Centri e la traduzione delle linee-guida nordamericane, messa a disposizione per gli operatori sanitari dei Centri come spunto di riflessione su un tema tanto rilevante. "Luci ed ombre" di queste linee-guida sono state messe in evidenza da Filippo Festini (Centro FC, Firenze), così come la discreta eterogeneità nelle pratiche di prevenzione e controllo delle infezioni seguite nei diversi Centri. L'interesse mostrato su questo tema potrebbe concretizzarsi in un gruppo di lavoro multiprofessionale, che potrebbe fare una revisione di queste ed altre linee-guida, come punto di partenza per una proposta operativa italiana. Luciana Ballini (Centro Valutazione Efficacia Assistenza Sanitaria, Modena) ha coordinato diverse esperienze di implementazione di linee-guida. Ci ha indicato un possibile percorso: a) scegliere "raccomandazioni" valide e rilevanti (ne abbiamo a disposizione?); b) identificare "le barriere" (organizzative, strutturali, cliniche, cognitive, attitudinali, motivazionali) e rimuoverle con interventi coerenti; c) predisporre ed effettuare una analisi dei risultati della strategia di implementazione.

Abbiamo colto dagli interventi di Donatella Fogazza (Centro FC, Palermo) quanto vi sia ancora da "inventare" e fare per una appropriata assistenza domiciliare ai pazienti. I dati, raccolti con questionari rivolti ai Centri, indicano che una assistenza a domicilio integrata e gestita dalle strutture territoriali ha riguardato circa 200 pazienti, mentre il "self-care" per il trattamento antibiotico ha interessato una quota decisamente maggiore. Servono probabilmente progetti specifici dei Centri non solo su problematiche individuali ma su problemi generali, identificati a partire dalle priorità (es. malattia severa). Interessante è stata l'esperienza di "proiezione domiciliare" di una equipe specialistica (Cure Intensive Pediatriche), che ha organizzato e fatto una dell'assistenza super-visione domiciliare multiprofessionale per malati cronici complessi. Sergio Bella (Centro FC, Ospedale Bambino Gesù, Roma) ha fatto una sua proposta: i pazienti possono eseguire a domicilio controlli periodici della spirometria e dell'ossimetria prolungata ed inviare attraverso modem questi dati (telemedicina) al Centro. La sua esperienza dimostra che ciò è fattibile ed incontra il gradimento dei pazienti, poiché si sentono "seguiti" e si evitano controlli clinici al Centro. La telemedicina rappresenta senz'altro una prospettiva futura, le cui modalità vanno modulate considerando gli obiettivi e la tipologia dei pazienti.

Donatello Salvatore (Centro FC, Potenza) ha affrontato un altro strumento di lavoro, la cartella clinica informatizzata ("Camilla"), rilevandone possibilità e limiti. Essa comunque offre l'opportunità di raccogliere dati clinici da parte degli operatori dei Centri in maniera standardizzata e concordata sia ai fini di migliorare l'assistenza ai pazienti sia ai fini di mettere in comune informazioni per il Registro Italiano CF e per ricerche epidemiologiche su base nazionale.

Un ringraziamento alla Lega Italiana Fibrosi Cistica e alla Dompè, che hanno contribuito alla riuscita di questo incontro.

Cesare Braggion Direttivo e Commissione Ricerca Clinica del GIFC

Nutrizioneartificiale in fibrosi cistica

Un convegno a Trieste (15 Novembre 2003)

l 15 novembre si è tenuto a Trieste un convegno sul tema "Nutrizione artificiale e Fibrosi Cistica" che ha visto la partecipazione, tra gli altri, del prof. Notarangelo (immunologo) e del prof. Turk (gastroenterologo. Il tema è stato affrontato da diversi punti di vista (medico, infermiere, psicologo).

È emersa una stretta relazione tra malnutrizione e infezioni (calo delle difese immunitarie da deficit di micronutrienti e vitamine. Nel paziente con fibrosi cistica c'è un maggior consumo energetico e un aumento della spesa di energie e riposo, che fanno pendere l'ago della bilancia verso le perdite, non sempre compensate da un aumento degli introiti. Questo richiede un intervento nutrizionale ad ampio raggio che preveda adeguati consigli dietetici, il controllo dell'infiammazione e delle infezioni, la somministrazione adeguata di estratto pancreatico, il controllo delle complicanze (diabete), la verifica dello stato psicologico. I dati della letteratura evidenziano una correlazione tra stato nutrizionale e funzione respiratoria (un buon peso nei primo anni di vita è predittivo di migliore funzione respiratoria a distanza).

Da una revisione sistematica dei pochi studi esistenti sulla nutrizione artificiale in FC non risultano esserci, tuttavia, prove di efficacia che l'intervento nutrizionale porti nel lungo termine a beneficio dal punto di vista respiratorio. La nutrizione enterale ha un importante impatto sulla vita del paziente, che spesso rifiuta la gastrostomia preferendo il posizionamentoquodidiano del sondino naso-gastrico. La nutrizione parentale è paradossalmente meglio accettato, ma presenta un maggiore rischio di complicanze gravi. La nutrizione artificiale viene spesso vissuta come una punizione: limita la vita sociale, porta ad alterazione dell'immagine di sè e a bassa autostima, minor assunzione di alimenti durante il giorno per calo dell'appetito. Tuttavia l'aumento di peso che ne deriva migliora il tono

dell'umore e l'attività sia sociale che lavorativa.

Furio Poli

Centro Regionale Fibrosi Cistica del Friuli VG, Trieste

Napoli 27 - 29 novembre 2003

Convegno di Pneumo logia Pediatrica

Problemi emergenti in fibrosi cistica

l Convegno "Nuove frontiere nella diagnosi e trattamento delle malattie polmonari del bambino" ha come obbiettivo principale la revisione e l'approfondimento di alcuni dei principali temi di interesse della moderna Pneumologia Pediatrica quali l'asma allergico, le infezioni respiratorie e la fibrosi cistica. Scopo del convegno e' quello di diffondere, attraverso la conoscenza delle piu' recenti acquisizioni in tema di genetica, patogenesi, diagnosi e terapia, la cultura in pneumologia pediatrica e in fibrosi cistica al fine di migliorare l'assistenza al pazien-

Per ciò che riguarda la fibrosi cistica particolare risalto verra' dato agli aspetti genetici della malattia oltreche' alle piu' recenti acquisizioni patogenetiche per la identificazione di nuove strategie terapeutiche antinfiammatorie. Sara' inoltre discussa l'efficacia di nuovi strumenti terapeutici, quali la ventilazione polmonare non invasiva. Una parte importante del convegno verrà dedicata alle esercitazioni pratiche sui test di funzionalità respiratoria nelle varie età del bambino e sulla interpretazione delle indagini radiologiche più comunemente utilizzate come test di imaging polmonare. Particolare attenzione è stata riservata nel convegno all'innovativo settore della ricerca sull'infiammazione delle vie aeree nel soggetto in età pediatrica affetto da asma o da Fibrosi Cistica.

> Valeria Raia Centro Regionale CF, Napoli



Convention dautunno Stato di avanzamento dei ricerca tori italiani CF Stato di avanzamento dei progetti di ricerca sostenuti dalla Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica nel 2002 e nel 2003

Verona 14 - 15 novembre 2003

on è facile oggi gestire in Italia programmi di ricerca biomedica avanzata. Non è nemmeno facile condurre programmi di ricerca clinica indipendente e ispirata a fabbisogni reali di conoscenze e di applicazioni pratiche nelle cure al paziente. Vi concorrono lo scarso investimento di risorse per la ricerca da parte dello Stato, la non rara dispersione delle

risorse private, la frequente precarietà degli operatori di ricerca, lo scollamento organizzativo e talora culturale degli istituti deputati alla ricerca, pur in presenza di non secondarie potenzialità tecnologiche e di abilità scientifiche in diverse realtà italiane.

L'ambito della fibrosi cistica rientra in pieno in questo scenario naziona-

le e può definirsi particolarmente orfano, bisognoso di essere adottato sia scientificamente che economicamente da istituzioni di ricerca capaci di offrire nuove idee e nuove competenze da finalizzare nel medio termine a cure innovative per guesta malattia.

La Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica si è cimentata in questo scenario con la consapevolezza delle difficoltà e delle incomprensioni da affrontare nonchè della limitatezza degli strumenti economici di cui oggi dispone. Ma essa ha inteso comunque lanciare un segnale ai ricercatori e alla popolazione per creare alleanze e sinergie intorno alle tematiche emergenti della fibrosi cistica. Il segnale è stato raccolto efficacemente da molti ricercatori e sta trovando un iniziale consenso e sostegno presso la popolazione, istituzioni e associazioni di volontariato. I 17 progetti di ricerca finanziati nel 2002 e nel 2003, selezionati, tra i molti proposti, attraverso una competizione monitorata da numerosi esperti indipendenti di riconosciuta competenza nello specifico dei temi proposti, rappresentano un primo tentativo di dare concretezza operativa ad una qualificata iniziativa di traino. Il futuro di questa impresa è molto legato ai

La sala convegni della Fondazione gremita di ricercatori alla Convention d'Autunno 2003.

risultati scientifici che queste prime iniziative sapranno produrre e alla capacità che avranno i gruppi di sostenitori a mantenere unità di strategia, contenendo le tentazioni particolaristiche e centrifughe, coniugata con un livello soddisfacente di qualità degli obiettivi e dei programmi.

La Convention d'Autunno ha visto riuniti il 14 novembre scorso, nella sede della Fondazione, 140 ricercatori coinvolti o interessati nella ricerca CF. Due importanti ricercatori stranieri (Prof. D. Sheppard e Prof. G. Doering) sono stati invitati a proporre un panorama della ricerca internazionale su due tematiche calde: lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche e i rapporti tra batteri e infezione polmonare. Sono stati inoltre presentati i risultati preliminari di 15 dei 17 progetti finanziati dalla Fondazione, di cui diamo di seguito brevissimi sommaL'avv.to Donato Bragantini porta ai convenuti il saluto del Consiglio di Amministrazione della Fondazione



La Convention ha avuto anche una sessione informativa interamente dedicata ai "laici" (pazienti, familiari, sostenitori della Fondazione) nella mattinata del 15 novembre: per tre ore l'aula semicircolare del Centro "Marani" era gremita

di quasi 150 persone provenienti da varie parti d'Italia. Sono stati riferiti risultati e prospettive di sviluppo di alcune ricerche più mature (batteri e infezione polmonare, terapia genica, screening di nuovi farmaci, potenzialità nuove dell'azitromicina). I partecipanti sono stati attivissimi nel porre domande, contribuendo a chiarire i passaggi più incerti e difficili delle relazioni dei ricercatori.

L'ing. Sergio
Ricciardi porta ai
partecipanti della
sessione "laica" il
saluto e la solidarietà
dell'Associazione
Veneta Fibrosi
Cistica: analogo
intervento era stato
fatto in precedenza
dal Dr Giorgio Del
Mare, Presidente
della Lega Italiana
Fibrosi Cistica.



Conve<mark>ntion d'aut</mark>unno dei ricercatori italiani CF

FISIOPATOLOGIA MOLECOLARE E NUOVE TERAPIE FARMACOLOGICHE

Moderatore: Giorgio Berton (Direttore Istituto di Patologia Generale, Università di Verona, Membro del Comitato di Consulenza Scientifica della Fondazione)

Lettura introduttiva DAVID N. SHEPPARD, Ph.D. Department of Physiology, University of Bristol, UK



Il prof. David Sheppard durante la lettura introduttiva sulle nuove terapie farmacologiche della fibrosi cistica

Sviluppo della ricerca sulla terapia farmacologica della fibrosi cistica: stato dell'arte e future direzioni di ricerca.

Con l'identificazione del gene difettoso responsabile della fibrosi cistica (CF)nel 1989, si è potuto indagare l'anomalia molecolare che causa un vasto spettro di patologie caratteristiche di questa malattia. La proteina prodotta dal gene CF, denominata "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator" (CFTR), forma un passaggio pieno d'acqua controllato da una porta (un canale), attraverso il quale il cloro (un componente del sale comune) entra ed esce dalle cellule che tappezzano i dotti e i tubi all'interno dell'organismo, tra cui quelli delle vie aeree e dell'intestino. I difetti del gene CF causano la malattia attraverso due meccanismi generali: più comunemente, i difetti genetici impediscono la corretta costruzione e la migrazione della proteina verso la sua normale collocazione cellulare, il lato delle cellule che si affaccia al lume. Tuttavia, alcuni difetti genetici rendono inefficace la funzione di CFTR senza interferire con la sua produzione e migrazione alla superficie cellulare.

La conoscenza e la comprensione di come i difetti genetici causano una perdita di funzione CFTR stanno indirizzando a nuovi approcci razionali per la terapia di pazienti CF che portano tipi diversi di difetto genetico.

Primo, David Bedwell (Università di Alabama) dimostrò che alcuni difetti genetici, che causano errori nella produzione di proteina CFTR, potevano essere corretti con farmaci aminoglicosidici quali la gentamicina. Questi farmaci facilitano la produzione di proteina CFTR normale che viene quindi veicolata alla superficie cellulare dove essa è attiva e funzionante.

Secondo, Michel Welsh (Università di Iowa) trovò che le basse temperature potevano sopprimere i difetti genetici che causano difetti nel processo di conformazione e maturazione della proteina (folding). Ouesto risultato stimolò la ricerca di farmaci che potessero imitare gli effetti della bassa temperatura e recuperare la funzione di CFTR alla superficie cellulare. entusiasmante Con succeso, Frédéric Becq (Università di Poitiers) ha recentemente identificato una famiglia di farmaci, denominati composti benzo(c)chinolinici (MPB), che non soltanto recuperano la localizzazione di CFTR alla superficie cellulare ma potenziano anche la sua funzione come canale del cloro. Tali farmaci hanno una potenzialità molto grande nello sviluppo di nuove terapie per la fibrosi cistica.

Terzo, è stata scoperta una varietà di farmaci, chiamati "openers" ossia facilitanti l'apertura del canale CFTR, che potenziano l'attività di canali CFTR mutanti a livello di superficie cellulare. L'"opener" meglio studiato è la genisteina, una

sostanza chimica che si trova in molti vegetali commestibili. Tzyh-Chang Hwang (Università del Missouri) ha dimostrato che la genisteina potenzia fortemente il flusso di cloro attraverso CFTR interferendo con i processi di chiusura del canale.

Altri approcci alla terapia farmacologia cercano di baipassare la perdita di funzione CFTR nelle cellule CF. Accanto a CFTR, altri tipi di canali del cloro si trovano nelle cellule che tappezzano le vie aeree e l'intestino. Il lavoro di ricerca portato avanti da Richard Boucher (Università di North Carolina)ha dimostrato che l'attivazione di recettori situati sul lato delle cellule delle vie aeree che guarda il lume causa un rilascio di cloro di breve durata dalle cellule respiratorie attraverso canali del cloro attivati dal calcio. Sulla base di questa osservazione, la Compagnia Inspire Pharmaceutical, Inc, ha sviluppato farmaci che inducono il rilascio di lunga durata di cloro dalle cellule respiratorie, e questo ha un significativo potenziale terapeutico. Una strategia alternativa per aggirare la perdita di funzione CFTR è quella di sviluppare sostanze chimiche con caratteristiche di trasportatori sintetici di cloro. Con l'impiego di peptici derivati da un canale del cloro scoperto nel cervello, John Tomich (Università del Kansas) ha dimostrato la praticabilità di un tale approccio.

Al fine di accelerare la scoperta di farmaci utili, alcuni gruppi stanno sfruttando nuove tecnologie quale quella dello screening su vasta scala di librerie di composti chimici . Il successo sinora ottenuto da Alan Verkman (Università di California) e Luis Galletta (Istituto "G.Gaslini" di Genova) suggerisce che noi dovremmo essere ottimisti sulla prospettiva di sviluppare terapie farmacologiche efficaci per il trattamento della fibrosi cistica.

Azitromicina: ruoli non battericidi e rilevanza per la terapia della fibrosi cistica

P. Melotti, E. Nicolis, C. Cigana, U. Pradal, V. Casotti, F. Quiri, P.Benedetti (Laboratorio di Patologia Molecolare, Centro Fibrosi Cistica, Verona); M. Negrini, M. Ferracin (Centro Ricerca sul Cancro, Università di Ferrara). Prog. # 3/2002.

Al miglioramento clinico ottenibile in alcuni soggetti sottoposti a terapia con Azitromicina (AZM) risulterebbero associati sia un aumento nel trasporto di cloro sulla mucosa nasale sia un aumento di espressione del gene multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1): è stato così ipotizzato che l'aumentata espressione di MRP1 possa compensare, almeno parzialmente, il difetto presente nella FC.

Il primo risultato ottenuto nel nostro studio consiste nel riscontro di una variabilità individuale nella struttura del DNA nella regione regolatrice (promotore) del gene MRP1 nei 27 pazienti finora studiati. Ci si propone ora di conoscere la risposta all'AZM degli stessi pazienti in termini di regolazione dell'espressione di MRP1 mRNA e di differenza dei potenziali nasali. Sarà così possibile determinare se la variabilità di tali risposte da soggetto a soggetto è associata a qualche specifica ripetizione di triplette identificata nel promotore di MRP1. Sono stati inoltre avviati studi in vitro per determinare l'effetto dell'AZM sull'espressione genica in linee cellulari derivate da epitelio bronchiale FC e non FC. A tal fine si è messa a punto la metodica per la

L'aula del Centro Marani che ha ospitato circa 150 persone nella sessione della Convention dedicata a pazienti, familiari e sostenitori.



quantificazione di MRP1 mRNA in cellule di epitelio nasale di pazienti FC. Si è rilevata così una maggior espressione di MRP1 , ma anche della molecola che favorisce l'infiammazione, interleuchina 8 (IL-8), in vitro in cellule FC rispetto a quelle non FC. Indagando poi sull'ipotesi che l'AZM abbia un effetto antinfiammatorio, si è riscontrata un'inibizione dell'espressione di IL-8 da parte di AZM in una linea cellulare FC.

Analisi su vasta scala di principi attivi approvati per uso umano per l'identificazione di nuovi farmaci per la terapia della fibrosi cistica

Luis J.V. Galietta¹, Nicoletta Pedemonte¹, Chiara Folli¹, Emanuela Caci¹, Olga Zegarra-Moran¹, Massimo Conese², Gemma Migneco², Erika Nieddu³, Mauro Mazzei³.

Prog. # 3/2003.

- (1) Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova
- (2) H.S. Raffaele, Milano
- (3) Dip. di Scienze Farmaceutiche, Università di Genova

Molte delle mutazioni che causano la fibrosi cistica (FC) alterano il trasporto di cloruro attraverso due tipi di meccanismi. Un tipo di mutazioni riduce la capacita' della proteina CFTR di trasportare ioni cloruro (difetto di "gating"). Un altro tipo di mutazioni invece impedisce alla proteina CFTR di raggiungere la membrana plasmatica (difetto di "trafficking" o di maturazione). La mutazione piu' frequente nei pazienti FC, la deltaF508, causa entrambi i difetti.

La correzione del difetto di base nella fibrosi cistica (FC) può essere teoricamente ottenuta mediante l'uso di farmaci che ristabiliscano il

> funzionamento della proteina CFTR mutata o che stimolino l'attività di canali del cloruro alternativi. Per trovare questi farmaci si possono effettuare delle analisi su vasta scala di migliaia di composti chimici di nuova sintesi. Progetti di questo tipo sono in effetti in corso in alcuni laboratori tra cui il nostro. Tuttavia,

prima che questi composti possano essere provati su pazienti nell'ambito di sperimentazioni cliniche. bisognerà determinarne su modelli animali e su cellule in vitro le proprietà farmacologiche e l'eventuale tossicità. Ciò potrebbe richiedere diversi anni, con risultati anche negativi. Un approccio complementare può essere quello di provare l'efficacia di farmaci già conosciuti e che sono stati approvati per la cura nell'uomo di altre malattie. Infatti l'identificazione di un composto attivo all'interno di questo gruppo di farmaci potrebbe portare più velocemente all'uso su pazienti FC. Il nostro progetto si propone di effettuare lo studio di 1.079 farmaci approvati per uso umano in Italia allo scopo di trovare uno o più composti che correggano il difetto di base o che riducano il processo infiammatorio nei pazienti FC.

Attivatori del trasporto ionico mediato dalla CFTR: Identificazione e modellistica molecolare dei siti di legame.

Oscar Moran¹, Chiara Pincin¹, Vincenzo Martorana², Olga Zegarra-Moran³

- 1 Istituto di Biofisica, CNR, Genova,
- 2 Istituto di Biofisica, CNR, Sezione de Palermo,
- 3 Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova

Nonostante non esista ancora una terapia risolutiva per la fibrosi cistica, sono stati individuati dei farmaci, considerati buoni candidati per la terapia dei pazienti, in grado di attivare la proteina CFTR. Questi composti chimici recentemente identificati, sono capaci di attivare la CFTR, anche quando questa ha funzione ridotta per la presenza di alcuni tipi di mutazioni: rimane però sconosciuto il meccanismo coinvolto in questa attivazione. Alcune evidenze sembrano indicare che, per fare il loro effetto, gli attivatori si debbano legare ad una regione definita della proteina, chiamata dominio di legame dei nucleotidi (NBD). Mediante la modellistica molecolare, un approccio nuovo e molto efficace, cerchiamo d'identificare le regioni dei NBD che sono importanti per il legame e l'azione degli attivatori della CFTR. In primo luogo, abbiamo sviluppato un modello molecolare del NBD, e ora stiamo lavorando per identificare i possibili siti di legame dei farmaci su questa struttura, sia con metodi teorici che mediante il confronto con dati sperimentali. Questo tipo di approccio ci sarà molto utile per definire nuovi bersagli nello sviluppo di farmaci, per migliorare il potenziale terapeutico degli attivatori della CFTR, e anche per progettare farmaci specifici per mutazioni individuali che causano la fibrosi cistica.

Patogenesi e trattamento della patologia epatica correlata alla Fibrosi Cistica

Mario Strazzabosco, Carlo Spirlì. U.O. di Gastroenterologia, Ospedali Riuniti di Bergamo; Istituto Veneto di Medicina Molecolare, Padova.

Le manifestazioni cliniche a livello epatico sono presenti nel 30% dei pazienti con fibrosi cistica e ne compromettono la sopravvivenza e la qualità di vita. La terapia farmacologica per le complicanze epatiche in corso di fibrosi cistica è attualmente insoddisfacente.

Inoltre, nel fegato, i protocolli di terapia genica sono meno attuabili rispetto al polmone.

Il nostro gruppo di ricerca è impegnato da anni nello studio della fisiologia e fisiopatologia dell'epitelio biliare con l'intento di chiarire come il malfunzionamento del CFTR porti ad una diminuita secrezione di bicarbonato ed ad un danno anatomico del fegato e nello studio di possibili approcci farmacologici per il trattamento della malattia epatica correlata a fibrosi cistica. Attualmente stiamo utilizzando dei modelli in vitro per mettere a punto nuovi approcci terapeutici per trattare le patologie epatiche correlate alla fibrosi cistica. Una strategia che potrebbe rivelarsi molto utile è quella di stimolare la secrezione biliare sfruttando vie secretorie alternative a quella del CFTR. A tale scopo stiamo studiando i meccanismi molecolari alla base degli effetti coleretici della Glibenclamide, un composto della famiglia delle sulfoniluree abitualmente utilizzato nella terapia del diabete. I nostri risultati dimostrano come la glibenclamide stimoli il flusso biliare a livello dei dotti biliari tramite un peculiare meccanismo di trasporto vescicolare. Ma ancora più di notevole interesse è il risultato che la glibenclamide è in grado di ristabilre la secrezione di fluidi in frammenti dei dotti biliari isolati da topi knock-out per il CFTR, nei quali la secrezione cAMP-mediata è significativamente inibita.

Proteomica del liquido di superficie delle vie aeree

Olga Zegarra-Moran¹, Giovanni Candiano² e Luca Bini³

- 1 Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Giannina Gaslini,
- 2 Laboratorio di Fisiopalogi<mark>a dell'Uremia,</mark> Istituto Giannina Gaslini,
- 3 Dipartimento di Biologi<mark>a Molecolare, Univ.</mark> Degli Studi di Siena.

Nella Fibrosi Cistica (FC) il difetto primario, la mutazione del canale permeabile al cloruro CFTR, porta ad un'alterazione nella produzione di fluido nell'epitelio delle vie aeree e secondariamente a colonizzazione batterica e ad un massiccio processo infiammatorio. Il meccanismo che porta alla colonizzazione batterica è ignoto, ma è possibile che il difetto primario provochi la perdita o la modificazione di un fattore importante nel sistema di difesa delle vie aeree.

Noi stiamo proponendo un nuovo approccio, la proteomica, come método per identificare le proteine che l'epitelio delle vie aeree secerne in condizioni normali e nei processi infiammatori. Il nostro progetto si propone di recuperare ed analizzare il fluido che bagna la superficie delle vie aeree di un modello sperimentale di cellule bronchiali e anche quello che ricopre un epitelio di cellule ghiandolari, in presenza oppure in assenza di stimoli infiammatori simili a quelli presenti nei bronchi dei pazienti con FC. Studieremo inoltre il fluido d'epiteli ottenuti da pazienti con FC. Dal confronto di queste situazioni noi potremmo identificare quelle proteine la cui secrezione è modificata da stimoli infiammatori e che possono avere un ruolo antiinfiammatorio o antibatterico. Potremmo inoltre cercare differenze nello spettro di proteine prodotte in epiteli FC e non-FC che possano spiegare la persistenza dello stato infiammatorio nei pazienti. Il coinvolgimento delle proteine identificate nei fenomeni infiammatori sarà poi confermato con mètodi biochimici ed, in certi casi, misurando il loro effetto sull'attività batterica. Crediamo che questo approccio porterà all'identificazione di fattori coinvolti nei meccanismi alla base della malattia polmonare nella FC. Inoltre, le proteine identificate potranno servire come bersaglio nello sviluppo di nuovi farmaci antiinfiammatori e/o antibatterici selettivi.

GENETICA

Moderatore: Pierfranco Pignatti (Direttore Istituto di Biologia e Genetica, Università di Verona, Presidente della Società Italiana di Genetica Umana)

Minicromosomi: un nuovo approccio per la terapia genica della Fibrosi Cistica

Cristina Auriche, Elisabetta Testa, Salvatore Carrabino', Sante Di Gioia', Nicoletta Pedemonte', Massimo Conese', Olga Zegarra-Moran', and Fiorentina Ascenzioni*. Istituto Pasteur-Fondazione Cenci Bolognetti, c/o Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo. Università di Roma "La Sapienza".

- 1 Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H.S. Raffaele, Milano.
- 2 Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto G. Gaslini, Genova. Prog. #1/2002

La terapia genica intesa come "sostituzione del gene malato con quello sano" rappresenta, almeno concettualmente, il migliore intervento terapeutico oggi pensabile per il trattamento di patologie genetiche monosomatiche. Studi pilota di terapia genica applicata alla fibrosi cistica, come ad altre malattie genetiche, hanno però rivelato una serie di importanti problematiche che attualmente limitano l'applicazi<mark>one di guesta tecnica.</mark> Uno dei problemi più rilevanti è quello relativo alla disponibilità di un vettore adeguato per l'introduzione del gene sano nella cellula bersaglio. Questo ci ha spinto ad investigare la possibilità di utilizzare un cromosoma come vettore per i geni terapeutici. Tale scelta è motivata dal fatto che i cromosomi sono i naturali vettori dei nostri geni

e che oggi disponiamo delle tecniche per modificare opportunamente i cromosomi in modo da ridurne le dimensioni, rimuovere i geni non correlati con la patologia in esame ed inserirvi il gene appropriato. Utilizzando come vettore il minicromosoma MC1, un piccolissimo derivato dal cromosoma 1 ed ampiamente caratterizzato in un precedente studio, abbiamo costruito MC1-CFTR. Tale costrutto contiene l'intero gene CFTR ed i suoi elementi di controllo. La funzionalità del gene CFTR è stata quindi studiata nelle stesse cellule in cui è stato assemblato il minicromosoma (cellule di hamster CHO), dimostrando che il clone (cellule derivate da un'unica cellula madre) P39 mostrava i migliori livelli di espressione sia a livello molecolare (mRNA e proteina) che funzionale. Questo clone è stato pertanto scelto per i successivi saggi di attività funzionale del canale e di persistenza del cromosoma nell'ospite. Abbiamo infatti potuto dimostrare che sottocloni derivanti da singole cellule del clone originale P39 avevano le stesse caratteristiche molecolari e funzionali del clone originale..

Stiamo attualmente lavorando per trasferire MC1-CFTR/39 in modelli cellulari CF in vitro per studiarne il possibile effetto terapeutico. A tale scopo abbiamo intrapreso l'analisi di una serie di modelli cellulari CF per mettere a punto nei nostri laboratori le condizioni sperimentali adatte a rivelare l'attività di MC1-CFTR.

Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio respiratorio con fibrosi cistica

Elena Copreni, Annalisa Bagnacani, Marianna Penzo, Massimo Conese. Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, H. S. Raffaele, Milano. Prog. # 2/2002

Tra i vettori virali quelli basati sui lentivirus presentano delle caratteristiche che permettono di considerarli come promettenti per la terapia genica della malattia polmonare FC. I lentivirus consentono un'espressione duratura del gene terapeutico in quanto capaci di integrare il gene da essi veicolato nel

genoma della cellula e possono infettare cellule con un basso indice di proliferazione, una proprietà molto importante, dal momento che l'epitelio respiratorio si rinnova completamente dopo alcuni mesi. Lo scopo primario di questo progetto è quello di verificare l'efficienza e l'efficacia di vettori lentivirali di ultima generazione in modelli in vitro e pre-clinici di epitelio respiratorio, adeguati per la Fibrosi Cistica.

Esperimenti condotti su topi C57Bl/6, mediante instillazione intra-tracheale di lentivirus che esprimono un gene marcatore (GFP), hanno dimostrato che l'espressione del gene è localizzata a livello sia dei bronchi che degli alveoli. Al fine di verificare che questo trasferimento genico non sia dovuto ad una "tossicità" intrinseca al lentivirus, è in corso apposito studio in vitro. Gli esperimenti prevedono l'aggiunta del lentivirus ricombinante dal lato apicale o basolaterale e la verifica dell'efficienza di trasferimento mediante la percentuale di cellule positive per il gene GFP. Inoltre verrà valutata la resistenza transepiteliale, un indice dell'integrità dell'epitelio, prima e dopo l'infezione.

Allo scopo di valutare l'efficacia dei lentivirus nei confronti dell'infezione respiratoria CF, è stato utilizzato il modello di crescita dell'epitelio respiratorio umano fetale trapiantato in topi immunodeficienti (xenotrapianto). Un numero noto di colonie di P. aeruginosa è stato inoculato direttamente nel polmone o nel lume tracheale. Sono stati quindi valutati sia il numero di colonie vitali sia l'internalizzazione batterica (la cattura del batterio da parte delle cellule respiratorie). A 24-72 ore dall'instillazione, si è riscontrato un aumento del numero di colonie per ciascun inoculo. I livelli di internalizzazione batterica erano molto bassi e comunque il numero di colonie vitali sembra essere correlato negativamente alla percentuale di batteri internalizzati. Inoltre, è in corso di studio come il muco prodotto dagli xenotrapianti possa influenzare l'adesione e l'internalizzazione batterica con cellule respiratorie epiteliali coltivate in vitro.

Identificazione di geni modificato-

ri della fibrosi cistica attraverso studio di famiglie ed analisi "microarray"

G. Novelli¹, P.F. Pignatti², F. Salvatore³.

- Dip. Biologia, Sez. Genetica, Univ. Tor Vergata, Roma;
- 2 Ist. Biologia e Genetica , Univ. Verona;
- 3 Dip. Biochimica e Biotecnologie, Univ. Napoli "Federico II". Prog. # 4/2003

La Fibrosi Cistica, analogamente a molte altre patologie dovute a difetti di singoli geni, dimostra espressività variabile ed eterogeneità clinica, a causa della presenza di geni modificatori, diversi dal gene CFTR, e di fattori ambientali diversi. Benché sia stato prodotto uno sforzo scientifico considerevole, i meccanismi patogenetici precisi della FC non sono ancora chiari, e il ruolo dei geni modificatori totalmente sconosciuto.

L'obiettivo di questo progetto è l'identificazione dei geni di suscettibilità in grado di influenzare la gravità clinica della malattia. A tale scopo abbiamo riunito le esperienze di tre gruppi di ricerca diversi con conoscenze specifiche sulla genetica e la genomica della FC. Per l'identificazione dei geni modificatori attivi nella FC viene utilizzata la metodologia dei microarray a cDNA, che consente di studiare contemporaneamente il livello di espressione di centinaia di geni selezionati per la dimostrata e/o supposta interazione fisica e/o funzionale con il gene CFTR. Tale livello di espressione è esaminato in biopsie di epitelio nasale proveniente da pazienti FC, comparabili per sesso ed età, con uguale genotipo CFTR e differenti manifestazioni cliniche. Parallelamente all'analisi del profilo di espressione di geni di interesse, vengono condotti studi di associazione tra alcuni geni candidati e i parametri respiratori e gastrointestinali di pazienti FC con differenti manifestazioni cliniche. Eventuali variazioni di sequenze nei geni modificatori analizzati sono esaminate accuratamente mediante lo studio funzionale e strutturale delle proteine mutate da essi codificate. Questo approccio multiplo sarà fondamentale per comprendere alcuni meccanismi molecolari che inducono variabilità fenotipica e per lo sviluppo di terapie farmacologiche adeguate.

La patologia dello splicing nella fibrosi cistica: distinzione tra varianti benigne e mutazioni che causano la malattia

Franco Pagani, Elisa Goina & Francisco Baralle International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Molecular Pathology Dept., Padriciano 99, Trieste 34012, Italy.

La corretta valutazione del significato patologico di varianti nella sequenza di DNA nel gene della Fibrosi Cistica (CFTR) puo' non essere immediatamente evidente. In genere, l'effetto di singole mutazioni sulla espressione genica viene riferito alla loro localizzazione entro il gene. Le mutazioni esoniche (cioè sulle porzioni codificanti del gene) vengono analizzate principalmente per il loro effetto sulla seguenza codificante, e le mutazioni introniche (gli introni sono porzioni del gene senza diretto effetto codificante) lontane dai siti canonici di splicing (il processo con cui si produce RNA messaggero con l'assemblaggio degli esoni del DNA) sono largamente ignorate. Varianti silenti non sono considerate patogene, altre varianti (missenso o nonsenso) sono studiate per il loro effetto a livello proteico.

In guesto studio abbiamo identificato che alcune mutazioni nel gene CFTR causano un difetto nello splicing alterando nuovi elementi regolatori dello splicing. Variazioni nucleotidiche singole nella sequenza dell'esone 12 inducono, indipendentemente dal loro effetto sulla proteina, un salto dell'esone con la conseguente produzione di un RNA messaggero non funzionale. L' elemento non-canonico identificato e' rappresentato dal "Composite Exonic Regulatory Element of Splicing (CERES)". Inoltre, utilizzando modelli sperimentali appropriati, e' stato evidenziato che numerose sostituzioni sinonime causano una modulazione della efficienza di splicing dell'esone. Questo dato indica che anche il più "innocente" polimorfismo può in realtà rivelarsi patologico, poiche' altera il processo di splicing. Queste conoscenze possono aprire la strada ad una più accurata diagnosi genetica, specie nei casi in cui l'analisi genetica classica non rivela mutazioni di sorta.

Studio del possibile utilizzo del polimorfismo CFTR-M470V per la determinazione del rischio di FC PF Pignatti, C Bombieri, A Begnini, F Belpinati, G Malerba (Sez. Biologia e Genetica; Dip. Mat. Infant. e di Biol-Genet, Univ. Verona); C Castellani, A Bonizzato (Centro Reg. Veneto Fibrosi Cistica, Ospedale Maggiore Verona); G Modiano, BM Ciminelli, F Pompei, C Ciccacci, G Bancone (Dip. Biologia "E. Calef", Univ. Roma Tor Vergata).

Recentemente, in uno studio condotto su un campione di soggetti sani della popolazione italiana con screening completo del gene, abbiamo evidenziato che le mutazioni del gene CFTR si trovano più frequentemente nei cromosomi che presentano la variante M del polimorfismo comune M470V. La nostra ipotesi e' che gli alleli CFTR con la variante M abbiano un rischio aumentato, rispetto a quelli con la variante V, di presentare in altra posizione del gene anche le mutazioni causa di fibrosi cistica). In tal caso la probabilità per una coppia di essere a rischio di fibrosi cistica sarebbe maggiore quando almeno uno dei membri della coppia fosse portatore dell'allele M o omozigote per questa variante. Per verificare questa ipotesi ci proponiamo di analizzare il polimorfismo M470V nelle famiglie di pazienti affetti da fibrosi cistica.

Il lavoro è iniziato solo da poche settimane, nelle quali abbiamo raccolto 93 famiglie, costituite dai genitori e da un figlio affetto da fibrosi cistica. Da ogni individuo è stato prelevato un campione di sangue, dal quale verrà estratto il DNA. Verranno quindi analizzate le principali mutazioni causa di FC nella nostra popolazione. Data la stretta associazione già nota tra la mutazione DeltaF508 e l'allele M, saranno escluse dallo studio le famiglie con figli omozigoti per la DeltaF508. Nei casi in cui non saranno state identificate le mutazioni FC sarà analizzato il gene

CFTR mediante tecnica DGGE. Ci proponiamo di raccogliere almeno 150 famiglie nelle quali sarà analizzato il polimorfismo M470V. Procederemo quindi all'analisi statistica dei dati ottenuti. La conferma della presenza preferenziale di mutazioni causa di FC nei geni CFTR con la variante M sarebbe molto utile, in particolare per le famiglie nelle quali una o più mutazioni non siano state identificate con i normali metodi in uso, per i casi atipici di fibrosi cistica, nei quali possono essere presenti una grande varietà di mutazioni, o come primo approccio di screening del portatore nella popolazione generale, o infine per iniziare le indagini in paesi economicamente meno sviluppati, data la semplicità del test e i suoi costi contenuti.

MICROBIOLOGIA E INFEZIONE POLMONARE

Moderatori: Gerd Doering (Presidente European CF Society) Antonio Cao (Presidente Comitato Scientifico Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica)



Lettura introduttiva GERD DOERING Tuebingen University, Germany

Stato della ricerca su interazione batteri/epitelio respiratorio in fibrosi cistica

Le teorie correnti sulla patogenesi della fibrosi cistica (CF) prevedono diverse condizioni ambientali locali e siti che predispongono all'infezione batterica entro le vie aeree. Noi abbiamo dimostrato che Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus in pazienti CF con malattia polmonare consolidata sono localizzati all'interno di masse mucopurulente ipossiche (carenti in ossigeno) nel lume delle vie aeree. Studi in vitro hanno rivelato che l'aumentato consumo epiteliale di ossigeno specifico di CF, legato a sua volta all'aumentato assorbimento del volume di liquido di superficie e alla stasi del muco, generano prima dell'infezione eccessivi gradienti ipossici entro il muco ispessito sulla superficie dell'epitelio respiratorio CF. La Pseudomonas aeruginosa mobile, che si deposita sulle superfici delle vie aeree, penetra all'interno delle zone di muco ipossico e risponde a guesto ambiente con un aumento di produzione di alginato (componente fondamentale della pellicola autoprotettiva prodotta da Ps. aeruginosa). Ulteriori studi in vitro hanno rivelato che ceppi di aeruginosa, St. aureus e Burkholderia cepacia in condizioni di anaerobiosi (mancanza di ossigeno) aumentano significativamente la produzione di esopolisaccaridi (costituenti della pellicola gelatinosa prodotta dai batteri). Le condizioni di anaerobiosi compromettono poi fortemente la capacità di killing (di uccidere i batteri) da parte dei globuli bianchi neutrofili, per quanto concerne P. aeruginosa, St. aureus e B. cepacia. Il muco vischioso che si ha nella fibrosi cistica compromette anche migrazione dei neutrofili attraverso di esso. I dati oggi a disposizione, presi nel loro insieme, dimostrano che parecchi patogeni batterici sopravvivono nelle vie aeree CF a causa della loro attitudine a produrre un biofilm (pellicola gelatinosa), che viene generato attraverso un ambiente anaerobico CF-specifico sull'epitelio respiratorio.

Attraverso ulteriori studi in vitro, in animali con infezione polmonare cronica da Ps. aeruginosa e in pazienti CF, noi abbiamo dimostrato che il fattore sigma algU e algD nonché i geni muc (deputati alla sintesi e regolazione della pellicola mucoide) del ceppo non mucoide PAO1 erano sovraregolati (attivati in eccesso) entro 24 ore di permanenza in condizioni anaerobiche. Inoltre, nei polmoni di topo, varianti mucoidi PAO1 erano svelabili 24 ore dopo essere stati cimentati in perline anaerobiche di agar, mentre la mutazione nel gruppo muc era assente negli isolati di Ps. aeruginosa mucoide. Questi dati dimostrano che l'anaerobiosi induce rapidamente una conversione alla condizione mucoide nella Ps. aeruginosa, che questo tratto fisio-patologico è dominato dalla regolazione genica del batterio per protratti periodi di tempo, prima che siano stati selezionati varianti mucoidi stabili attraverso mutazioni adattative in geni diversi da quelli del gruppo muc.

Questi studi indicano che le nuove terapie per la fibrosi cistica debbono includere la rimozione delle placche di muco ipossico, antibiotici efficaci contro la Ps. aeruginosa adattata agli ambienti anaerobici nonché vaccinazioni contro i maggiori patogeni di questa malattia.

Marker tassonomici e di virulenza di ceppi di Burkholderia cepacia associati alle infezioni respiratorie di pazienti con fibrosi cistica

Grazia Golini, Roberta Fontana Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia Università di Verona / Servizio di Microbiologia Azienda Ospedaliera di Verona

L'infezione da Burkholderia cepacia (B.c.) rappresenta uno degli eventi problematici 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 FC. gestione del paziente Nonostante siano stati messi a punto numerosi terreni e protocolli per la coltura e identificazione di questo microrganismo, non è facile garantire la sua univoca identificazione, mentre altri batteri gramnegativi vengono frequentemente ed erroneamente identificati come B.c. Recentemente, tecniche di analisi molecolare sono state applicate alla tassonomia di B.c. portando all'identificazione di distinti genomovar (termine coniato per contraddistinguere ceppi fenotipicamente simili ma genotipicamente 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 dell'infezione.

163 ceppi, isolati da 82 pazienti e identificati precedentemente come B.c. mediante prove biochimiche, sono stati riidentificati mediante nuove e raffinate tecniche (analisi dei profili di restrizione del gene dell'rRNA 16S generati dall'enzima Ddel e del gene recA generati dagli enzimi HaellI e Mnl)I

Un'elevata percentuale (26%) di ceppi biochimicamente identificati in precedenza 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 <mark>A.xilosoxida</mark>ns, S. maltophilia e B. gladioli. Inoltre, l'analisi dei RFLP del gene recA dei 121 ceppi geneticamente confermati come appartenenti a B.c. complex ha permesso la seguente suddivisione: genomovar I 8.3%, genomovar II 5.8%, genomovar III-A 37.2%, genomovar III-B 47.10% e genomovar V 1.6%. 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.

Sviluppo di un test diagnostico per la discriminazione di specie e genomovars di Burkholderia cepacia complex nella routine clinica Renato Fani¹, Graziana Manno³, Giovanni Taccetti⁴, Silvia Tabacchioni²

 Dipartimento di Biologia Animale e Genetica, Via Romana 17-19, 50125 Firenze
 ENEA Casaccia, BIOTEC-GEN, Via

- Anguillarese 301, S. Maria di Galeria, 00060 Roma
- 3 Lab. di Ricerca Diagnostica Infettivologica, Istituto G. Gaslini, L.go G. Gaslini 5, 16147, Genova
- 4 Divisione di Pediatria, Malattie infettive, Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Anna Meyer, via L. Giordano 13, 50132, Firenze

Il Burkholderia cepacia complex (Bcc) comprende batteri patogeni opportunisti estremamente importanti nella fibrosi cistica (FC), responsabili in alcuni casi della condizione clinica conosciuta come "cepacia syndrome" che determina un drastico peggioramento del quadro clinico del paziente. I diversi componenti del complex mostrano un differente grado di patogenicità e sono spesso di difficile trattamento terapeutico a causa dell'elevata trasmissibilità e delle numerose resistenze agli antibiotici di alcuni ceppi. Inoltre, il Bcc è ampiamente diffuso nel suolo e nella rizofera. suggerendo l'ipotesi che l'ambiente naturale possa costituire una riserva di ceppi potenzialmente patogeni.

Il B. cepacia complex è costituito da nove diverse specie genomiche, o genomovars. La complessità ed il continuo sviluppo della tassonomica del complex rendono particolarmente difficoltosa ed elaborata l'identificazione dei batteri che vi appartengono. Pertanto, per contrastare un'infezione dovuta a ceppi appartenenti al Bcc è di fondamentale importanza possedere gli strumenti per effettuare una diagnosi corretta e veloce che consenta di identificare il batterio responsabile dell'infezione in atto. Attualmente gli isolati del Bcc possono essere identificati usando tecniche basate sull'analisi del polimorfismo del gene recA, quali RFLP o PCR-specie specifiche, sebbene non sia insolito avere dei risultati di difficile lettura e non esenti da

Lo scopo del progetto è quello di mettere a punto un nuovo sistema d'identificazione basato sull'analisi SNP (Single Nucleotide Polymorphism) che permetta di discriminare le diverse specie del complex e che possa essere facilmente utilizzato in ambito ospedaliero. Dato il non ancora chiarito ruolo della frazione ambientale, sono stati presi in esame ceppi di

diversa provenienza. In particolare. la nostra attenzione si è focalizzata sulla specie B. cenocepacia che, oltre ad essere ampiamente diffusa sia tra i pazienti FC e nell'ambiente naturale, comprende anche i ceppi più virulenti e trasmissibili. La strategia sperimentale prevede una prima fase in cui, tramite un'attenta analisi comparativa delle sequenze nucleotidiche del gene recA di ceppi appartenenti al complex, devono essere ricercate delle "mutazioni puntiformi" che distinguano in modo univoco una specie dall'altra. Sulla base delle informazioni raccolte in banca dati, integrate dai primi risultati ottenuti dal seguenziamento del gene recA su un panel di ceppi di diverse specie e diversa origine, è stato disegnato un primo set di primers, utili ad identificare B. cenocepacia. Attualmente abbiamo a disposizione alcuni dati sperimentali che ci hanno permesso di accertare la potenzialità del sistema.

Rilevanza del sistema di regolazione "quorum sensing" nell'infezione polmonare da Burkholderia cepacia e suo possibile trattamento

Vittorio Venturi Bacteriology Group, International Centre for Genetic Engineering & Biotechnology, Area Science Park, Padriciano, Trieste

Il sistema "quorum sensing" e' un meccanismo di regolazione globale dipendente dalla densita' cellulare, esso regola infatti il comportamento dei batteri quando essi sono molto numerosi. Il quorum sensing in batteri gram negativi si basa generalmente su molecole segnale (chiamate anche autoinduttori), appartenenti alla famiglia dei lattoni omoserinici (HSL), che vengono sintetizzate da una proteina sintetasi. Le molecole di lattone diffondono liberamente attraverso la membrana batterica e all'aumentare della popolazione di microorganismi aumenta anche la loro concentrazione. Quando questa raggiunge un certo livello le molecole omoseriniche si combinano con una proteina regolatrice (recettore del segnale) e questo nuovo complesso attiva o reprime l'espressione di geni sottoposti a regolazione da parte del quorum sensing, illustrando l'importanza di raggiungere un 'quorum' di batteri. I batteri patogeni per animali e piante si pensa che formino microcolonie, per esempio un biofilm, all'interno dell'ospite e qui si potrebbero raggiungere le elevate densita' cellulari necessarie a innescare il meccanismo di regolazione.

In diversi batteri i geni controllati dal quorum sensing risultano essere quelli coinvolti nella produzione di biofilm (pellicola mucide che riveste e ingloba colonie di batteri), nella produzione di antibiotici, nella motilita' cellulare, nella capacita' di trasferire materiale genetico da una cellula all'altra, e nella produzione dei fattori di virulenza che rendono questi batteri aggressivi e nocivi per l'uomo. Per quel che riguarda Burkholderia cepacia in particolare, e' stato dimostrato il coinvolgimento del sistema quorum sensing nella produzione di biofilm e nella motilita' cellulare (Huber et al., 2001).

Il nostro lavoro ha portato fino ad ora all'individuazione in B. cepacia del sistema di quorum sensing (Aguilar et al., 2003). Inoltre abbiamo messo a punto un sistema che ha reso possibile individuare i geni sottoposti al controllo da parte del quorum sensing (Aguilar et al., 2003b). Prossimi obbiettivi del progetto riguardano l'individuazione degli altri geni sottoposti a regolazione da parte del quorum sensing. la caratterizzazione di quelli gia' individuati, e lo studio di un'eventuale integrazione del sistema con altri meccanismi di regolazione globale. Interferire con il sistema di regolazione basato sul quorum sensing costituirebbe un sistema probabilmente molto efficace e nuovo per "controllare" le popolazioni batteriche rendendole innocue.

Geni per l'alginato in Pseudomonas aeruginosa: regolazione e mutazioni nelle infezioni croniche respiratorie.

Alessandra Bragonzi Institute for General and Environmental Hygiene, Tübingen, Germany e Institute for Experimental Treatment of Cystic Fibrosis, Milano, Italy

Il difetto genetico della Fibrosi

Cistica (FC) e' la causa primaria di anormali secrezioni viscose caratterizzate da locale assenza di ossigeno nelle vie aeree. Questa condizione predispone la grande maggioranza dei pazienti FC ad infezioni dell'epitelio respiratorio causate da patogeni opportunisti tra cui Pseudomonas aeruginosa. Il batterio, inizialmente acquisito dall'ambiente e caratterizzato da un fenotipo non-mucoide, si adatta alle condizioni di stress imposte dall'epitelio respiratorio cambiando il fenotipo in mucoide ed acquisendo mutazioni in geni (mucABD) coinvolti nella regolazione dell'alginato. L'alginato é il principale componente della capsula batterica di ceppi mucoidi e protegge la cellula dalle difese immunitarie paziente e da trattamenti antibiotici, impedendone l'eradicazione... Abbiamo recentemente messo a punto un modello di topo per investigare in dettaglio la cinetica della conversione di P. aeruginosa da non-mucoide a mucoide durante la progressione della malattia FC da una fase acuta ad una cronica. In questo modello P. aeruginosa viene inclusa in sfere di agar e veicolata nel polmone murino tramite inie-Abbiamo zione intratracheale. dimostrato che le sfere di agar riflettono la situazione del muco FC e sono caratterizzate da parziale assenza di ossigeno (anaerobiosi), costituendo un buon modello per lo studio seguente. P. aeruginosa sottoposta a stress anaerobico nel polmone murino, cresce formando macro-colonie ed attiva la regolazione genica inducendo espressione di alginato.

Dal punto di vista clinico questi risultati implicano che ceppi mucoidi di P. aeruginosa potrebbero essere presenti nell'epitelio respiratorio dei pazienti dopo pochi giorni dalla colonizzazione ma non sono identificabili con test microbiologici di routine. La sopravvivenza delle cellule batteriche, assicurata da questo processo di regolazione genica, e' mantenuta per due settimane fino a quando l'acquisizione di mutazioni determina un fenotipo stabile e diventa rilevabile anche in vitro. Il fenotipo mucoide di P. aeruginosa è stato fino ad ora attribuito a mutazioni in geni mucABD. Analisi di sequenza di ceppi mucoidi murini e di pazienti FC, collezionati in una fase iniziale dell'infezione, ha rivelato che questo fenotipo e' selezionato in vivo indipendentemente da mutazioni in mucABD. Mutazioni nel gene mucA vengono acquisite in una fase tardiva della malattia ma comunque non sono completamente associate al fenotipo mucoide. Ouesti dati indicano che altri geni, ad oggi sconosciuti, intervengono nella regolazione genica dell'alginato. Ulteriori studi ci permetteranno di identificare questi nuovi geni e determinare nuovi processi coinvolti nell'infezione cronica da P. aeruginosa in FC.

Un nuovo programma informatico a supporto del Registro Italiano Fibrosi Cistica

A. Bossi¹, I. Cortinovis¹, S. Milani¹, R. Padoan², L. Viviani¹

- 1) Istituto di Statistica Medica e Biometria, Università degli Studi di Milano;
- 2) CRR AO Istituti Clinici di Perfezionamento, Milano

Introduzione: Il Registro Italiano per la Fibrosi Cistica si è rivelato essere un utile strumento per studiare la storia naturale della malattia e per valutare sia l'efficacia di programmi di diagnosi precoce, sia l'effetto di nuove terapie. Il personale medico e paramedico dei Centri Fibrosi Cistica (FC) non può però accedere direttamente ai dati del Registro per ottenere una risposta a quesiti di natura clinica od epidemiologica di suo interesse. Scopo del progetto: Per questo si è pensato di realizzare un software

che fornisca a ciascun Centro FC (o Servizio di Supporto) la possibilità di disporre direttamente delle elaborazioni solitamente richieste ai ricercatori dell'Istituto di Statistica Medica e Biometria dell'Università degli Studi di Milano (che dal 1988 gestiscono il Registro). Tale software sarà distribuito a mezzo Compact Disk (CD).

Descrizione del programma: Tramite un menù iniziale sarà possibile richiedere elaborazioni e descrizioni delle variabili archiviate, e stabilire se riportare i risultati sotto forma di tabella o grafico. Compatibilmente con la natura delle variabili, saranno fornite anche alcune misure di sintesi delle variabili selezionate (media. mediana, deviazione standard, coefficiente di correlazione, ecc.), e brevi commenti a quanto ottenuto. A scopo esemplificativo, si supponga di voler conoscere l'andamento negli anni dell'età alla diagnosi; sarà possibile selezionare le variabili "età alla diagnosi" e "anno della diagnosi" e scegliere, per ciascuna, il raggruppamento dei valori in classi. Il software fornirà un file con il risultato dell'analisi richiesta, che potrà essere stampato sotto forma di grafico o tabella, in base alla richiesta dell'utente. Le elaborazioni saranno disponibili aggregate a livello nazionale o regionale, ma ogni operatore potrà disporre anche delle elaborazioni aggregate a livello del proprio Centro FC.

In seguito all'aggiornamento annuale del Registro, sarà possibile inviare a ciascun Centro il CD contenente le elaborazioni aggiornate.

Il prof. Antonio Cao, Presidente del Comitato Scientifico della Fondazione, apre l'incontro "laico" della Convention



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

CONSIGLIO DI AMMINISTRAZIONE

Presidente Vicepresidente Consiglieri Vittoriano Faganelli Carlo Delaini 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
Revisore dei Conti
Tesoriere
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

INVESTIMENTI DELLA FONDAZIONE NEL 2003 PER RICERCA E FORMAZIONE

• Finanziamento 13 progetti di ricerca: euro 508.000

• Percorso formativo CF, Seminari,

Convegni, Pubblicazioni:

euro 55.000

Totale: euro 563.000

SPOT RADIO PER LA CAMPAGNA "SETTIMANA RICERCA ITALIANA FIBROSI CISTICA"

Voce bambino:

Caro Babbo Natale,

per favore quest'anno non portarmi il maxi-garage,

neanche la play-station,

e neppure le scarpe da calcio o quel super robot che mi piace tanto. Portami la speranza di guarire dalla fibrosi cistica. Lo so che manca tanto a Natale, ma manca poco alla ricerca per sconfiggere la mia malattia.

Voce speaker:

Alla ricerca manca il tuo aiuto. Manca il tuo contributo. Chiama il numero verde: 800 955 905

Voce bambino:

Ah, Babbo Natale, quando sarò guarito, portami pure tutti gli altri regali!

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

EDITORE

Fondazione Ricerca Fibrosi Cistica - Onlus

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



fondazione per la ricerca sulla fibrosi cistica - onlus

in Collaborazione con



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°9465517 Ag. di B. Trento ABI 2008 CAB 11718
- Banca Popolare Verona c/c n°48829 Ag. di B. Trento ABI 5188 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 2065 Le imprese o società possono dedurre dal reddito d'impresa un importo massimo di euro 2065 o il 2% del reddito dichiarato (art.13 del D.L. 460/97).

