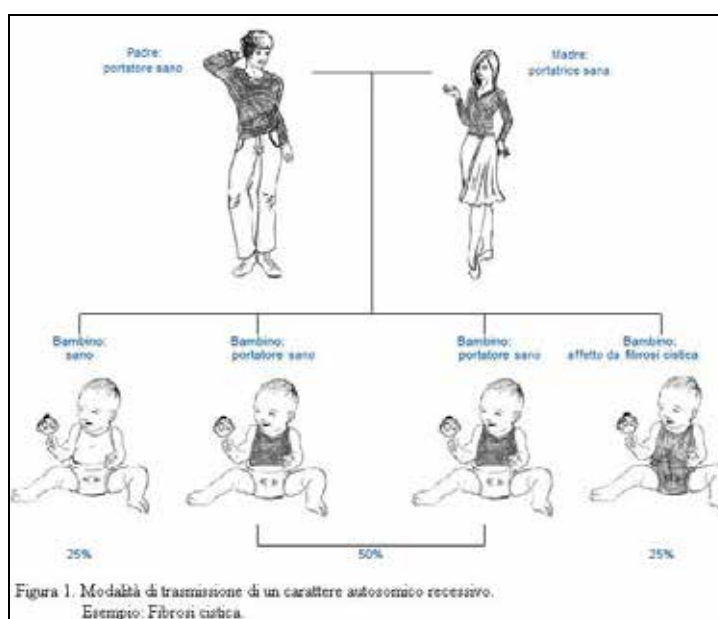


CAPITOLO 1

LA FIBROSI CISTICA

1.1 GENERALITÀ

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva. Individui affetti (omozigoti recessivi: aa) sono figli di genitori entrambi portatori sani (eterozigoti: Aa) del “gene malattia” (fig.1).



Tra le malattie congenite ereditarie, la FC è sicuramente una delle più serie e comporta un impegno assistenziale e terapeutico che si protrae per tutta la vita. Lo sviluppo delle conoscenze sulla causa e sulle manifestazioni della FC ha consentito un miglioramento della qualità e della durata della vita dei malati, ma per molti aspetti la patologia risulta ancora poco conosciuta e, a volte, sottodiagnosticata o diagnosticata tardivamente. Ogni anno vengono fatte oltre 150 nuove diagnosi e l'età mediana alla diagnosi è di circa 9 mesi³.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DELLA FIBROSI CISTICA

La Fibrosi Cistica è la malattia autosomica recessiva più comune nella popolazione italiana. È verosimile che i dati raccolti nel registro italiano della fibrosi cistica¹ sottostimino il numero degli affetti poiché il potenziale diagnostico della malattia è soggetto ad un'ampia variabilità regionale. Sembra perciò più affidabile fare riferimento a programmi di *screening* neonatale che riportano un'incidenza compresa tra 1/2.730 e 1/3.170 nati². Da questi dati si può desumere una frequenza di portatori compresa tra 1/26 e 1/30. Nelle popolazioni asiatiche la frequenza dei pazienti affetti da FC è bassa³.

Ogni anno vengono fatte oltre 150 nuove diagnosi e l'età mediana alla diagnosi è di circa 9 mesi⁴.

L'aspettativa di vita rimane poco prevedibile individualmente; mediamente è ridotta rispetto a quella della popolazione generale, ma va progressivamente aumentando. Dai dati del Registro Nazionale emerge che nei primi anni '80 il 50% dei malati non superava i 14 anni, mentre nel 1997 la stessa quota supera i 20 anni, con qualità di vita soddisfacente tranne che negli stadi di acutizzazione o terminali della malattia.

1.3 MECCANISMO FISIOLÓGICO E MANIFESTAZIONI CLINICHE

CELLULE EPITELIALI

Le cellule epiteliali rappresentano una barriera continua tra l'interno dell'organismo e l'ambiente esterno.

Esse sono caratteristicamente POLARIZZATE, poiché le giunzioni serrate, che collegano tra loro cellule adiacenti, suddividono la membrana di ogni cellula epiteliale in una parte apicale e una parte basolaterale (fig.2).

La membrana delle cellule epiteliali contiene proteine di trasporto specializzate, le quali regolano gli scambi di sostanze fra l'interno e

l'esterno della cellula. I tessuti epiteliali, pur appartenendo ad organi differenti, presentano medesime proteine di trasporto. Per esempio, nell'epitelio delle ghiandole salivari, delle ghiandole sudoripare, dei dotti pancreatici e dei dotti biliari si riscontrano identici canali di trasporto del cloro. Difetti genetici a carico di queste proteine di trasporto (come per es. il canale CFTR) si ripercuotono su tutti gli organi in cui esse sono presenti.

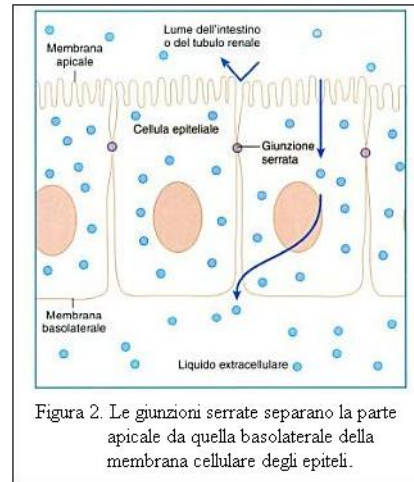


Figura 2. Le giunzioni serrate separano la parte apicale da quella basolaterale della membrana cellulare degli epiteli.

IL TRASPORTO DEL CLORO: CANALE CFTR

Il **trasporto del cloro** ha un compito cruciale nel determinare lo stato fisico delle secrezioni degli epiteli e lo stato di idratazione della superficie dei rivestimenti epiteliali degli organi cavi o tubolari del nostro organismo. Il passaggio del cloro, attraverso la superficie apicale delle cellule, avviene mediante un meccanismo di trasporto attivo (ATP-dipendente)⁵.

Normalmente, le cellule di rivestimento del tratto polmonare e gastrointestinale utilizzano un sistema di pompe e trasportatori comuni per secernere Cloruro di sodio (NaCl) ed acqua (H₂O) nelle loro superfici apicali (fig.3).

Le pompe sodio/potassio ATP dipendenti (Na⁺/K⁺ ATPasi), presenti sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali, instaurano un gradiente elettrochimico di Na⁺, che viene sfruttato dal sintrasportatore Na⁺/K⁺/2Cl⁻ della membrana basolaterale per prendere

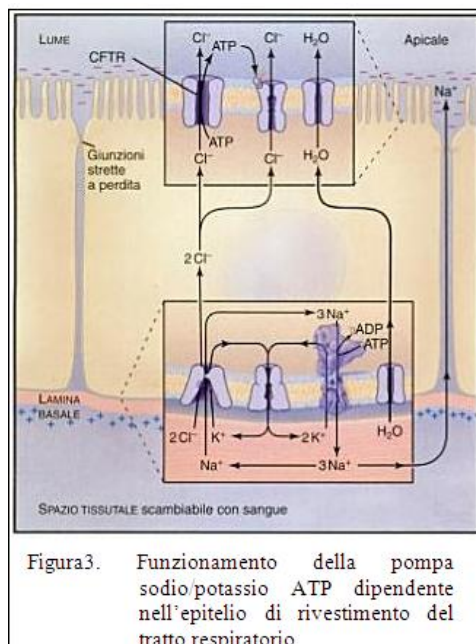


Figura3. Funzionamento della pompa sodio-potassio ATP dipendente nell'epitelio di rivestimento del tratto respiratorio.

Na^+ insieme agli ioni K^+ e Cl^- . Il movimento verso l'interno del Na^+ secondo il suo gradiente elettrochimico porta all'ingresso di K^+ e Cl^- contro i loro gradienti, provocando un eccesso di Cloruro di potassio (KCl) nella cellula. Il Cl^- in eccesso rimane nella cellula. La proteina transmembrana CFTR si comporta come un canale Cl^- . Quando la protein-chinasi fosforila il dominio regolatore e l'ATP si lega ai domini citoplasmatici, un cambio conformazionale apre il canale del Cl^- attraverso la membrana. Il Cl^- si muove secondo il suo gradiente elettrochimico fuori dalla cellula, portando una carica all'esterno. L'intero epitelio si polarizza, con il lume elettricamente negativo in relazione al compartimento extracellulare fluido. Questa forza elettrica trainante permette al Na^+ di spostarsi tra le cellule, dal compartimento extracellulare fluido, attraverso giunzioni a perdita (*leaky*), alla superficie dell'epitelio. Il Cloruro di sodio sulla superficie apicale crea una forza osmotica che trascina l'acqua secondo il suo gradiente di concentrazione attraverso le cellule verso l'esterno grazie ai canali acquosi. Sembra anche che il CFTR inibisca i meccanismi di trasporto che riassorbono i fluidi dal lume dell'epitelio. Un equilibrio tra questa secrezione e il riassorbimento dei fluidi, di norma, mantiene la superficie dell'epitelio adeguatamente idratata, permettendo alle ciglia di liberare i polmoni da batteri e secrezioni ed ai dotti del pancreas di secernere enzimi digestivi⁶.

L'alterato controllo del movimento del cloro attraverso questa pompa fa diminuire l'idratazione delle mucose (la quantità di ioni ed acqua sulla superficie cellulare e nelle varie secrezioni epiteliali).

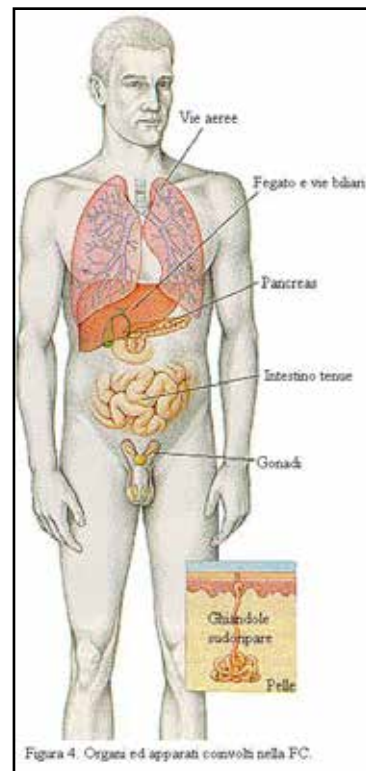
CONSEGUENZE DEL MAL FUNZIONAMENTO DI CFTR

Un'alterazione del canale CFTR causa **danni** importanti in vari distretti del nostro organismo (fig.4). Tuttavia, esistono alcune forme della patologia atipiche o criptiche, con una sintomatologia lieve, eventualmente limitata ad un solo organo. Sono considerate **forme atipiche** sia l'infertilità maschile da assenza dei dotti deferenti (CBAV), sia una forma di pancreatite cronica ricorrente priva di insufficienza pancreatica.

La **forma clinica classica** è caratterizzata da:

1. Broncopneumopatia cronica ostruttiva.
2. Sinusite cronica.
3. Insufficienza pancreatica.
4. Azoospermia.
5. Alterata concentrazione di elettroliti nel sudore⁷.

I sintomi più comuni si manifestano a livello respiratorio (tosse persistente e catarro), a livello intestinale (feci frequenti ed abbondanti, addome gonfio, occlusioni intestinali e mancanza di appetito) ed a livello sistemico (arresto della crescita e perdita di peso) (tab.1).



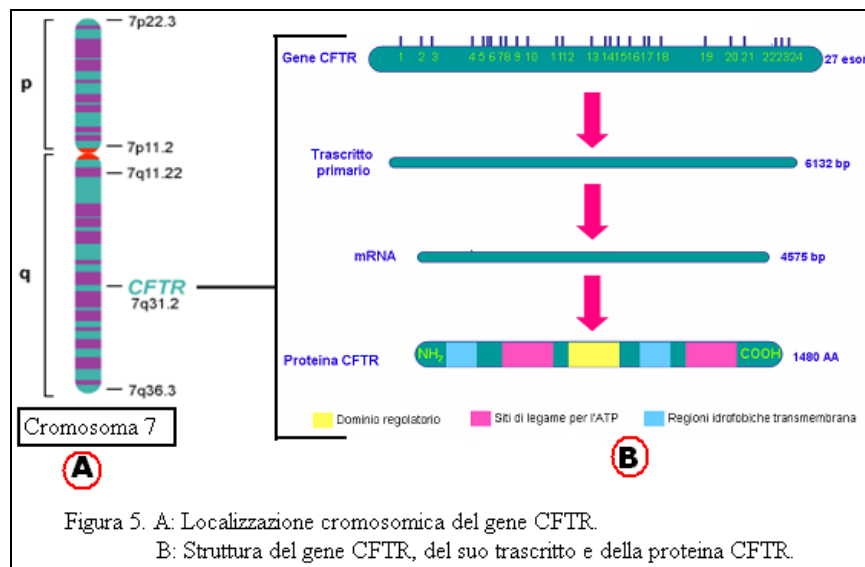
ORGANO	ANOMALIA	SINTOMI
Ghiandole sudoripare	Ipersalinit� sudorale	Collasso da calore
Pancreas	Alterazione secrezione enzimi e insulina	Maldigestione Diabete
Intestino	Muco intestinale molto denso	Occlusione intestinale
Fegato e vie biliari	Bile estremamente densa	Cirrosi biliare Calcolosi biliare
Naso/seni paranasali	Secreti densi	Sinusite cronica Poliposi nasale
APPARATI	ANOMALIA	SINTOMI
Apparato broncopolmonare	Muco denso Infezioni respiratorie ricorrenti Infiammazione	Broncopneumopatia cronica
Apparato riproduttivo maschile	Ostruzione vasi deferenti	Infertilit� Sessualit� normale
Apparato riproduttivo femminile	Muco cervicale denso	Ridotta fertilit� Sessualit� normale

Tabella 1. Organi ed apparati coinvolti nella Fibrosi Cistica

1.4 IL MECCANISMO PATOGENETICO DELLA FC

IL GENE E LA PROTEINA CFTR

Il gene che codifica per la proteina CFTR   stato mappato nel 1989 e sequenziato nel 1991. Esso   localizzato sul cromosoma 7, in posizione q31.2;   composto da 27 esoni e produce un mRNA di 6,5 Kb (fig.5).



Il prodotto genico di CFTR   una proteina di 1480 aminoacidi, che ha sede all'interno della membrana apicale delle cellule degli epitelii e funge da canale transmembrana degli ioni Cl⁻.

Durante lo sviluppo fetale, l'espressione del gene CFTR   stata accertata dalla 18^a settimana nel pancreas, nei dotti genitali, nel

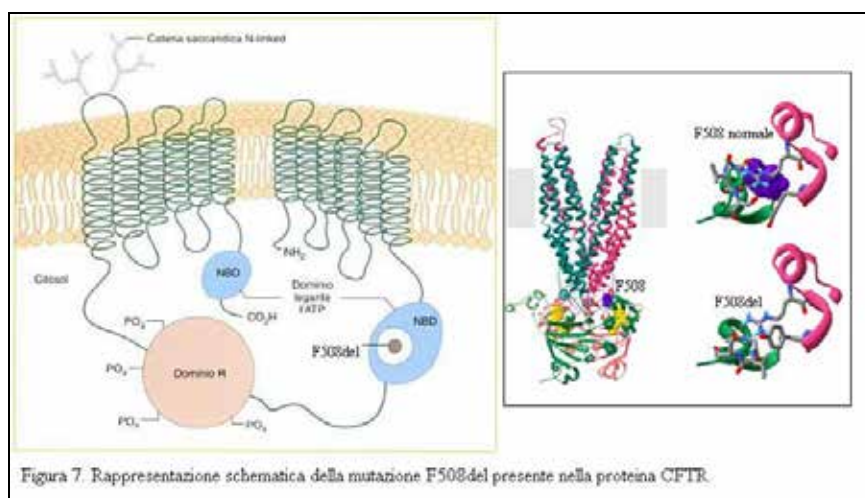
Sono state identificate oltre 1800 mutazioni differenti a livello del locus FC.

Esse interessano principalmente una o poche basi nucleotidiche e sono distribuite per lo più nella parte codificante del gene e nelle sequenze di giunzione tra esoni ed introni, più raramente negli introni.

La frequenza delle mutazioni è diversa nelle varie nazioni e anche nelle regioni di una singola nazione, data la diversa origine delle popolazioni che vi si sono insediate.

La mutazione F508del (dove “del” sta per delezione e “F” per fenilalanina) causa la perdita di 3 paia di basi codificanti per l'aminoacido fenilalanina in posizione 508, all'interno di uno dei domini leganti l'ATP. Questa mutazione rappresenta il **35-55%** delle mutazioni nell'Europa meridionale (Italia, Spagna, Grecia) e l'**85%** circa nelle popolazioni del Nord-Europa (Danimarca, Olanda, Regno Unito)⁹. La mutazione F508del rappresenta, quindi, la mutazione maggiormente diffusa.

La proteina CFTR con la mutazione F508del non acquisisce la corretta struttura tridimensionale e quindi non può essere trasportata attraverso il reticolo endoplasmatico fino all'apparato del Golgi dove normalmente sarebbe andata incontro a maturazione post-traduzionale (fig.7).



Probabilmente la mutazione F508del si è affermata nei paesi europei in quanto i portatori sani presentano un vantaggio evolutivo rispetto ai wild type. La proteina CFTR è indispensabile per l'ingresso del batterio *Salmonella Typhi* nelle cellule epiteliali. Nei soggetti eterozigoti il mal funzionamento della proteina CFTR ostacolerebbe parzialmente l'ingresso del microorganismo nelle cellule epiteliali, rendendoli resistenti alla febbre tifoide¹⁰.

CLASSIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI

Pur essendo molto eterogenee, le mutazioni nel gene CFTR sono state raggruppate in 6 classi in base all'alterazione funzionale della proteina CFTR di cui sono responsabili (fig.8).

La classe 1 contiene le mutazioni che inducono un difetto della produzione della proteina.

La classe 2 include le mutazioni che alterano il "processing" della proteina.

Le classi 3 e 4 comprendono mutazioni che non influiscono sulla produzione, maturazione e, quindi, sulla presenza della proteina sulla membrana delle cellule epiteliali interessate, ma provocano un deficit nell'attivazione del canale oppure un'alterazione della conduttanza. Le mutazioni di classe 3 interessano le regioni codificanti per i siti di legame per l'ATP e si manifestano con una mancata attivazione della proteina con conseguente deficit della conduttanza dell'anione cloro. La classe 4 annovera le mutazioni che determinano un difetto della permeabilità ionica. Queste mutazioni coinvolgono i domini transmembrana e provocano una diminuzione del flusso ionico ed una riduzione del tempo di apertura del canale.

La classe 5 include le mutazioni nei siti di "splice", che riducono la quantità ma non la funzionalità della proteina CFTR.

Nella classe 6 la proteina CFTR è normalmente espressa ed attiva, ma va incontro a degradazione precoce.

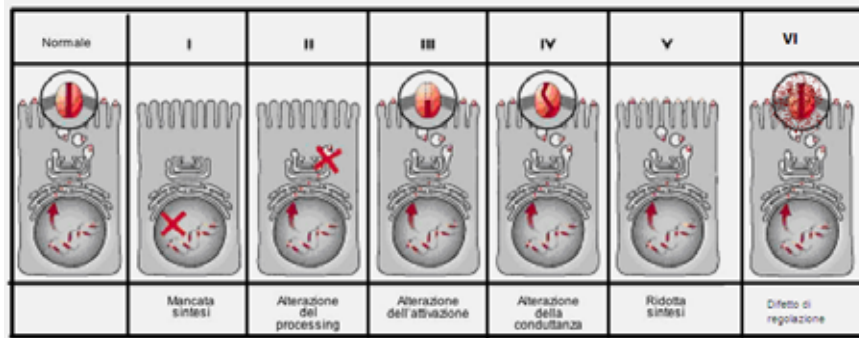
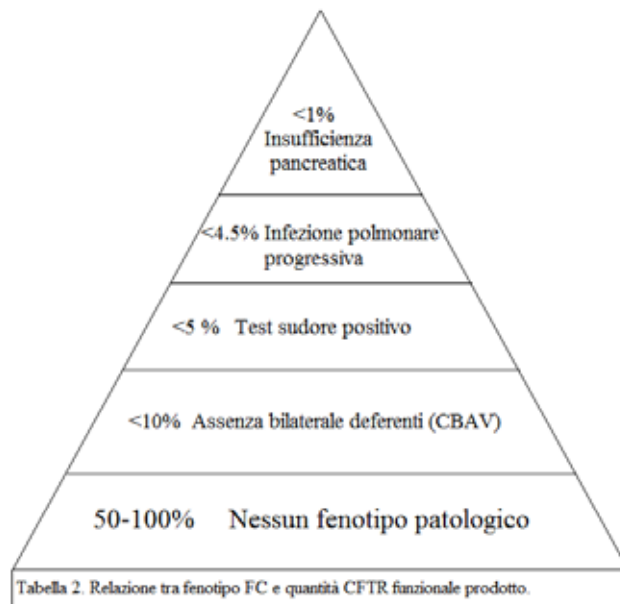


Figura 8. Classificazione delle mutazioni presenti nel gene CFTR e loro conseguenze sul prodotto proteico.

CORRELAZIONE GENOTIPO FENOTIPO

Non esiste una chiara correlazione genotipo-fenotipo, in quanto nella estrinsecazione della FC concorrono anche i cosiddetti geni modificatori ed i fattori epigenetici. Pertanto, è difficile costruire un iter prognostico riguardo alla severità della malattia in base alla particolare mutazione individuata nel genoma di un paziente affetto da fibrosi cistica.

La relazione tra genotipo FC e manifestazioni cliniche si può ricondurre al livello di espressione della proteina CFTR in forma attiva (tab.2).



C'è una buona correlazione tra il genotipo del paziente e la funzionalità del pancreas: basta un allele con mutazione lieve per dare sufficienza pancreatica, ce ne vogliono due gravi per dare insufficienza pancreatica (tab.3).

FUNZIONE	TIPO di MUTAZIONI	ESEMPI
INSUFFICIENZA	grave/grave	F508del/F508del F508del/R1162X
SUFFICIENZA	grave/lieve lieve/lieve	F508del/ <u>R117H-5T</u> <u>3849+10kbC-</u> <u>T/R334W</u>
Tabella 3. Correlazione fra genotipo e funzionalità pancreatica. ■ Le mutazioni “lievi” sono sottolineate.		

1.5 LA DIAGNOSI

La diagnosi si basa sulla presenza di manifestazioni cliniche o biochimiche compatibili con la malattia, in associazione alla positività di almeno uno tra i test diagnostici validati. Questi comprendono il test del sudore (con cloro e sodio in concentrazioni superiori alla norma), lo studio della differenza di potenziale elettrico transepiteliale nelle mucose respiratorie o intestinali¹¹ e l'analisi genetica che si considera positiva quando identifica due mutazioni che causano la malattia¹².

In alcune forme atipiche, nelle quali l'espressione clinica è modesta oppure limitata ad un solo organo o apparato, la diagnosi di Fibrosi Cistica è talora giudicata eccessiva e inappropriata¹³, ma manca ancora un consenso generalizzato sulla definizione nosologica da utilizzare.

Nelle forme classiche della malattia di solito la diagnosi è semplice, ma in quelle atipiche può essere molto complessa.

IL TEST DEL SUDORE

Il test del sudore è oggi considerato il test fondamentale per la diagnosi della Fibrosi Cistica, malattia che un tempo era denominata “malattia dal bacio salato”, a causa delle elevate concentrazioni di Cloruro di sodio (NaCl) nel sudore del paziente affetto.

Questo esame può essere eseguito a partire dalle 2 settimane di vita ed è necessario raccogliere una quantità di sudore sufficiente per

eseguire l'analisi: almeno 75 mg su carta da filtro o 15 mg con capillare. Esistono vari metodi, ma il più affidabile è quello di Gibson e Cooke (fig.9), il quale prevede:

1. Posizionamento sull'avambraccio di speciali tamponi imbevuti di pilocarpina, una sostanza chimica che favorisce la produzione di sudore.
2. Attraversamento dei tamponi da parte di un piccolo flusso di corrente, generato da una batteria, che induce la penetrazione della pilocarpina nell'epidermide.
3. Rimozione, dopo circa 5 min, dei tamponi.
4. Lavaggio della cute con H₂O sterile.
5. Raccolta, nel corso di 30 min, del sudore prodotto nella zona interessata, attraverso carta da filtro o tubo capillare.
6. Rimozione della carta da filtro e determinazione degli elettroliti presenti all'interno.

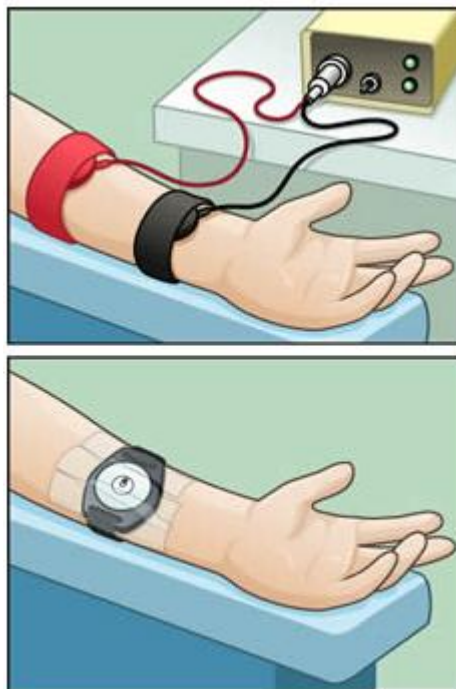


Figura 9. Test del sudore.

Per l'interpretazione dei risultati del test, vengono utilizzati intervalli di riferimento, nelle diverse fasce di età (tab.4 e 5).

Intervallo di riferimento	Interpretazione
<30 mEq/L	Normale, bassa probabilità di FC
30-60 mEq/L	Intermedia, suggestiva ma non diagnostica per FC
>60 mEq/L	Elevata, supporta la diagnosi di FC
Tabella 4. Intervalli di riferimento fino a 6 mesi di vita.	

Intervallo di riferimento	Interpretazione
<40 mEq/L	Normale, bassa probabilità di FC
40-60 mEq/L	Intermedia, suggestiva ma non diagnostica per FC
>60 mEq/L	Elevata, supporta la diagnosi di FC
Tabella 5. Intervalli di riferimento dopo i 6 mesi di vita.	

LO SCREENING NEONATALE

Lo screening neonatale è oggi eseguito nella maggior parte delle regioni italiane e mira ad identificare alcune malattie che, se individuate precocemente, possono essere curate con ottimi risultati.

Nella Regione Basilicata lo screening neonatale per la FC è attivo da diversi anni; in questo modo l'individuazione precoce dei soggetti FC indirizza verso cure e controlli che, nonostante non permettano una guarigione, migliorano le aspettative e la qualità della vita.

Lo screening per la Fibrosi Cistica, o test per la tripsina immunoreattiva (IRT), si basa sul dosaggio della tripsina, un enzima pancreatico, all'interno di una goccia di sangue prelevata dal tallone del neonato in 3[^] - 4[^] giornata dalla nascita e raccolta su carta assorbente.

In caso di positività accertata del test di dosaggio della tripsina, si procede con il test del sudore.

TECNICHE DI ANALISI GENETICA MOLECOLARE

È possibile distinguere vari livelli di analisi molecolare che si caratterizzano per diversi tempi di esecuzione, tecnologie e costi.

- **Analisi di I livello**: kit commerciale o preparato in laboratorio che include l'analisi delle mutazioni più frequenti. Le tecniche più utilizzate sono: Reverse Dot Blot, Amplification Refractory Mutation Systems, Oligonucleotide Specific Allele ed Oligonucleotide Ligation Assay.
- **Analisi di II livello**: scanning di tutti gli esoni e delle regioni limitrofe, riconoscimento di variazioni di sequenza, sequenziamento della specifica regione del gene. Le tecniche più utilizzate sono: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis e Denaturing High Performance Liquid Chromatography. I tests di II livello permettono un tasso di individuazione (*detection rate*) migliore, ma il significato fenotipico del risultato molecolare può essere di difficile interpretazione.
- **Analisi di III livello**: ricerca di delezioni e/o di inserzioni. Si fa ricorso in questo caso alla Quantitative Multiplex Polymerase Chain Reactions of Short Fluorescent Fragments.

Vale la pena sottolineare che i tests di I livello possono vantare una *detection rate* di circa il 90% e consentono l'identificazione delle mutazioni più frequenti. I tests di II e III livello hanno una maggiore sensibilità, ma portano a risultati di più difficile interpretazione perché possono individuare sia mutazioni che determinano la malattia sia varianti che non sono patologiche.

1.6 TRATTAMENTO DELLA FIBROSI CISTICA

Con i mezzi oggi disponibili la FC si può curare, anche se ancora non è possibile guarire. Un elevato numero di pazienti affetti da FC raggiunge l'età adulta in buone condizioni e, grazie al progresso delle cure, l'attesa di vita, che nel 1955 era di 5 anni e nel 1985 era di 25 anni, ha superato oggi i 40 anni². Data la varietà della

sintomatologia, il trattamento di questa patologia è alquanto complesso ed è necessario agire su molti fronti, sebbene le terapie più impegnative siano richieste dalle manifestazioni polmonari della malattia. Al fine di mantenere stabile la situazione respiratoria del malato, vengono somministrati periodicamente antibiotici contro le infezioni polmonari; viene effettuata una terapia aerosolica, in modo da fluidificare le secrezioni, assieme ad una fisioterapia respiratoria, per mantenere i polmoni liberi da quest'ultime, ed è fortemente consigliata l'attività fisica all'aria aperta. In età adulta è frequente l'insorgenza di complicanze respiratorie, come l'enfisema, trattato con terapia antiinfiammatoria (ad esempio l'ibuprofene) e broncodilatante, e l'insufficienza respiratoria, curata con ossigenoterapia, ventilazione o, in fase avanzata, con il trapianto polmonare.

Importante è, allo stesso tempo, mantenere una buona situazione digestiva, attraverso la somministrazione di enzimi pancreatici nei primi anni di vita, ed un adeguato stato nutrizionale, mediante la promozione di una dieta varia, integrata da vitamine, scarsamente assorbite a livello intestinale dal paziente, e supplementata con Cloruro di sodio.

NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Terapia genica

Dopo la scoperta della mutazione del gene CFTR, ci fu un entusiasmo generale per la possibilità dell'utilizzo della terapia genica¹⁴. Questa consiste nel trasferimento di copie del gene CFTR normale nelle cellule bersaglio malate. Sono stati analizzati molti possibili vettori nei diversi trials clinici come l'utilizzo di vettori virali o liposomi.

I primi studi in vitro e in vivo sembravano abbastanza promettenti, il gene era infatti trasferito con successo nelle vie aeree, ma nella maggior parte dei casi solo per un breve periodo di tempo¹⁵. Il problema maggiore è che non si conosce la percentuale di funzionalità che il gene CFTR deve recuperare per ottenere un

miglioramento della situazione clinica del paziente¹⁶. Inoltre la terapia genica richiede somministrazioni ripetute e questo crea problemi nell'utilizzo dei vettori virali che, se somministrati ripetutamente, stimolano la produzione anticorpale da parte dell'ospite¹⁷.

La terapia con adenovirus associato sembrava promettente in una fase precoce di sperimentazione. E' stato, infatti, inizialmente dimostrato da Moss e Coll che il trasferimento del gene determina un aumento dei valori di FEV1 (FEV1: Forced Expiratory Volume in the 1st second) e dei livelli di IL-8 nell'espettorato del paziente¹⁸. Una successiva rivalutazione dello studio, da parte degli stessi autori, non ha mostrato gli stessi risultati¹⁹.

Farmacoterapia del difetto di base

Altra prospettiva terapeutica promettente riguarda la correzione farmacologica del difetto CFTR.

Come già visto sopra, le mutazioni CFTR sono suddivise in 6 classi a seconda degli effetti che la mutazione produce sull'espressione e sulla funzionalità della proteina. I farmaci che mirano alla correzione del difetto di base sono rivolti ognuno verso una singola classe di mutazione. Essi quindi non vengono utilizzati in tutti i pazienti ma sono specifici per i singoli gruppi che presentano la stessa classe di mutazione.

Le mutazioni di prima classe sono "mutazioni di stop" che determinano una riduzione della produzione di mRNA.

Le mutazioni G542X e R553X, appartenenti a questa classe, possono essere sopresse mediante trattamento con piccole dosi degli aminoglicosidi G418 e gentamicina²⁰. Tali composti sono stati usati nel trattamento di pazienti FC in alcuni studi pilota²¹.

Le mutazioni di seconda classe, che comprendono la mutazione F508del, sono caratterizzate da una degradazione precoce.

Dal momento che le proteine CFTR, pur essendo mal ripiegate, mostrano comunque una normale conduttanza agli ioni cloro, i composti che sono in grado di ridurre la degradazione e di

aumentare il traffico di proteine CFTR alla membrana sono considerate come una opzione di trattamento potenziale²². Tra questi farmaci alcuni, chiamati correttori, si sono dimostrati promettenti.

Le mutazioni di terza classe sono caratterizzate da una mancata attivazione della proteina CFTR, normalmente espressa. Per tale classe di mutazioni sono in fase di studio composti, chiamati potenziatori, che hanno lo scopo di attivare la proteina canale. Tra questi VX770 ha mostrato di essere efficace e di presentare un buon profilo di sicurezza ed è attualmente impiegato in trials clinici in pazienti con mutazione G551D²³. I risultati mostrati dal farmaco appaiono promettenti. Il VX770 potrebbe essere utilizzato anche nel trattamento delle mutazioni di classe 2, combinato con i farmaci correttori¹⁶.

Le mutazioni di quarta classe sono caratterizzate da una proteina CFTR normalmente espressa sulla membrana plasmatica ma con una ridotta conduzione ionica. Alcune xantine prolungano lo stato fosforilato del CFTR e di conseguenza aumentano il tempo di apertura del canale.