



PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

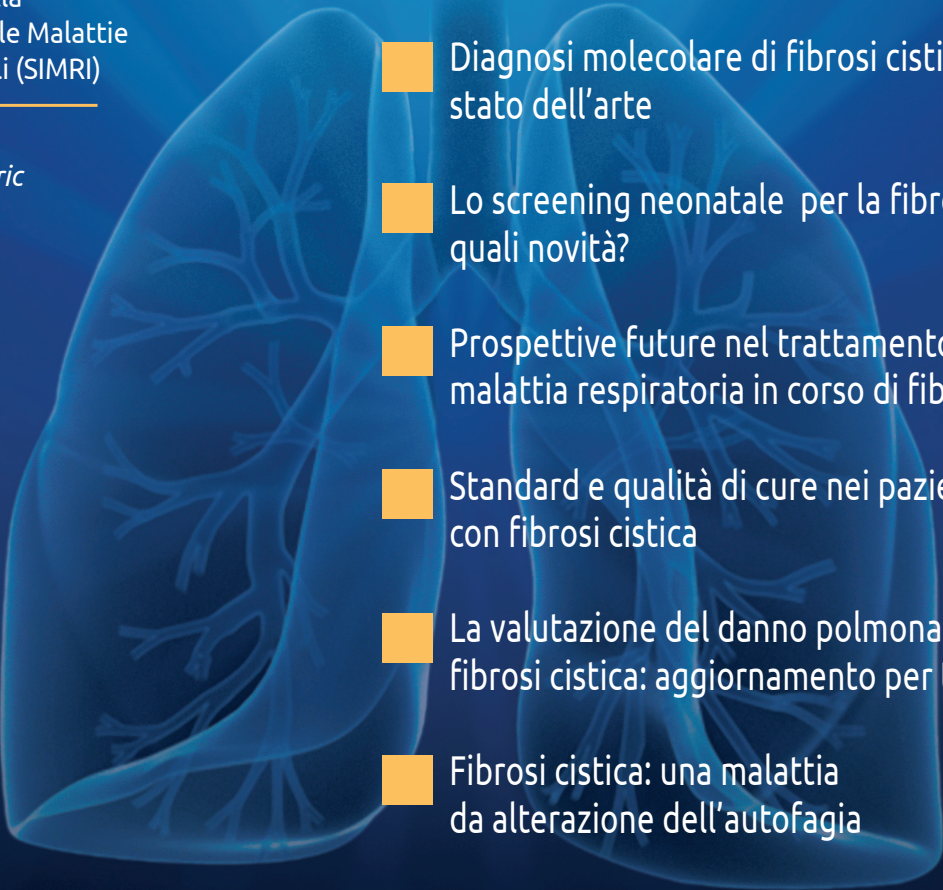
LA FIBROSI CISTICA

Organo ufficiale della
Società Italiana per le Malattie
Respiratorie Infantili (SIMRI)

*Official Journal
of the Italian Pediatric
Respiratory Society*

Volume 15 / n. 57
Rivista trimestrale
Spedizione in A.P.
art.2 comma 20/b
legge 662/96 Pisa
Reg. Trib. PI n.12
del 3 giugno 2002



- 
- Diagnosi molecolare di fibrosi cistica: stato dell'arte
 - Lo screening neonatale per la fibrosi cistica: quali novità?
 - Prospettive future nel trattamento medico della malattia respiratoria in corso di fibrosi cistica
 - Standard e qualità di cure nei pazienti con fibrosi cistica
 - La valutazione del danno polmonare nella fibrosi cistica: aggiornamento per tutte le età
 - Fibrosi cistica: una malattia da alterazione dell'autofagia

INDICE

Editoriale

View point

Francesca Santamaria

5

Diagnosi molecolare di fibrosi cistica: stato dell'arte

Molecular diagnosis of cystic fibrosis: state of the art

Paola Nardiello, Giuseppe Castaldo

6

Lo screening neonatale per la fibrosi cistica: quali novità?

Newborn screening for cystic fibrosis: what news?

Valeria Raia, Angela Sepe, Fabiola De Gregorio e Antonella Tosco

12

Prospettive future nel trattamento medico della malattia respiratoria in fibrosi cistica

Therapy for cystic fibrosis lung disease: current status and future perspectives

Valeria Galici, Cesare Braggion

17

Standard e qualità di cure nei pazienti con fibrosi cistica

Standards and quality of care in cystic fibrosis

Elisabetta Bignamini

24

Valutazione del danno polmonare nella fibrosi cistica: aggiornamento per tutte le età

Assessment of pulmonary impairment in cystic fibrosis from childhood to young adults

Giovanna Pisi, Valentina Fainardi

29

Fibrosi cistica: una malattia da alterazione dell'autofagia

Cystic fibrosis: a disease with defective autophagy

Luigi Maiuri, Daniela De Stefano

35

"Aria buona a scuola": un'indagine pilota in Campania

"Good air at school": a pilot study in Campania

Silvia Montella, Angela Orabona, Laida Lisa di Micco e Francesca Santamaria

41

Pneumologia Pediatria

Volume 15, n. 57 - Marzo 2015

Reg. Trib. PI n. 12 del 3 giugno 2002

Direttore Responsabile

Francesca Santamaria (Napoli)

Direzione Scientifica

Stefania La Grutta (Palermo)

Luigi Terracciano (Milano)

Segreteria Scientifica

Silvia Montella (Napoli)

Comitato Editoriale

Angelo Barbato (Padova)

Filippo Bernardi (Bologna)

Alfredo Boccaccino (Misurina)

Attilio L. Boner (Verona)

Mario Canciani (Udine)

Carlo Capristo (Napoli)

Fabio Cardinale (Bari)

Salvatore Cazzato (Bologna)

Renato Cutrera (Roma)

Fernando M. de Benedictis (Ancona)

Fulvio Esposito (Napoli)

Mario La Rosa (Catania)

Massimo Landi (Torino)

Gianluigi Marseglia (Pavia)

Fabio Midulla (Roma)

Luigi Nespoli (Varese)

Giorgio L. Piacentini (Verona)

Giovanni A. Rossi (Genova)

Giancarlo Tancredi (Roma)

Marcello Verini (Chieti)

Editore

Giannini Editore

Via Cisterna dell'Olio 6b

80134 Napoli

e-mail: editore@gianninisp.it

www.giannineditore.it

Coordinamento Editoriale

Center Comunicazioni e Congressi Srl

e-mail: info@centercongressi.com

Napoli

Realizzazione Editoriale e Stampa

Officine Grafiche F. Giannini & Figli SpA

Napoli

© Copyright 2015 by SIMRI

Finito di stampare nel mese di marzo 2015

Luigi Maiuri^{1,2} Daniela De Stefano¹

¹Istituto Europeo per la Ricerca in Fibrosi Cistica, Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

²Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara

Corrispondenza: Luigi Maiuri
email: maiuri.luigi@hsr.it

FIBROSI CISTICA: UNA MALATTIA DA ALTERAZIONE DELL'AUTOFAGIA

Cystic fibrosis: a disease with defective autophagy

Riassunto L'autofagia è un meccanismo fisiologico di sopravvivenza che le cellule adottano in risposta a vari tipi di stress. Una alterazione dell'autofagia è presente in molte patologie umane, comprese alcune patologie respiratorie.

La Fibrosi Cistica (FC) è caratterizzata da un difetto di autofagia causato dal sequestro funzionale di Beclin 1, una proteina fondamentale nella formazione degli autofagosomi, dovuto ad una persistente attivazione della Transglutaminasi Tissutale conseguente al difetto di funzione della CFTR. Il ripristino della risposta autofagica rappresenta una nuova opzione terapeutica per consentire il traffico e la stabilizzazione sulla membrana cellulare della proteina codificata dalla più comune mutazione della CFTR, la F508del.

La correzione del difetto di autofagia mediante regolatori di proteostasi, quali la cisteamina, consente di ripristinare una adeguata funzione della F508del-CFTR e di ridurre significativamente l'infiammazione polmonare sia in modelli murini di malattia sia in pazienti FC omozigoti per la mutazione F508del-CFTR.

Parole chiave: Fibrosi cistica, F508del-CFTR, autofagia, transglutaminasi tissutale (TG2), regolatori di proteostasi

Key words: cystic fibrosis, F508del-CFTR, autophagy, tissue transglutaminase (TG2), proteostasis regulators

INTRODUZIONE

La Fibrosi Cistica (FC), la più comune malattia genetica della popolazione caucasica a prognosi severa, che colpisce fra 1 su 2500 e 1 su 3500 nati vivi, è causata da mutazioni del gene CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*), che codifica per una proteina che regola il flusso di ioni, quali cloro e bicarbonati, e fluidi a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali (1,2). L'alterata funzione di canale ionico della proteina espressa sulla membrana delle cellule secretive determina il fenotipo clinico. Nella sua forma classica, la FC si manifesta con sintomi caratteristici a livello del polmone, del pancreas, dell'apparato gastrointestinale, del fegato e dell'apparato riproduttivo (3). Il decorso della malattia è variabile: alcuni soggetti presentano ileo da meconio alla nascita, sintomi respiratori e prognosi severa, e altri, invece, hanno scarse manifestazioni polmonari e decorso clinico benigno (4).

Sono state ad oggi identificate circa 2000 mutazioni del gene CFTR. Le mutazioni di cui si conosce l'effetto sulle alterazioni strutturali o funzionali della proteina sono state suddivise in classi (da I a V). Le mutazioni di classe I, II e III alterano in maniera consistente la quantità e la funzione della proteina, impedendone la produzione (classe I) o producendo una proteina mol-

to difettosa incapace di un corretto traffico intracellulare (classe II) o con assenza di funzione di canale ionico (classe III), e si associano ad un fenotipo clinico severo. Le mutazioni di classe IV consentono la sintesi di una proteina difettosa ma capace di svolgere, seppure in piccolissima misura, la sua funzione; quelle di classe V determinano la produzione di una certa quota, anche se piccola, di proteina normale (*Tabella I*). La mutazione più diffusa, la F508del, rappresenta il 50% circa delle mutazioni nell'Europa meridionale e l'80-90% nelle popolazioni del Nord-Europa. È una mutazione di classe II e la proteina risultante presenta un difetto di "folding" ed è rapidamente degradata prima di raggiungere la membrana plasmatica. Altre mutazioni presentano una frequenza compresa fra il 2 e il 5%, mentre alcune sono caratteristiche di particolari gruppi etnici.

DAL GENE ALLA MALATTIA

Stress ossidativo e Transglutaminasi tissutale

Nonostante la sopravvivenza sia notevolmente migliorata, l'evoluzione della malattia polmonare rappresenta ancora la principale causa di morbidità e mortalità in FC. Pertanto le terapie attuali, come l'antibioticoterapia per via sistemica e per aerosol, sono prevalentemente orientate a prevenire, quando possibile, e a trattare gli effetti se-

Tab. 1: Classificazione delle mutazioni in Fibrosi Cistica

Classe I	Difetto di sintesi della proteina CFTR
Classe II	Difetto di maturazione della proteina che non è in grado di raggiungere la membrana cellulare
Classe III	Difetto di regolazione: la proteina raggiunge la membrana, ma non è in grado di rispondere ai segnali di attivazione del canale del cloro
Classe IV	Normale sintesi della proteina CFTR, ma funzione ridotta
Classe V	Ridotta sintesi della proteina CFTR, ma funzione normale

condari alle ripetute infezioni respiratorie acute che caratterizzano i soggetti affetti da FC.

Negli ultimi anni numerosi studi *in vitro* e *in vivo* hanno correlato il deficit funzionale della proteina CFTR alla disregolazione della risposta infiammatoria.

Una infiammazione "costitutiva" caratterizza le vie respiratorie FC anche in assenza di infezioni batteriche. Il difetto funzionale di CFTR determina una condizione di stress ossidativo intracellulare che perturba l'omeostasi delle cellule epiteliali e predispone all'infiammazione (5). Gli aumentati livelli delle Specie Reattive all'Ossigeno (ROS) inducono modifiche post-traslazionali della Transglutaminasi Tissutale (TG2) (6), una proteina multifunzionale e con variegata localizzazione intracellulare che ha capacità di svolgere attività enzimatica di tipo transamidante in presenza di elevati livelli di calcio intracellulare o attività GTPasica o isomerasica a basse concentrazioni di calcio. Gli elevati livelli di ROS inducono aumento di una proteina ligasi (PIASy) che determina una modifica post-traslazionale (SUMOilazione) della TG2, che compete con la sua ubiquitinazione e conseguente degradazione proteasomica.

L'attività della TG2 permane stabilmente elevata e induce *cross-linking* di varie proteine-substrato. Fra queste figurano PPAR γ , una molecola con proprietà antiinfiammatorie, e I κ B α , il cui *cross-linking* consente la traslocazione nucleare di NF- κ B con conseguenti marcati effetti pro-infiammatori (6,7). Queste proteine, modificate da TG2, vanno incontro a ubiquitinazione e accumulano in aggregati intracellulari, denominati aggresomi. Gli aggresomi sono stazioni di deposito intracellulare di proteine da avviare a degradazione che, a causa di un sovraccarico del proteasoma, sono sequestrate negli aggresomi e successivamente trasportate ai lisosomi attraverso un meccanismo alternativo di degradazione, l'autofagia (8,9).

Pertanto, l'accumulo di aggresomi suggerisce, oltre ad un eccesso di formazione di proteine aggregate, anche un loro difettivo smaltimento attraverso l'autofagia.

DIFETTO DI AUTOFAGIA IN FC

Luciani *et al.* hanno fornito la prima dimostrazione che un difetto di autofagia caratterizza le cellule epiteliali FC (10). L'autofagia è un meccanismo di sopravvivenza che le cellule adottano in risposta a vari tipi di stress (8,9). È un processo fondamentale coinvolto nel *turnover* intracellulare di proteine aggregate e di organelli intra-

cellulari danneggiati attraverso il loro sequestro in vescicole a doppia membrana (autofagosomi) e successiva fusione con i lisosomi per la degradazione.

Una alterazione dell'autofagia è stata associata a varie patologie umane, fra cui malattie neurodegenerative, malattie infiammatorie, sindrome metabolica, tumori e invecchiamento (11,12,13). Recentemente, una alterazione dell'autofagia è stata descritta anche in patologie respiratorie quali enfisema, BPCO ed ipertensione polmonare (11,12,13).

La persistente attivazione della TG2 nelle cellule epiteliali FC induce "*cross-linking*" di Beclin 1, proteina cruciale nel processo di autofagia (8).

Il "*cross-linking*" di Beclin 1 spiazza dal reticolo endoplasmico (RE), sede di azione fisiologica, il complesso di proteine fondamentali per l'autofagia che interagiscono con Beclin 1 (Vps34, Vps15, AMBRA1 e ATG14) e lo sequestra in aggresomi (Figura 1A). Ciò porta ad inibizione della formazione degli autofagosomi, vescicole a doppia membrana che servono ad inglobare proteine danneggiate e organelli intracellulari, per poi fondersi con i lisosomi per la degradazione.

Il blocco dell'autofagia induce accumulo di p62/SQSTM1, una proteina legante ubiquitina, che induce un sovraccarico del proteasoma e favorisce la formazione degli aggresomi (10). Inoltre, è stato riportato che l'accumulo di p62 nei macrofagi di pazienti F508del omozigoti compromette la clearance batterica (*Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia*), un evento importante nell'evoluzione della malattia polmonare in FC (14).

RUOLO PATOGENETICO DEL DIFETTO DI AUTOFAGIA IN FC

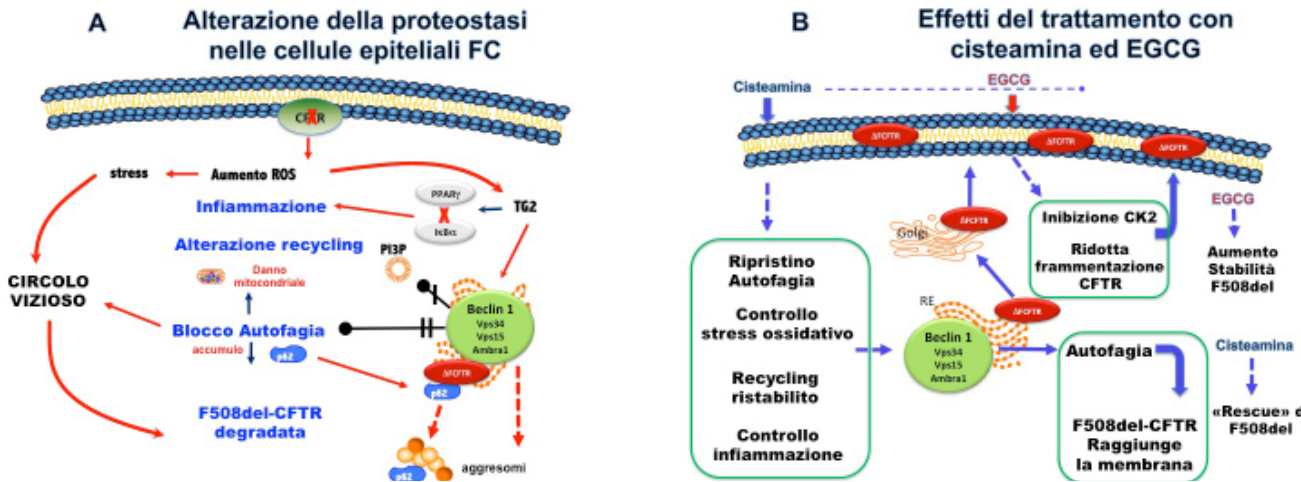
La rilevanza patogenetica di questo meccanismo, schematizzato in Figura 1, è evidenziata dal fatto che, ripristinando i livelli di Beclin 1 sia mediante over-espressione genica sia con molecole che inibiscono l'attività della TG2, quali la cistamina o la sua forma ridotta cisteamina, non solo si ripristina la risposta autofagica, ma si ottiene un efficace controllo della infiammazione polmonare *in vivo* in un modello murino omozigote per la F508del-CFTR.

L'autofagia è un processo fondamentale nel complesso meccanismo di risposta integrata allo stress (8). Il difetto di autofagia determina un circolo patogenetico vizioso che sostiene lo stress ossidativo e l'infiammazione. Dati sperimentali indicano che il ripristino dell'omeostasi cellulare ed il controllo dell'infiammazione conseguenti al trasferimento del gene CFTR *wild-type* in cellule FC sono abrogati se è impedito il concomitante recupero di una appropriata funzione autofagica (15,16). Allo stesso tempo, gli effetti benefici del ripristino dell'autofagia sull'infiammazione polmonare sono abrogati se si inibisce la funzione della CFTR. Queste evidenze sono fortemente suggestive di un ruolo cruciale del ripristino dell'autofagia nel recupero di funzione della CFTR e indicano che la stimolazione dell'autofagia migliora il fenotipo polmonare attraverso il ripristino della funzione della CFTR.

Fig. 1: L'Autofagia come bersaglio di terapie in FC.

A: Il difetto di Autofagia in FC. La difettiva funzione della CFTR induce un aumento di ROS con conseguente persistenza di elevati livelli di TG2. L'attivazione della TG2 induce cross-linking di Beclin 1, che viene spiazzata dal reticolo endoplasmico insieme alle proteine con cui interagisce (complesso PI3K III) e sequestrata negli aggresomi. Ciò determina blocco dell'autofagia, aumentati livelli di p62 e accumulo di proteine ubiquitinate in aggresomi. Questo processo sostiene un circolo vizioso che induce ulteriori incrementi di ROS e infiammazione. La F508del-CFTR, in parte degradata attraverso il proteasoma, accumula anche in aggresomi a causa del blocco di autofagia, con sovraccarico del proteasoma, e non può raggiungere il Golgi per essere glicosilata e trasportata in membrana.

B: Il ripristino della autofagia corregge il difetto funzionale della F508 del-CFTR. Il trattamento con cisteamina interrompe il circolo vizioso e favorisce una normale risposta autofagica. Conseguentemente, la F508del-CFTR traffica verso la membrana plasmatica ove permane per un periodo anche dopo sospensione del trattamento con cisteamina. L'aggiunta di epigallocatechina gallato inibisce la chinasi CK2, riducendo la frammentazione della CFTR, e aumenta la stabilità della proteina mutata in membrana, prolungando in tal modo gli effetti benefici della cisteamina per un periodo dopo la sua sospensione. A ciò consegue un prolungato controllo dell'infiammazione.



In accordo, dati *in vitro* e *in vivo* in modelli animali indicano che il recupero dei livelli fisiologici di Beclin 1 o il silenziamento genico di p62 non solo ristabiliscono la risposta autofagica, ma ripristinano il traffico intracellulare della F508 del-CFTR verso la membrana plasmatica delle cellule epiteliali respiratorie e la sua funzione (15, 16).

VECCHIE E NUOVE STRATEGIE PER LA CURA DELLA FC

Le terapie attuali in FC, come le terapie anti-infiammatorie, sono sintomatiche e agiscono a valle del difetto di base della malattia (5). La terapia genica, che dovrebbe essere il *gold standard* per la cura dei pazienti con FC, ha fornito risultati molto insoddisfacenti (17).

La terapia cellulare è ancora in fase di studio e non ci sono al momento risultati che consentano la trasferibilità al paziente. Recentemente, la conoscenza dei meccanismi attraverso cui le mutazioni del gene CFTR conducono alla funzione difettiva della proteina mutata ha aperto la strada alla terapia di riparazione del difetto di base (*CFTR repairing therapy*), che introduce il nuovo concetto di terapie specifiche per le diverse classi di mutazioni. Questa terapia si basa sull'uso di piccole molecole capaci di I) correggere il traffico intracellulare della proteina (correttori) o II) incrementare la funzione della CFTR mutata (potenziatori). La terapia con potenziatori mira ad aumentare la probabilità di apertura del canale ionico della proteina e, quindi, al recu-

pero della funzione di quei mutanti della CFTR capaci di raggiungere la membrana plasmatica delle cellule, ma incapaci di svolgere una normale funzione di canale ionico. Esempio di bersaglio della terapia con potenziatori della CFTR sono le mutazioni di classe III, che presentano un difetto di *gating* della proteina normalmente risiedente in membrana cellulare.

L'uso dei correttori è, al contrario, teoricamente indicato per mutanti con ripiegamento difettivo della proteina (*misfolding*), principalmente mutazioni di classe II, come la F508del, che, a causa del loro difetto conformazionale, rimangono intrappolati nel reticolo endoplasmico nel corso dei processi di *“folding”* e sono degradati dal proteasoma. Un ampio e costoso programma di: *“drug discovery”* in corso con approccio di *“highthroughput screening”*, mira a selezionare, fra milioni di molecole, quelle candidate a divenire potenziatori o correttori della CFTR per il trasferimento alla terapia. Una di queste molecole, il potenziatore VX-770 (Ivacaftor, Kalydeco, Vertex Co.) (18), si è rivelata efficace *in vivo* nel migliorare il trasporto di cloro e la funzione polmonare in pazienti con una rara mutazione di classe III, la G551D, presente in meno del 5% dei pazienti con FC, che codifica per una proteina capace di raggiungere la superficie cellulare ma che presenta un difetto della funzione di canale del cloro. Questa terapia è già disponibile sul mercato, seppure a costi molto elevati, in molti paesi europei ed americani.

Al contrario, i risultati dei *trials* clinici con *“correttori”* non hanno mostrato alcun beneficio cli-

nico nei pazienti con la più comune mutazione della CFTR, la delezione di fenilalanina in posizione 508 (F508del), presente nel 70% circa dei pazienti FC (2). Questa mutazione di Classe II codifica per una proteina che non riesce a essere completamente ripiegata ed è trattenuta nel RE dove è prematuramente degradata, non riuscendo quindi ad essere trasportata sulla membrana cellulare, sede di attività del canale ionico CFTR. La F508del-CFTR conserva la funzione di canale ionico, sia pur incompleta per un parziale difetto di "gating", quando è trasportata in membrana mediante manipolazioni sperimentali, come l'incubazione a basse temperature, o attraverso l'uso di molecole "chaperons" in grado di accompagnare la proteina attraverso il suo percorso difficoltoso all'interno della cellula. Fra queste molecole, il correttore VX-809 si è rivelato il più efficace nei sistemi *in vitro*, ma i risultati di un *trial* clinico in pazienti omozigoti per la F508del-CFTR sono stati insoddisfacenti (19), anche quando il VX-809 (Lumacaftor) è stato somministrato in associazione al potenziatore VX-770 (Ivacaftor) (20). La scarsa efficacia di questa combinazione terapeutica è motivata da studi recenti (21), che dimostrano come, una volta trasportata in membrana dai correttori, la F508del-CFTR è instabile ed è avviata verso la degradazione lisosomiale.

Questo secondo meccanismo di controllo di qualità non consente alla F508del-CFTR di risiedere in membrana anche dopo trattamento con correttori. Inoltre, recenti evidenze hanno dimostrato che il potenziatore VX-770 compromette la stabilità della F508del-CFTR dopo il suo arrivo in membrana (22). Queste evidenze, sperimentali e cliniche, suggeriscono la necessità di identificare molecole capaci non solo di favorire il traffico della F508del-CFTR verso la superficie cellulare, ma anche di stabilizzarla in membrana per poter ipotizzare un beneficio clinico nei pazienti.

AUTOFAGIA COME BERSAGLIO DI TERAPIE INNOVATIVE IN FC

Correggere il difetto della F508del-CFTR senza correttori e/o potenziatori

L'attuale strategia di *drug discovery* mediante "highthroughput screening" (approccio "top-down") si basa sulla ricerca di molecole che interagiscono con la proteina F508del-CFTR favorendone il traffico verso la membrana. Altre strategie, mirano alla ricerca di piccole molecole che modulano le proteine "chaperons" che interagiscono con la CFTR. Un approccio radicalmente diverso pone l'autofagia come bersaglio per la correzione del difetto di base in FC.

Questa strategia differisce dalle terapie con correttori in quanto: I) segue un percorso *bottom-up*, cioè parte dalla conoscenza delle alterazioni di vie di segnale intracellulare conseguenti alla difettiva funzione della CFTR; II) ha come bersaglio diretto non la CFTR mutata ma l'ambiente cellulare in cui questa è costretta a muoversi per raggiungere la membrana, correggendo le alterazioni della "proteostasi" nelle cellule FC.

Studi *in vitro* e *in vivo* in modelli animali, hanno dimostrato che il ripristino dell'autofagia favorisce sia il traffico della F508del-CFTR sia la sua stabilizzazione in membrana, ristabilendo una funzione sufficiente della CFTR senza l'ausilio di correttori o potenziatori della CFTR (10,16). Queste evidenze dimostrano che è sufficiente correggere le alterazioni dell'ambiente intracellulare delle cellule epiteliali FC, conseguenti al deficit di funzione della CFTR, per ripristinare il corretto traffico e la funzione della proteina mutata.

L'identificazione di molecole regolatrici della proteostasi, capaci di ripristinare una corretta autofagia in FC, ha aperto la strada a un percorso di ricerca traslazionale che, partendo da evidenze sperimentali *in vitro* su linee cellulari e *in vivo* su modelli murini di FC, ha condotto ad una sperimentazione clinica su pazienti FC omozigoti per la F508del-CFTR.

La cisteamina, in qualità di regolatore della proteostasi, diversamente dai noti correttori della CFTR precedentemente menzionati, non solo ripristina l'autofagia, ma consente il traffico intracellulare della F508del-CFTR, la stabilizza sulla membrana delle cellule epiteliali per oltre 24 h dopo la sua rimozione e riduce l'infiammazione polmonare dei topi omozigoti per F508del-CFTR anche dopo oltre una settimana di sospensione del trattamento. Infatti, il ripristino della autofagia riduce i livelli di p62 ed il conseguente avvio della CFTR alla degradazione lisosomiale e ripristina il "recycling" delle proteine di membrana, fra cui la CFTR.

Pertanto, la presenza della CFTR funzionante in membrana interrompe il circolo vizioso che porta all'autofagia e all'infiammazione (Figura 1B), e sostiene per un periodo dopo la sospensione del trattamento la sua stessa permanenza in membrana (15,16). La somministrazione orale di cisteamina nei topi F508del-CFTR omozigoti è risultata efficace nel ripristinare la funzione della CFTR, ridurre la mortalità per occlusione intestinale nelle prime settimane di vita dal 50% al 9% circa (23) e ridurre significativamente l'infiammazione polmonare nei topi adulti.

Quest'ultimo effetto della cisteamina si estende per oltre due settimane dopo la sospensione del trattamento, suggerendo che l'identificazione di sostanze capaci di prolungare gli effetti benefici della cisteamina dopo sospensione della terapia potrebbe essere di grande utilità per i pazienti e limitare gli eventuali effetti collaterali del farmaco. Studi recenti hanno dimostrato che l'associazione con un flavonoide contenuto nel tè verde, l'epigallocatechin gallato (EGCG), prolunga *in vitro* e *in vivo* gli effetti della cisteamina dopo la sospensione, inibendo la proteina chinasi CK2, maggiore responsabile dei processi di frammentazione della CFTR che favoriscono la sua instabilità (23).

Sebbene l'EGCG da solo non sia efficace come agente di recupero della F508del-CFTR, è in grado di prolungare gli effetti benefici della cisteamina sulle cellule e sui modelli animali (23).

Il trattamento combinato con cisteamina ed EGCG è stato validato e confermato su cellu-

le primarie prelevate mediante *brushing* nasale direttamente dal paziente omozigote per la F508del-CFTR prima del trattamento per valutare l'eventuale responsività alla terapia, nel contesto di una personalizzazione dell'approccio terapeutico (23).

Il prelievo di cellule epiteliali nasali mediante *brushing* è, infatti, una procedura semplice e ben tollerata e l'epitelio nasale rappresenta una finestra appropriata sul polmone in quanto riproduce le caratteristiche fenotipiche delle cellule bronchiali, principale sede di patologia in FC.

DAL LABORATORIO AL PAZIENTE

Recentemente, uno studio clinico in aperto di Fase II (23) ha testato gli effetti della combinazione di cisteamina ed EGCG in 10 pazienti con FC omozigoti per la mutazione F508del-CFTR. Entrambe le sostanze hanno già un noto profilo di tollerabilità.

La cisteamina (nome commerciale *Cystagon*) è un farmaco approvato dalla *Food and Drug Administration* per la terapia di pazienti con cistinosi, una rara malattia da accumulo lisosomiale, e l'EGCG (nome commerciale *Epinerve*) è utilizzato come integratore alimentare.

Lo studio clinico ha raggiunto gli obiettivi primari evidenziando un recupero della funzione della CFTR sia a livello respiratorio, valutata

mediante analisi dell'efflusso di cloro in cellule prelevate a fresco da *brushing* nasale prima e dopo trattamento, sia attraverso la misurazione dei livelli di cloro nel sudore, test ancora utilizzato per la diagnosi di FC. Il trattamento ha determinato un aumento dell'efflusso ionico nell'epitelio nasale con valori pari a oltre il 25% dei controlli sani ed una riduzione del cloro nel sudore di oltre il 20% rispetto al valore basale con valori pari o al di sotto di 60 mmol/L in 7 pazienti, e ha indotto una drammatica riduzione dei livelli di citochine pro-infiammatorie, sia a livello nasale sia nell'espettorato dei pazienti.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

I recenti progressi della ricerca nella terapia della FC indicano che: I) ristabilire l'autofagia attraverso regolatori di proteostasi rappresenta una strategia alternativa promettente, da confermare in studi clinici multicentrici controllati; II) indirizzare la ricerca verso l'identificazione di molecole/farmaci già in uso in altre patologie umane o sostanze presenti in natura, con profilo di sicurezza noto, costituisce un approccio sostenibile in termini di costi e di trasferibilità clinica, sia per il paziente sia per il sistema sanitario; III) individuare appropriati *test* di predittività di efficacia sul singolo paziente può aprire la strada ad un percorso di medicina personalizzata.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kerem B, Rommens J.M, Buchanan JA, et al. *Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis*. Science 1989; 245: 1073-1080.
- (2) Farrell PM. *The prevalence of cystic fibrosis in the European Union*. J Cyst Fibros 2008; 7: 450-453.
- (3) O'Sullivan BP, Freedman SD. *Cystic fibrosis*. Lancet 2009; 373: 1891-1904.
- (4) Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, et al. *Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations*. Eur J Hum Genet 2009; 17: 51-65.
- (5) Belcher CN, Vij N. *Protein processing and inflammatory signaling in Cystic Fibrosis: challenges and therapeutic strategies*. Curr Mol Med 2010; 10: 82-94.
- (6) Maiuri L, Luciani A, Giardino I, et al. *Tissue transglutaminase activation modulates inflammation in cystic fibrosis via PPARgamma down-regulation*. J Immunol 2008; 180: 7697-7705.
- (7) Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, et al. *SUMOylation of tissue transglutaminase as link between oxidative stress and inflammation*. J Immunol 2009; 183: 2775-2784.
- (8) Kroemer G, Mariño G, Levine B. *Autophagy and the integrated stress response*. Mol Cell 2010; 40: 280-293.
- (9) Mizushima N, Komatsu M. *Autophagy:renovation of cells and tissues*. Cell 2011; 147: 728-741.
- (10) Luciani A, Vilella VR, Esposito S, et al. *Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition*. Nat Cell Biol 2010; 12: 863-875.
- (11) Wong E, Cuervo AM. *Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases*. Nat Neurosci 2010; 13: 805-811.
- (12) Choi AM, Ryter SW, Levine B. *Autophagy in human health and disease*. N Engl J Med 2013; 368: 651-662.
- (13) Ryter SW, Nakahira K, Haspel JA. *Autophagy in Pulmonary Diseases*. Annu Rev Physiol 2012; 74: 377-401.
- (14) Abdulrahman BA, Khweek AA, Akhter A, et al. *Depletion of the ubiquitin-binding adaptor molecule SQSTM1/p62 from macrophages harboring cfr ΔF508 mutation improves the delivery of Burkholderia cenocepacia to the autophagic machinery*. J Biol Chem 2013; 288: 2049-2058.
- (15) Vilella VR, Esposito S, Bruscia EM, et al. *Disease-relevant proteostasis regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Cell Death Diff 2013; 20: 1101-1015.
- (16) Luciani A, Vilella VR, Esposito S, et al. *Targeting autophagy as a novel strategy for facilitating the therapeutic action of potentiators on ΔF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Autophagy 2012; 8: 1657-1672.
- (17) Amaral MD. *Targeting CFTR: how to treat cystic fibrosis by CFTR-repairing therapies*. Curr Drug Targets 2011; 12: 683-693.
- (18) Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, et al. *A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation*. N Engl J Med 2011; 365: 1663-1672.
- (19) Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, et al. *Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation*. Thorax 2012; 67: 12-18.
- (20) Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, et al. *A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial*. Lancet Respir Med 2014; 7: 527-538.
- (21) Okiyoneda T, Barriere H, Bagdany M, et al. *Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane*. Science 2010; 329: 805-810.
- (22) Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, et al. *Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of ΔF508 CFTR in cystic fibrosis*. Sci Transl Med 2014; 6: 246.
- (23) De Stefano D, Vilella V.R, Esposito S, et al. *Restoration of CFTR function in patients with cystic fibrosis carrying the F508del-CFTR mutation*. Autophagy 2014; 10: 2053-2074.