

Report Sessione 2: I Progetti scientifici supportati da Parent Project

La seconda sessione scientifica della XIX edizione della Conferenza Internazionale sulla distrofia muscolare di Duchenne e Becker si è tenuta la mattina di sabato 19 febbraio (al seguente [link](#) la diretta). Si tratta di una sessione sui progetti scientifici finanziati da Parent Project aps articolata in cinque interventi

Contrastare l'infiammazione nella DMD promuovendo la polarizzazione dei macrofagi pro-rigenerativi attraverso un approccio metabolico - Elisabetta Ferraro, Università di Pisa

I macrofagi sono cellule del sistema immunitario e il loro ruolo è estremamente importante durante la rigenerazione muscolare. In condizioni sane i macrofagi organizzano una risposta infiammatoria transitoria che inizia con la predominanza di macrofagi pro-infiammatori (M1) che vengono sostituiti da macrofagi antinfiammatori (M2). Viceversa, nella DMD, il processo rigenerativo viene continuamente messo in moto con una presenza quasi costante di macrofagi pro-infiammatori nel muscolo che risulta deleteria fino a contribuire alla riduzione della capacità rigenerativa muscolare. Le due popolazioni di macrofagi ottengono l'energia necessaria a sostenere le loro attività attraverso processi metabolici diversi e l'idea del gruppo di ricerca della dottoressa Ferraro è stata quindi quella di stimolare il processo metabolico usato dai macrofagi antinfiammatori per forzare la loro presenza e combattere l'infiammazione. Sono state utilizzate cinque molecole (riboflavina/vitamina B2, idebenone, ranolazina, trimetazidina e mildronato) ed è stata studiata la risposta dei macrofagi nel modello di topo Duchenne (topo mdx) a queste molecole dopo l'induzione di uno stimolo pro-infiammatorio. Tra le molecole che hanno indotto in vitro una risposta antiinfiammatoria (riboflavina, idebenone e ranolazina), la riboflavina e l'idebenone sono state testate anche in vivo utilizzando il topo mdx mediante un trattamento a breve e uno a lungo termine. Il trattamento a breve termine è consistito in un mese di somministrazioni giornaliere (a partire da 2 mesi fino ai 3 mesi di età dei topi), mentre quello a lungo termine è consistito nel trattamento breve addizionato di cicli intermittenti (ogni due mesi) di due settimane di somministrazione fino all'età di 9 mesi. Dopo il trattamento con riboflavina, il numero di fibre muscolari è aumentato con una riduzione della fibrosi, dell'espressione del collagene e dell'infiltrato infiammatorio. La funzionalità muscolare ha mostrato una tendenza al miglioramento. Le differenze tra il trattamento a breve e quello a lungo termine sono state: l'aumento dei marcatori antinfiammatori, la riduzione delle fibre necrotiche e un maggiore e significativo incremento della funzionalità muscolare. Il trattamento a breve termine con idebenone non ha mostrato differenze significative. Tuttavia, il trattamento a lungo termine con idebenone ha mostrato più fibre muscolari ma di meno rispetto alla riboflavina; non è stato possibile osservare una riduzione significativa delle fibre necrotiche. Questi esperimenti in vivo giustificano ottimismo circa l'uso di queste molecole importanti per il metabolismo nella DMD. È importante sottolineare il fatto che alcuni di questi farmaci sono già stati approvati dall'EMA (Agenzia Europea per i Medicinali) per l'uso nell'uomo in altre patologie, il che rende il loro potenziale utilizzo nella DMD molto più rapido rispetto a farmaci nuovi visto che molte fasi della sperimentazione clinica, soprattutto relative alla tossicità nell'essere umano, sono già state realizzate.

Un nuovo approccio epigenetico per migliorare l'omeostasi muscolare nella distrofia di Duchenne - Giuseppina Caretti, Università di Milano

La professoressa Giuseppina Caretti lavora presso il Dipartimento di Bioscienze dell'Università degli Studi di Milano e studia il ruolo dell'epigenetica per migliorare l'omeostasi muscolare nella distrofia muscolare di Duchenne. L'identificazione di nuovi bersagli molecolari coinvolti nella progressione della patologia è importante per individuare nuovi trattamenti e terapie efficaci. BRD4 è una molecola che modula l'attivazione di molti geni in vari tessuti. Diverse molecole che bloccano l'azione di BRD4 sono attualmente studiate in trial clinici per diverse patologie neoplastiche. In uno studio precedente, il gruppo della Professoressa Caretti ha mostrato come uno degli inibitori per la proteina BRD4, JQ1, sia in grado di prevenire l'atrofia muscolare e di ridurre i livelli di infiammazione in un modello animale in cui l'atrofia muscolare è indotta dalla presenza di tumore. A partire da questi dati e dall'osservazione che i livelli di BRD4 aumentano nei muscoli di pazienti DMD e in muscoli del modello mdx, il team ha deciso di studiare il ruolo di BRD4 nel muscolo distrofico e di valutare l'effetto del trattamento con JQ1 sulla fisiopatologia del muscolo mdx. Il gruppo della professoressa Caretti ha eseguito un trattamento con JQ1 per due settimane su un modello animale per determinare gli effetti dell'inibitore nella DMD. A livello cellulare e tissutale, l'inibitore penetra molto bene nei nuclei delle cellule muscolari, riducendo i cicli di rigenerazione e gli infiltrati infiammatori. Inoltre, i topi trattati con l'inibitore si sono comportati meglio sul tapis roulant e anche in altre valutazioni della funzionalità motoria, della forza e della coordinazione. Questo effetto è stato mantenuto per almeno tre settimane dopo l'interruzione del trattamento. Il motivo per il quale questo meccanismo funzionerebbe a livello molecolare è perché nella DMD i muscoli subiscono un forte stress ossidativo che contribuisce a generare molti dei problemi associati alla patologia, come la degenerazione e il danno cellulare. Lo stress ossidativo è associato alla produzione di superossido (O_2^-), prodotto da un enzima (NADPH ossidasi). Dopo il trattamento con JQ1, i ricercatori hanno osservato una riduzione dello stress ossidativo nelle cellule muscolari e evidenziato che tale riduzione è dovuta alla capacità di JQ1 di ridurre i livelli di NADPH ossidasi presenti. I ricercatori hanno quindi concluso che nel topo JQ1 riduce lo stress ossidativo nei muscoli e migliora la fisiopatologia della distrofia muscolare.

Studio pilota sull'inibizione farmacologica di Nfix come nuova terapia per la Distrofia Muscolare di Duchenne - Graziella Messina, Università degli Studi di Milano

La Professoressa Graziella Messina lavora all'Università degli Studi di Milano. Durante la Conferenza ha parlato dello studio pilota sull'inibizione del fattore di trascrizione Nfix (Nuclear Factor One) mediata da farmaci come nuova terapia per la DMD. Il progetto di ricerca propone un principio innovativo rispetto alla strategia di aumento della rigenerazione. L'idea del team di ricerca è stata infatti quella di non aumentare, bensì di rallentare la rigenerazione muscolare, recuperando alcuni studi che avevano già evidenziato come le fibre muscolari che si contraggono lentamente (fibre lente) fossero quelle che degeneravano più tardi nei pazienti. Il muscolo distrofico è infatti un tessuto strutturalmente fragile e, forzarlo a rigenerarsi e quindi a lavorare di più, potrebbe portare, paradossalmente, a un aggravamento del fenotipo. L'assenza di Nfix rallenta la rigenerazione e converte tutte le fibre muscolari in fibre a contrazione lenta. Nei modelli animali distrofici, infatti, l'assenza di Nfix rallenta la rigenerazione muscolare e induce complessivamente un miglioramento morfologico e funzionale del muscolo distrofico. Avendo inoltre caratterizzato i processi molecolari che controllano l'espressione di Nfix, l'obiettivo del gruppo di ricerca è stato quello di testare un approccio farmacologico basato su diversi composti per valutarne la capacità di inibizione di Nfix e l'effetto preliminare sul fenotipo distrofico. In dettaglio, i ricercatori hanno studiato l'effetto di una molecola (l'inibitore Trametinib

MEK - già clinicamente approvato nei pazienti oncologici) come potenziale trattamento per inibire l'attività di Nfix e i conseguenti effetti. Il gruppo di ricerca ha osservato innanzitutto l'assenza di effetti collaterali sui topi trattati, una riduzione di Nfix, ma, inaspettatamente, il trattamento con trametibina ha evidenziato la presenza di tessuto calcificato soprattutto a dosi elevate. Lo studio non è ancora terminato per un rallentamento causato dalla pandemia e il gruppo della Professoressa Messina continuerà a studiare gli effetti del trattamento con trametibina soprattutto in topi più giovani quando ancora sono pre-sintomatici.

La variabilità fenotipica nella Distrofia Muscolare di Becker: proposta di un protocollo di caratterizzazione clinica e molecolare per stratificare i pazienti nella preparazione dei trial - Gabriele Siciliano, Università di Pisa

Il Professor Gabriele Siciliano è Direttore di Neurologia dell'Ospedale Santa Chiara e coordinatore di un gruppo di ricerca nell'area delle malattie neurodegenerative con particolare focus sulle disfunzioni neuromuscolari. Nel suo intervento, il professor Gabriele Siciliano ha iniziato evidenziando la mancanza di studi sullo sviluppo della Distrofia Muscolare di Becker e la necessità di applicare metodi di valutazione clinica e strumentale per comprendere al meglio questa patologia. Pertanto, ha condotto uno studio di valutazione su 32 pazienti adulti con BMD (21-70 anni) con un'ampia variabilità clinica. Il campione comprendeva pazienti completamente asintomatici e pazienti che, intorno ai 25-30 anni, avevano già perso la deambulazione. In termini di correlazione tra genotipo (ovvero il complesso delle caratteristiche ereditarie di un individuo) e fenotipo (ovvero il complesso delle caratteristiche che un organismo manifesta), i pazienti con delezioni che iniziano nell'esone 45 hanno mostrato una perdita delle *performance* muscolari da moderate a gravi, mentre nei pazienti con delezione dell'esone 48 si sono osservati sintomi più lievi. I muscoli più colpiti dalla BMD sono: il quadricipite, il bicipite femorale, i muscoli dei glutei e gli adduttori della coscia e, nei pazienti non deambulanti gravemente colpiti, anche gli arti superiori risultano gravemente colpiti. Anche le caratteristiche cardiologiche differivano tra i pazienti. A parte il paziente con la delezione dell'esone 45-48, il follow-up clinico a 24 mesi ha mostrato che, fortunatamente, questa patologia è relativamente stabile. In conclusione, esiste un'elevata variabilità clinica tra i pazienti con BMD. Pertanto, il professor Gabriele Siciliano sta attualmente collaborando allo sviluppo di una piattaforma informatica per raccogliere diversi tipi di dati clinici sulla BMD per identificare variabili comuni.

La Cardiomiopatia nelle distrofinopatie: caratterizzazione e progressione - Rachele Adorisio, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma

La cardiomiopatia è la prima causa di mortalità e morbilità nella DMD e nella BMD, inizia con una fibrosi impercettibile con elettrocardiogramma (ECG) che si va evolvendo, instaurando una sostituzione fibrotica che porta a una progressiva disfunzione e dilatazione del ventricolo sinistro fino allo scompenso cardiaco allo stadio terminale. Gli obiettivi dello studio sono: identificare le caratteristiche del ventricolo sinistro prima dell'inizio dell'atrofia (riduzione tessuto muscolare), correlare questi dati con i cambiamenti dell'ECG e identificare i *marker* della progressione della cardiomiopatia. Si tratta di uno studio sviluppato in un centro con pazienti di età inferiore a 10 anni con dimensioni normali del ventricolo sinistro e frazione di eiezione. Le valutazioni eseguite sono iniziate un anno prima di iniziare il trattamento con gli ACE-inibitori (farmaci generalmente usati per ridurre la pressione del sangue e proteggere la funzione del cuore). Con l'ecocardiografia è stato rilevato il rimodellamento del ventricolo sinistro che include la riduzione della massa muscolare correlata all'età e alla pressione sistolica. Sono stati reclutati 45 pazienti con un'età

media di 10.3 (± 2.9) anni e un'età media di inizio del trattamento con ACE inibitori di 11.2 (± 2.9) anni. Il 72% dei pazienti presentava un quadro di atrofia cardiaca alla prima valutazione cardiologica sotto i dieci anni (quindi prima dell'inizio della terapia con ACE inibitori). All'ultimo follow up, dopo 35.5 \pm 7.7 mesi, nove pazienti hanno sviluppato un'atrofia cardiaca molto più tardivamente e sei pazienti hanno registrato una regressione. Tutti i pazienti sono stati trattati con ACE inibitori e specificamente con enalapril (48%), ramipril (26%), perindopril (17%) e altri (9%). Dopo un anno di trattamento con ACE-inibitori, la percentuale di pazienti con atrofia cardiaca è rimasta invariata. Questi dati suggeriscono che l'atrofia cardiaca è presente prima dei dieci anni di età e che la terapia con ACE-inibitori potrebbe rallentare lo sviluppo dell'atrofia miocardica non riuscendo, tuttavia, a invertirla.

A cura dell'Ufficio Scientifico di Parent Project aps e delle dottorande del progetto europeo Renoir - Filipa Timoteo Ferreira, Cristina Rodríguez Gutiérrez, Emilia Skafida e Sarah Willems (<https://renoir-itn.eu/>)