

La **prima sessione scientifica della XIX edizione della Conferenza Internazionale sulla distrofia muscolare di Duchenne e Becker** si è tenuta nel pomeriggio di venerdì 18 febbraio (al seguente [link](#) la diretta). Si tratta di una sessione che ci apre alle prospettive future della patologia, dal titolo **“Uno sguardo all’orizzonte nel panorama della ricerca per la DMD/BMD”**, articolato in quattro interventi.

Il primo intervento è stato quello del Prof. **Charles Gersbach**, professore di Ingegneria biomedica alla Duke’s University, che ci ha parlato di **editing genomico nella distrofia muscolare di Duchenne**. L’editing genomico è una tecnologia trasformativa in grado di modificare in maniera permanente determinate sequenze geniche del DNA. Come ci ha spiegato il Prof. Gersbach, la modifica può avvenire tramite l’aggiunta, la rimozione o l’alterazione di materiale genetico in differenti posizioni del genoma. L’obiettivo del suo gruppo è di impiegare questa strategia per correggere il gene della distrofina agendo nella sua naturale posizione sul cromosoma.

Dal momento che la maggior parte delle mutazioni nella distrofia muscolare di Duchenne sono delezioni, e che una delle caratteristiche dell’editing genomico è che la rimozione di sequenze di DNA è più facile della loro inserzione, il primo approccio esplorato è stato quello di rimuovere determinati esoni del gene. Si va, in tal modo, a mimare la strategia di exon skipping, ma rendendola permanente con una singola infusione. Il lavoro del gruppo si è focalizzato principalmente sulla delezione dell’esone 23 sui topi modello della Duchenne (topi mdx), impiegando dei vettori virali adeno-associati (AAV) contenenti il sistema CRISPR per correggere il gene difettoso. Dopo 8 settimane hanno osservato che circa il 70% delle fibre erano in grado di esprimere un po’ di proteina distrofina, in associazione a un aumento della capacità di generare forza o di resistere alla fatica. Tuttavia questo approccio non consente di poter ottenere una proteina pienamente funzionale.

Per avvicinarsi a questo obiettivo, Gersbach e i suoi collaboratori hanno generato un modello di topo contenente il gene umano della distrofina a cui è stato rimosso l’esone 52. Hanno poi impiegato un sistema CRISPR/Cas9 in grado di tagliare questa sequenza in prossimità della delezione e al tempo stesso di fornire e inserire l’esone 52, riottenendo in tal modo la proteina di lunghezza intera. L’efficienza di questo approccio si è rivelata ancora troppo bassa e inoltre sarebbe applicabile solo per quei pazienti con questa precisa delezione. Per questo hanno sviluppato la strategia del super-esone, in cui viene inserita l’intera sequenza di esoni che va dal 52 al 79, ottenendo in tal modo un’inserzione che porta a una proteina di lunghezza intera. Questo approccio si applicherebbe a tutti i pazienti con una mutazione a valle dell’esone 51, che corrisponde a oltre il 20% dei pazienti DMD. Confrontando inoltre i due approcci, la strategia del super-esone mostra maggiori livelli di espressione di distrofina e minori livelli di creatina chinasi sierica rispetto all’inserzione del solo esone 52 nei topi. Attualmente stanno lavorando per aumentare la specificità, la precisione, la tollerabilità e l’efficacia della strategia.

A seguire c’è stato l’intervento di **Francesco Saverio Tedesco**, professore di Biologia neuromuscolare e medicina rigenerativa presso lo University College di Londra, che ha parlato di **nuovi modelli umani di malattie muscolari per studiare le distrofie muscolari e testare terapie**. Il lavoro presentato dal Prof. Tedesco si è focalizzato su nuovi modelli di muscolo scheletrico prodotti in laboratorio (cosiddetti modelli *in vitro*) in grado di mimare il muscolo umano e le patologie muscolari. Gli stessi modelli possono essere impiegati per comprendere meglio la patologia e/o per testare nuove terapie limitando l’impiego di animali nella ricerca. Il suo gruppo di ricerca utilizza cellule staminali pluripotenti indotte (cellule iPS) che possono essere isolate dal paziente stesso. Con l’aggiunta del giusto “cocktail” sperimentale, queste cellule possono diventare cellule muscolari, che sarebbero peraltro specifiche del paziente.

Nella sua presentazione il Prof. Tedesco ha presentato un modello per le laminopatie, che è una categoria di patologie caratterizzate da alterazioni nella proteina Lamina A. I ricercatori hanno creato in laboratorio un modello tridimensionale per questo tipo di miopatie che hanno usato per testare alcune terapie tra cui

delle strategie di exon-skipping. La piattaforma da loro sviluppata può essere estesa ad altre patologie, come ad esempio la distrofia muscolare di Duchenne, e può portare a un minore utilizzo di animali nella ricerca in questo campo e ad una migliore comprensione della patologia e della risposta a determinate terapie.

Il terzo intervento è stato condotto dalla dott.ssa **Dott.ssa Martina Sandonà**, ricercatrice della Fondazione Santa Lucia di Roma, che ci ha parlato del **Trattamento farmacologico con gli HDACi per correggere la comunicazione tra le cellule FAPs e le cellule staminali del muscolo e contrastare la patologia**. Durante la sua presentazione ci ha parlato del suo lavoro recentemente pubblicato sul come il trattamento con gli inibitori delle istone-deacetilasi (HDACi) sia in grado di ripristinare la comunicazione tra i progenitori fibroadipogenici (FAP) e le cellule satelliti nel contesto della Duchenne.

I FAP sono una popolazione di cellule mesenchimali residenti nel muscolo che, in seguito al danno muscolare, si attivano per supportare il processo di riparazione (potenziale miogenico), ma sono anche responsabili della deposizione di tessuto fibrotico (potenziale fibroadipogenico). Studi precedenti avevano messo in evidenza che gli HDACi esercitano effetti benefici sulla progressione della patologia nel topo modello della DMD (topo mdx), in quanto aumentano la rigenerazione muscolare e riducono la fibrosi tissutale e l'infiammazione. È stato dimostrato che questo trattamento va a colpire proprio i FAP, andando a ridurre il potenziale fibroadipogenico e ad aumentare quello miogenico.

Nel suo lavoro, la Dott.ssa Sandonà ha dimostrato che la comunicazione tra questi tipi cellulari è mediata da vescicole extracellulari (EV), che sono particelle che vengono normalmente rilasciate da quasi tutti i tipi di cellule e che contengono diverse molecole come proteine e molecole di RNA o microRNA. I suoi studi hanno dimostrato che l'inibizione delle istone-deacetilasi modifica completamente il contenuto di microRNA trasportato dalle vescicole extracellulari secrete dalle FAP, donando a queste ultime proprietà anti-infiammatorie e pro-rigenerative. In particolare, è stato visto che livelli aumentati di un microRNA specifico muscolare, denominato miR-206, sono in grado di promuovere la proliferazione, l'attivazione e la differenziazione delle cellule satelliti. In conclusione, una corretta composizione delle vescicole extracellulari è in grado di mediare gli effetti benefici degli HDACi contrastando il declino del muscolo distrofico. Pertanto, dal punto di vista traslazionale, questo lavoro suggerisce l'impiego di EV come potenziale trattamento contro la Duchenne.

L'ultimo intervento della sessione è stato a cura del **Prof. Guglielmo Sorci e della Dott.ssa Sara Chiappalupi** del dipartimento di Medicina sperimentale dell'Università di Perugia, che ci hanno parlato del loro progetto sulle **Cellule di Sertoli microincapsulate nella distrofia muscolare di Duchenne**, presentandone le potenzialità per un'applicazione sui pazienti.

Durante la presentazione è stato spiegato che le cellule del Sertoli sono le cellule più abbondanti dei tubuli seminiferi dei testicoli. Tra le loro varie funzioni, sono anche responsabili della secrezione di fattori immunomodulatori che permettono la protezione e lo sviluppo delle cellule germinali. Per via delle loro proprietà, le cellule del Sertoli sono state impiegate come trattamento terapeutico sperimentale in modelli animali per diverse patologie tra cui patologie neurodegenerative e diabete. Nel lavoro portato avanti dal Prof Sorci e dalla Dott.ssa Chiappalupi, le cellule del Sertoli porcine, microincapsulate con una procedura brevettata, sono stata iniettate nella cavità peritoneale in topi distrofici di quattro settimane. Dopo un singolo inoculo, è stata osservata una significativa riduzione di infiammazione e fibrosi nei muscoli, che ha contribuito a un generale miglioramento della performance muscolare. Il trattamento induce anche un aumento dei livelli di espressione della proteina utrofina. La sicurezza di questo trattamento è stata inoltre valutata, soprattutto rispetto ai fattori immunomodulatori rilasciati, per capire se questi possono suscitare

una risposta immunosoppressoria, con eventuale aumento di infezioni e sviluppo tumorale. È stato visto che nei topi trattati non si sono verificati né una inibizione della risposta immunitaria, né lo sviluppo di tumori. Al contrario, i topi trattati con queste cellule hanno mostrato una risposta alle infezioni più rapida, una riduzione nelle metastasi e un rallentamento nella perdita di peso corporeo e nell'atrofia muscolare indotti da tumore. In conclusione, le cellule del Sertoli microincapsulate si comportano come un sistema in grado di produrre una serie di fattori antiinfiammatori e trofici che vengono rilasciati in circolo e sono pertanto in grado di raggiungere tutti i muscoli. Il sistema ha il vantaggio di essere un approccio universale, indipendente dal tipo di mutazione e che non necessita una immunosoppressione farmacologica, proprio per l'attività immunomodulatoria insita nelle cellule stesse. Fermamente convinto della validità del proprio approccio, il gruppo guidato dal Prof Sorci sta portando avanti tutti gli step necessari per favorire il passaggio dai modelli preclinici all'uomo.

*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/>)*