

## Distrofia Muscolare Duchenne: Approcci nella ricerca di una terapia.

Questa relazione è stata scritta per quelle famiglie che hanno uno o più figli maschi malati di distrofia muscolare Duchenne. Essa cerca di spiegare a queste famiglie in maniera comprensibile alcuni fondamenti scientifici e i numerosi metodi con i quali la ricerca internazionale tenta di trovare una terapia causale, cioè una terapia *scientificamente fondata*, e quindi efficace, della malattia. Le prime edizioni di questa relazione riassumevano soprattutto i dati più importanti risultanti da rapporti e discussioni tenutisi durante la conferenza internazionale dei *National Institutes of Health* nel maggio 2000 a Bethesda vicino a Washington. **Questa nuova versione della relazione è stata scritta nell'aprile 2002** utilizzando informazioni recenti provenienti dalla letteratura e dalla corrispondenza con molti dei ricercatori qui menzionati. I nomi fra parentesi si riferiscono agli scienziati più importanti e il loro indirizzo abbreviato è riportato alla fine di questa testo. Poiché la ricerca procede avvalendosi del lavoro di gruppo, si sarebbero dovuti menzionare molti più ricercatori di quello che si è fatto, ma purtroppo, per ragioni di spazio, ciò non è stato possibile.

**I Geni e la loro funzione:** I geni sono le unità funzionali del materiale genetico nei cromosomi nel nucleo di ogni cellula. Questo materiale è chiamato acido desossiribonucleico, DNA, la sua struttura assomiglia ad una scala arrotolata su se stessa, definita come una doppia elica. Le due strutture portanti della scala sono lunghe catene composte da acido fosforico e desossiribosio, un tipo di zucchero. I pioli della scala sono costituiti da quattro diverse sostanze chimiche, le basi: adenina, guanina, timina e citosina (abbreviate A, G, T, C), due delle quali sono sempre contrapposte una all'altra. Per ragioni di spazio i pioli possono contenere solo le coppie A-T e G-C. Se le sequenze di queste coppie di basi o lettere genetiche su un piolo sono ad esempio:

---AGGCTTAATCGT---

la sequenza sul piolo opposto dovrà essere:

---TCCGAATTAGCA---

I due pioli sono quindi complementari uno all'altro. L'unità dell'informazione genetica, una lettera genetica, è un nucleotide, una delle basi attaccate ad un desossiribosio che è collegata anche con un gruppo di acido fosforico. Ognuna dei 100.000 milioni di cellule umane contiene nel suo nucleo più di 6.000 milioni di lettere genetiche, raggruppate in circa 35.000 geni. Quasi

tutti i dettagli delle sequenze di queste lettere sono ora noti. E' l'informazione genetica di un essere umano ed essa è trasmessa da una generazione all'altra con variazioni minime o mutazioni che, quando si verificano, possono avere conseguenze negative, ma che sono state necessarie per l'evoluzione della vita e di tutti gli esseri viventi.

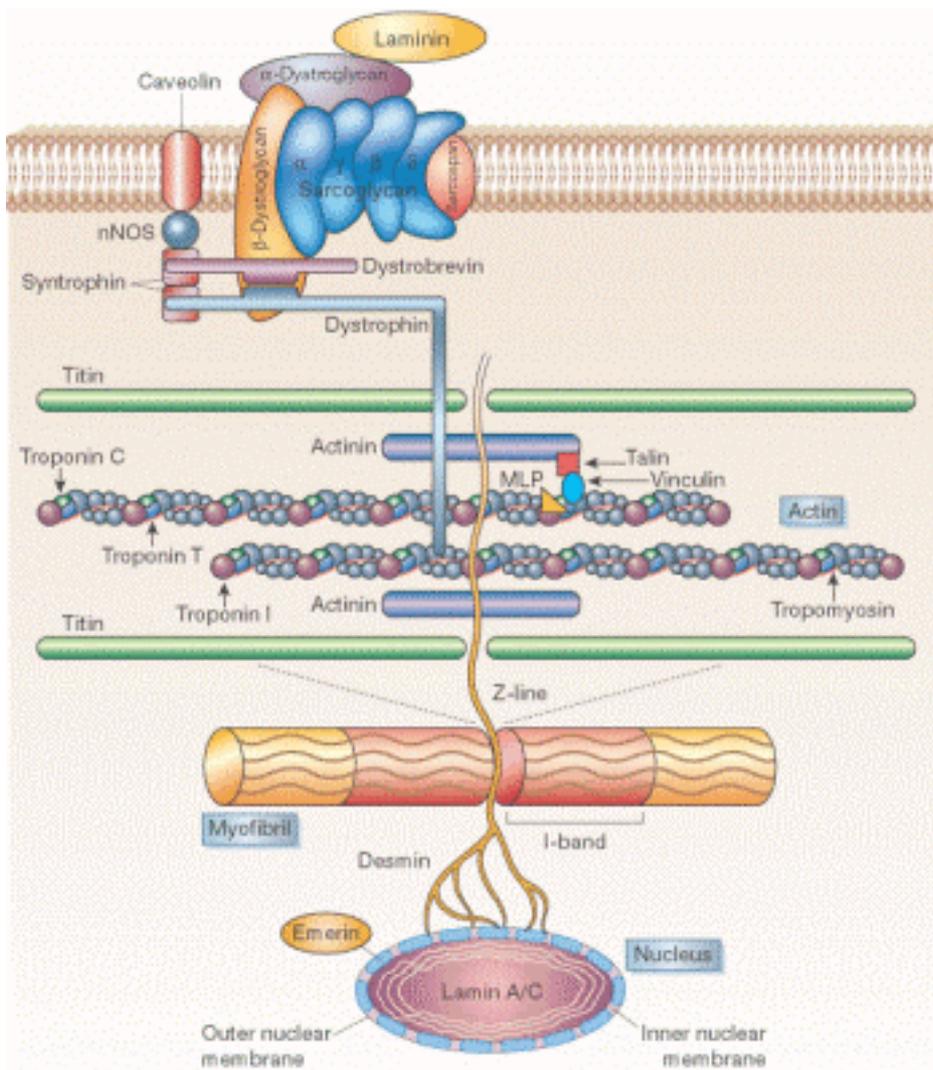
La maggior parte dei geni trasporta l'informazione per la costruzione di una o più proteine, che consiste di sequenze di aminoacidi, i mattoni da cui sono costituite, dei quali esistono almeno 20 tipi differenti. La sequenza di aminoacidi è importante per la funzione delle proteine come ad esempio gli enzimi, i catalizzatori delle reazioni chimiche, o come controllori di altri geni o come materiale strutturale. Nel nucleo della cellula, in cui si trovano i cromosomi, l'informazione genetica è copiata o trascritta in un'altra sostanza genetica strutturalmente simile, l'acido ribonucleico pre-messaggero, pre-mRNA. I geni degli organismi multicellulari sono costituiti da sezioni attive, esoni, ed inattive, introni. Dopo la trascrizione, gli introni, che sono spesso molto più lunghi degli esoni, sono rimossi dal pre-mRNA, e gli esoni trascritti vengono riassemblati per formare l'RNA messaggero, m-RNA, che viene quindi trasferito nei ribosomi, le strutture che sintetizzano le proteine nel citoplasma delle cellule. L'RNA utilizza la base U, Uracile, invece della base simile T del DNA. Nell'm-RNA, tre lettere genetiche consecutive significano sempre uno dei 20 differenti aminoacidi in accordo con una sorta di dizionario genetico, il codice genetico. Quindi, la scrittura genetica utilizza solo 4 lettere, e le sue parole, i codons, sono sempre lunghi tre lettere, chiamate triplette. Non ci sono spazi tra le parole, ed esistono tre differenti stop codons, UAA, UAG, ed UGA, che avvertono che la sintesi della proteina è terminata. Nei ribosomi, RNA ad azione catalitica, ribozimi, usano l'informazione genetica dell'mRNA per costruire specifiche proteine a partire dagli aminoacidi che sono trasportati ai ribosomi da un altro tipo di RNA, l'RNA transfer o tRNA.

**Il gene della distrofina e la proteina:** La distrofia muscolare Duchenne è uno dei più frequenti disordini ereditari nell'uomo e nei mammiferi. Circa un bambino su 3500, indipendentemente dalla razza e dalla posizione geografica, nasce con questa malattia, che è provocata da una mutazione o da un danno del gene della distrofina. Il gene della distrofina è stato identificato nel 1986 sul braccio corto del cromosoma X (*Kunkel*, Boston) e la sua struttura è stata chiarita

poco dopo. Con 2,6 milioni di basi, esso è uno dei più grandi geni mai scoperti, se venisse disteso sarebbe lungo ben 0.84 mm !! Solo lo 0,5% delle coppie di basi, 13.973, appartengono ai 79 esoni del gene, i quali combinati insieme contengono le sequenze attive codificanti, l'informazione per la sintesi di diverse forme di distrofina. La trascrizione dell'informazione genetica del gene della distrofina nell' mRNA è sotto il controllo di almeno 5 promoters, regioni di DNA, che comandano il processo di riassetto in modo da permettere la produzione di un certo numero di proteine diverse. Il prodotto principale è la distrofina intera, una proteina molto lunga a forma di corda che consiste di 3685 aminoacidi (Hoffman, Washington). La distrofina ha un peso molecolare di 427 kDa (kilodaltons), cioè è circa 427.000 volte più pesante di un atomo di idrogeno, è lunga 125 nm (nanometro, un milionesimo di millimetro) e si trova all'interno della membrana della fibra muscolare cui è ancorata tramite un complesso di molte altre proteine. La sua impor-

tanza è determinante per la stabilità meccanica della membrana durante la contrazione muscolare. A dispetto della sua importanza, solo lo 0.002% del peso delle proteine muscolari è costituito da distrofina, circa 20 mg per kg di muscolo.

**Il complesso della distrofina:** Con una delle sue due estremità, quella amino-terminale, la distrofina interagisce con la  $\alpha$ -actina all'interno della membrana della fibra muscolare. L'altra estremità, carbossi-terminale, è legata al  $\alpha$ -destroglicano, che attraversa la membrana cellulare e si collega sul lato esterno con l' $\alpha$ -destroglicano, questo blocca l'apparato contrattile alla superficie extracellulare della membrana, più esattamente al *sarcolemma*. L'intero complesso proteico cui appartiene la Distrofina, consiste di più di due dozzine di diverse proteine come illustrato nella figura.



(Reproduced by permission from *Nature* **415**, 228, 2002, copyright Macmillan Publishers Ltd., <http://www.nature.com>).

Oltre alle proteine mostrate, molti altri componenti di questo sistema sono stati identificati, disferlina, integrina, telethonina, miotilina, agrina, desmuslina, syncollina, fukutina, proteine fukutina-related, spectrina, collagene e calpaina, alcune addirittura esistenti in più di una forma. Inoltre l'organizzazione della  $\alpha$ -actina non è mostrata nella figura e ci si aspetta che in futuro verranno identificati molti altri componenti (Campbell, Iowa City).

Quando manca la Distrofina, come nel caso della distrofia Duchenne, l'equilibrio tra le diverse parti del complesso viene compromesso. Specialmente i destroglicani, i sarcoglicani ed i sarcospan sono ridotti o scompaiono completamente, inoltre le proteine contrattili actina e miosina degenerano. Ogni proteina del complesso ha il suo gene che può anch'esso essere danneggiato a seguito di mutazioni. Questo può condurre (allo stato attuale delle conoscenze) a 13 differenti distrofie dei cingoli, 5 distrofie congenite ed almeno altre 8 malattie neuromuscolari.

Questa descrizione riassuntiva dei dettagli molecolari del complesso della distrofina mette in luce le difficoltà incontrate dai ricercatori nel loro sforzo di trovare una terapia della Duchenne.

**Mutazioni ed origine della malattia:** La distrofia muscolare Duchenne è causata da tre diversi tipi di mutazioni del gene della distrofina: delezioni, se mancano una o più parti del gene, duplicazioni, se una o più parti sono duplicate, mutazioni puntiformi, se si verificano cambiamenti, perdite o aggiunte di una o più singole lettere genetiche. Dato che il meccanismo di lettura nei ribosomi legge sempre codici di parole di tre lettere una dopo l'altra senza spazi, una mutazione non sposta il quadro di lettura se il numero di lettere mancanti o aggiunte può ugualmente essere diviso per tre senza che avanzino delle lettere. In questo caso, la distrofina prodotta può essere più lunga o più corta. Se questo cambiamento riguarda solo strutture non essenziali, come ad esempio la parte centrale della distrofina, la proteina può ancora essere parzialmente funzionale, come nel caso della forma più benigna, la distrofia muscolare di Becker. Se invece la mutazione sposta il quadro di lettura di una o due lettere, allora, nella maggioranza dei casi, una intera serie di aminoacidi sbagliati viene incorporata nella proteina dando luogo ad una mutazione fino al punto in cui si raggiunge un nuovo e prematuro codone di stop che mette fine alla sintesi. In questo caso, la distrofina incompleta che ne risulta non riesce a svolgere la sua funzione, viene quindi degradata e si sviluppa

una distrofia Muscolare di Duchenne.

Senza distrofina, la fibra muscolare degenera. Essa viene continuamente rigenerata ma il meccanismo di rigenerazione ad un certo punto comincia a rallentare. Le fibre muscolari distrutte vengono rimpiazzate da tessuto adiposo e connettivo, già all'età di due o tre anni sono visibili i primi segni della malattia. Nel punto in cui il nervo motore entra in contatto col muscolo, troviamo un'altra proteina simile alla distrofina, l'utrofina, anche questa contribuisce fino ad un certo punto alla stabilità della membrana (Davies, Oxford). Senza l'utrofina, la malattia progredirebbe in modo molto più veloce. Come abbiamo già detto, l'assenza della distrofina disturba il delicato equilibrio di un gran numero di altri componenti la cui natura e il cui ruolo nella complessa architettura della fibra muscolare non sono ancora noti. Questo influenza la patologia ed i sintomi della malattia in un modo non sempre prevedibile.

**Ereditarietà della distrofia muscolare Duchenne:** Oltre ai normali 44 cromosomi, detti autosomi, i ragazzi hanno due differenti cromosomi sessuali in ogni cellula del corpo, un cromosoma Y ed uno X. Se il loro gene per la distrofina sul loro unico cromosoma X è danneggiato da una mutazione, esso non viene compensato da un gene intatto o da un secondo cromosoma X, come succede per le mutazioni che si verificano sugli autosomi, i quali sono sempre presenti in coppia. Per questo motivo la distrofia Duchenne e Becker si verifica solo nei maschi. Le donne hanno due cromosomi X nelle loro cellule. Quando presentano un gene per la distrofina danneggiato su uno dei loro cromosomi X, il gene intatto che si trova sull'altro cromosoma X compensa per il gene mutato, in tal modo le donne mostrano minimi segni clinici della malattia o addirittura nessuno. Pur tuttavia possono trasmettere la malattia, sono dei carriers genetici.

Circa due terzi dei ragazzi Duchenne ereditano la malattia in quanto le loro madri sono dei carriers genetici, cioè tutte le loro cellule mostrano una mutazione del gene per la distrofina su uno dei due cromosomi X. Al momento della meiosi, la divisione delle cellule che conduce alle cellule uovo, ogni cellula uovo riceve solo un cromosoma X. La probabilità che questo sia il cromosoma X con il gene mutato, è quindi del 50%. Di conseguenza, il 50% dei figli sarà affetto da una DMD ed il 50% delle figlie saranno anche loro portatrici. Queste percentuali di rischio restano le stesse per tutti i figli, cioè non diminuiscono se la famiglia ha già un figlio affetto dalla DMD. Se la madre è una portatrice, la mutazione può essere

iniziata sia nelle cellule germinali dei suoi genitori sia in quelle dei suoi antenati, ad esempio una nonna materna. Dal momento che tutte le cellule di una portatrice presentano un gene mutato, la sua situazione di portatrice potrà essere evidenziata mediante una analisi del gene nei leucociti, i globuli bianchi del sangue.

Circa un quarto dei casi di Duchenne e Becker sono dovuti ad una nuova mutazione. In questo caso, la mutazione ha avuto luogo spontaneamente in una particolare cellula uovo della madre che ha dato origine al bambino affetto dalla DMD. Dato che solo una cellula uovo è colpita, tutti gli altri figli di questa donna avranno il medesimo rischio che normalmente corrono le famiglie che non hanno una storia ereditaria per questa malattia.

Circa un decimo dei pazienti affetti da DMD/BMD ha una madre che presenta il cosiddetto mosaicismismo germinale, cioè la nuova mutazione si è verificata in un momento iniziale durante la formazione delle cellule germinali, e la cellula mutata ha dato origine ad un gruppo di cellule uovo, ognuna contenente la mutazione. Dato che più di una cellula è colpita, anche un secondo figlio potrebbe ereditare la malattia, o una figlia potrebbe essere una portatrice.

I moderni metodi di indagine genetica non permettono di evidenziare un mosaicismismo germinale, quindi bisognerebbe offrire una diagnosi prenatale a tutte le donne in gravidanza che hanno già avuto un figlio affetto da DMD/BMD, non solo alle donne che sono già state diagnosticate come portatrici (Müller-Reible, Würzburg).

**Diagnostica:** Il materiale genetico su cui viene fatta la diagnosi della DMD/BMD nei ragazzi, può essere isolato dai globuli bianchi, i leucociti, ottenuti dal sangue. Circa il 60% dei pazienti presentano delle delezioni e circa il 6% presenta delle duplicazioni nel gene per la distrofina. Il riconoscimento di queste mutazioni è piuttosto semplice dopo una moltiplicazione del materiale genetico tramite una PCR (polymerase chain reaction). Dei pazienti che non presentano né una delezione né una duplicazione, un 35% ha delle mutazioni puntiformi (cioè lo scambio di una singola lettera genetica con un'altra). Per poter caratterizzare univocamente questo tipo di mutazioni, si devono eseguire delle analisi di sequenze che al momento non possono essere offerte comunemente. Sono però attualmente allo studio altre metodiche che potrebbero essere disponibili in breve tempo (Ray, Toronto). Ci sono anche altri pazienti, tuttavia, le cui mutazioni non rientrano in nessuno degli schemi proposti e la cui

diagnosi molecolare è ancora difficile per i ricercatori (Hoffman, Washington).

Nelle famiglie che hanno un ragazzo Duchenne, che presenta una delezione o una duplicazione nel gene per la distrofina, le portatrici possono essere diagnosticate tramite una valutazione quantitativa dei test genetici. Le portatrici hanno, sui loro due cromosomi X, una copia intatta ed una mutata del gene per la distrofina che deve essere messo da parte. Queste determinazioni quantitative sono abbastanza complicate, e solo laboratori genetici con una esperienza ed una dotazione strumentale adeguata possono effettuarle in modo sicuro.

Per la diagnosi dello stato di portatrice, l'analisi dei markers genetici, *short tandem repeats*, si è dimostrata efficace. Questi markers, sono delle corte sequenze dinucleotidiche ripetute negli introni ed in altre regioni non codificanti del gene per la distrofina. Dato che ogni marker è abbastanza variabile, la sua esatta struttura ed organizzazione è unica per ogni persona. Questo permette di tracciare l'ereditarietà di un gene per la distrofina mutato all'interno di una famiglia senza il bisogno di analisi di sequenze o del riconoscimento della mutazione stessa (Fenwick, San Juan Capistrano).

**Possibilità terapeutiche:** Per curare la Distrofia Muscolare Duchenne, la conseguenza della mutazione che ha danneggiato il gene per la distrofina, si deve in qualche modo bloccare o almeno diminuire la degenerazione muscolare. La ricerca sta cercando di fare questo sia tramite una terapia genica sia tramite una terapia farmacologica. Per Terapia genica intendiamo una tecnica che sia in grado di re-introdurre in ogni singola fibra muscolare almeno tutte le regioni attive, gli esoni, di un gene per la distrofina intatto, o il suo cDNA, o parte di esso, oppure che in qualche modo tramite una tecnica genetica si possa riparare il danno specifico del gene. Per terapia farmacologica intendiamo quando si interviene con una sostanza chimica, un farmaco, che non ha nulla a che fare col gene, ma che blocca o rallenta la degenerazione muscolare. In ambedue i campi sono stati fatti notevoli progressi negli ultimi anni.

**Non c'è ancora una terapia:** A dispetto di questi progressi, non esiste ancora alcuna terapia genica o farmacologica in grado di curare un ragazzo affetto da DMD/BMD. Solo alcuni farmaci, tre tipi di steroidi abbastanza simili tra loro, *prednisone*, *prednisolone*, e *deflazacort*, si sono mostrati abbastanza efficaci nel rallentare per un breve periodo la degenerazione muscolare. Purtroppo,

spesso possono presentare gravi effetti collaterali (vedi il paragrafo: *glucocorticoidi*). A causa della gravità della malattia, le famiglie dei pazienti, i loro medici, e la gente in genere sono alla ricerca disperata del più piccolo segno di speranza dalla ricerca, ed i media, principalmente i giornali e le televisioni, tendono ad esagerare i piccoli progressi ed a trasformarli in incredibili scoperte. Non solo i media, i ricercatori stessi sono spesso troppo ottimisti ed annunciano il risultato di sperimentazioni sugli animali come delle vittorie terapeutiche, generando delle false speranze. La realtà è che, purtroppo, neanche un solo ed unico bambino è mai stato curato dalla distrofia muscolare Duchenne. (*Dubowitz*, London).

Nei paragrafi che seguono è stato riassunto il lavoro scientifico di circa 59 gruppi di ricercatori, per un totale di almeno 30 differenti approcci ad una possibile terapia della DMD/BMD. Tuttavia, bisogna ricordare, che per quanti sforzi siano stati fatti, resta ancora una lunga strada da percorrere.

**Esperimenti di trasferimento del gene per la distrofina:** E' ragionevole credere che il trasferimento, o il trasporto, di una quantità sufficiente di un gene per la distrofina intatto nel nucleo di una fibra muscolare distrofica sia in grado di curare la malattia, purché l'informazione genetica del nuovo gene venga usata dai ribosomi che sintetizzano la proteina per produrre grandi quantità di distrofina funzionale, la quale dovrà a questo punto migrare verso il suo normale posizionamento sotto la membrana cellulare ed essere incorporata nel complicato complesso distrofina-glicoproteina.

**Cani e topi distrofici:** La maggior parte degli esperimenti di trasferimento genico sono realizzati su un particolare modello animale: il topo distrofico mdx, il quale ha una mutazione puntiforme al nucleotide 3185, nell'esone 23 del suo gene per la distrofina. Questa mutazione provoca la sostituzione di un codon CAA, cioè l'aminoacido glutamina, con un codon TAA, cioè uno stop codon, in questo modo la sintesi di distrofina termina prematuramente ed il topo ha una distrofina non funzionale nei suoi muscoli. Questi topi non perdono però i loro muscoli, infatti, non sviluppano la fibrosi, cioè la proliferazione di tessuto connettivo, tipica dei ragazzi Duchenne, per cui il processo degenerativo dovuto alla malattia non supera mai la loro capacità rigenerativa. Sebbene il trasferimento genico possa essere studiato su questi modelli, bisogna ricordare che qualsiasi risultato ottenuto sui topi non può essere considerato immediatamente applicabile ai bambini senza ulteriori approfondimenti

sull'uomo. *Un bambino non è affatto un topo più grande!*

Alcuni esperimenti sono effettuati sui cani distrofici, i cani *golden retriever muscular dystrophy*, GRMD, i quali, a differenza dei topi, hanno una distrofia muscolare simile alla Duchenne. Essi, infatti, soffrono gli stessi problemi dei ragazzi e, perciò, sono difficili da allevare e da mantenere. Il loro gene per la distrofina ha una mutazione puntiforme nel sito splice receptor dell'introne 6, che provoca una delezione dell'esone 7 nell'm-RNA, un frame-shift ed un codone di stop prematuro.

**Trasferimento genico mediante i virus:** Per trasferire un gene, occorre un trasportatore, cioè un vettore genico. Un modo per trasferire materiale genetico nelle cellule viventi consiste nel posizionarlo all'interno di un virus. Essi si attaccano alla superficie di una cellula vivente, introducono i loro geni nella cellula e costringono l'apparato di sintesi della cellula a riprodurre altri virus. Nella ricerca sulla Duchenne sono principalmente due i virus che vengono studiati, l'adenovirus, e il virus adeno-associato, dieci volte più piccolo del precedente. Questi virus non possono più riprodursi all'interno della cellula ospite, perché i ricercatori hanno eliminato la maggior parte dei loro geni. Il Virus più promettente sembra essere quello definito gutted, un adenovirus praticamente vuoto, che non contiene alcun gene tipico del virus, quindi ha abbastanza spazio per le 14.000 lettere genetiche attive, il c-DNA, che trasporta l'informazione per l'intera proteina distrofina. Con questi virus gutted si è riusciti ad ottenere nuova sintesi di distrofina in una quantità pari al 30% delle fibre muscolari di un topo distrofico, seguita da un miglioramento della funzione muscolare sia in topi giovani che adulti (*Lochmüller*, München; *Chamberlain*, Seattle).

E' addirittura possibile introdurre due c-DNA all'interno di questi virus gutted, e con l'aiuto di un promoter, una sequenza genetica che attiva un gene, quasi il 100% delle fibre in alcuni muscoli del topo ha prodotto nuova distrofina che è rimasta visibile per almeno 30 giorni (*Karpati*, Montreal).

I piccoli virus adeno-associati possono trasportare solo materiale genetico che sia inferiore a 5000 nucleotidi, un terzo del c-DNA dell'intera distrofina. Il vantaggio è che essi riescono a trasferire il gene in modo più efficace rispetto al normale adenovirus. Lo svantaggio è che il c-DNA della distrofina, per poter essere trasportato, deve essere accorciato in modo considerevole. I pazienti affetti dalla distrofia muscolare di

Becker, che ha una progressione molto più lenta rispetto alla Duchenne, presentano una distrofina abbastanza simile a quella che si otterrebbe accorciando quella originale, quindi, una terapia genica, potrebbe eventualmente utilizzare questo tipo di Mini geni Becker e, anche se non riuscirebbe a curare del tutto la Duchenne, potrebbe trasformarla nella forma più benigna di Becker.

Per poter determinare quali, delle quattro regioni della normale proteina distrofina, N-terminale, quella "cystein-rich", la C-terminale, o la parte centrale, siano importanti e quali no, sono stati fatti molti esperimenti, modificando geneticamente dei topi distrofici, in modo tale che essi presentassero una particolare distrofina abbreviata tra le nove possibili. Si sapeva già che alcune delle regioni centrali potevano essere rimosse senza la perdita di funzionalità. L'analisi dettagliata della struttura tridimensionale ha rivelato quali particolari regioni tra quelle centrali possano con sicurezza essere rimosse. Una particolare distrofina abbreviata, che era circa la metà di quella originale, mostrava praticamente le stesse proprietà della proteina inalterata. Il rilascio di questa e di alcune delle altre tramite virus adeno-associati nel muscolo di topi mdx, ha prevenuto e parzialmente recuperato i danni tipici della Duchenne. Questi risultati dimostrano che alcune modifiche specifiche della distrofina possono generare delle nuove proteine, che sono significativamente più corte ma più funzionali, di quelle riscontrabili naturalmente nei pazienti affetti dalla distrofia muscolare di Becker (*Chamberlain, Seattle*).

Il monitoraggio ad ultrasuoni, fa in modo che l'iniezione dei vettori, possa essere indirizzata verso un bersaglio in modo abbastanza preciso (*Mendell, Columbus*). Se circa il 30% della normale quantità di distrofina immutata riappare, una misurazione effettuata sul diaframma dei topi è in grado di dirci se anche la funzione muscolare risulta migliorata. Anche il trasferimento di mini geni conduce ad un miglioramento della funzione muscolare. Inoltre, questi esperimenti hanno dimostrato che il trasferimento genico porta a risultati migliori negli animali giovani, il motivo sembra essere la minor comparsa di problemi immunitari quindi, in seguito ad una singola iniezione, la nuova distrofina sintetizzata può rimanere più a lungo nei muscoli rispetto ai topi adulti. Dopo un singolo trattamento in un topo neonato, la nuova distrofina può essere riconosciuta anche dopo un anno. Per una eventuale futura applicazione nell'uomo, bisognerà tenere presente che i pazienti dovranno essere trattati al più presto possibile dopo la nascita, quando i loro muscoli sono ancora perlopiù intatti (*Clemens, Pittsburgh*).

La nuova distrofina introdotta probabilmente non sarà riconosciuta dal sistema immunitario come propria, quindi potrebbero verificarsi dei processi di rigetto. Sono stati fatti degli esperimenti con i topi distrofici per sopprimere la risposta immunitaria tramite farmaci conosciuti. Dopo aver utilizzato degli adenovirus per trasferire un gene marker, che produce una proteina fluorescente di colore verde, si è riusciti a dimostrare la persistenza prolungata della proteina in topi adulti mdx ed è anche stato possibile ripetere il trasferimento genico senza reazioni immunitarie. Questa tecnica è ora adoperata per il trasferimento del gene per la distrofina (*Clemens, Pittsburgh*).

**Trasferimento genico attraverso la via ematica:** In alcuni esperimenti descritti qualche tempo fa, sono state iniettate direttamente nel muscolo degli animali delle soluzioni contenenti il virus che trasportava il gene per la distrofina. Per poter raggiungere tutti i muscoli, anche quelli cardiaci e polmonari, sono stati fatti molti esperimenti che permettessero di sviluppare un trattamento sistemico: cioè la possibilità di iniettare il virus direttamente nel torrente circolatorio. Per essere certi che la nuova distrofina venisse sintetizzata solo nei muscoli è stata aggiunta una ulteriore sequenza al gene per la distrofina che veniva inserito nei virus, il promoter CK. Questa sequenza lunga 1354 nucleotidi, è normalmente in grado di attivare il gene della proteina muscolare protein-kinasi. Questo promoter ci dà la certezza che il nuovo gene per la distrofina venga attivato solo nelle fibre muscolari.

I virus si attaccano ad alcune strutture specifiche sulla membrana cellulare, come, ad esempio, i recettori per gli adenovirus, tramite i quali essi riescono a penetrare, attraversando la membrana, fino all'interno della fibra muscolare. Questi recettori, tuttavia, sono più numerosi sulle fibre muscolari in fase di sviluppo e di rigenerazione, mentre sono inibiti e meno numerosi nel muscolo maturo, che non è più in grado di dividersi. Per questo motivo il trasferimento genetico tramite adenovirus è meno efficace nel muscolo maturo. Per superare questo ostacolo, sono stati prodotti dei topi transgenici che esprimevano questi recettori in grande quantità sulla superficie delle cellule muscolari mature. In alcuni esperimenti preliminari tramite adenovirus che contenevano il complesso dei geni per la proteina marker  $\beta$ -galattosidasi, iniettati a livello intramuscolare, si è osservato che il trasferimento genico nel muscolo di topi che avessero una alta concentrazione di recettori era circa 50 volte maggiore rispetto al gruppo di controllo. Se in ulteriori esperimenti si riuscisse ad elevare, in modo

altrettanto incredibile, il livello di distrofina prodotta, si potrebbe cominciare a pensare ad un trattamento terapeutico in due stadi: un primo stadio in cui venga trasferito il gene per il recettore ed un secondo stadio in cui venga trasferito il gene per la distrofina, oppure ad una separata modulazione del gene per il recettore prima del trasferimento del gene per la distrofina (*Holland, Montreal*).

**Trasferimento di geni nudi:** Per questa tecnica, il materiale genetico che deve essere trasferito non viene inserito in un virus ma in un plasmide, una piccola struttura di DNA circolare senza proteina, che si trova spesso in grandi quantità, nei batteri in cui sono responsabili della maggior parte delle resistenze agli antibiotici. Il vantaggio di questo tipo di trasferimento genico risiede nel fatto che i plasmidi non contengono proteine, ma solo materiale genetico, cioè DNA nudo, quindi non insorge alcuna reazione immunitaria contro il vettore. Sono stati fatti degli esperimenti con plasmidi contenenti alcuni marker o geni "reporter", geni le cui proteine possono essere riconosciute nel tessuto muscolare tramite colorazione o produzione di luce, in modo tale da poter controllare facilmente il successo di un esperimento di trasferimento genico. Quando volumi abbastanza significativi di soluzioni di questi plasmidi venivano iniettate ad alta pressione, nelle arterie degli arti inferiori di ratti o scimmie rhesus, i geni reporter  $\beta$ -galattosidasi e luciferasi venivano trasferiti in almeno il 20% delle fibre muscolari dopo una singola iniezione e in almeno il 40% dopo iniezioni ripetute. La pressione veniva creata bloccando il deflusso venoso dall'arto inferiore per un breve tempo. Sono attualmente in corso esperimenti per trasferire il gene della distrofina nel topo mdx, nelle scimmie e nei cani GRMD - Golden Retriever (*Wolff, Madison; Braun, Strasbourg*).

**Trials clinici sui plasmidi:** In Francia è iniziato, nel settembre 2000, un trial clinico in "fase clinica 1" effettuato su nove pazienti Duchenne maggiori di 15 anni; si è utilizzata una somministrazione intramuscolare di plasmidi contenenti il gene per la distrofina ed i promoters. Questo studio in fase 1 è necessario per stabilire la sicurezza delle procedure, ad esempio per determinare se esiste il rischio di infiammazione o di reazioni immunitarie come pure per verificare se veniva o meno prodotta nuova distrofina, secondo le informazioni fornite dal gene trasferito. È stata quindi iniettata una sola volta, nel muscolo dell'avambraccio dei primi tre pazienti, una soluzione contenente 200  $\mu$ g (milionesimi di grammo) di plasmidi con 10 trilioni ( $10^{12}$ ) copie del gene per la distrofina. Questa è una quantità estremamente piccola paragonata a quella utilizzata negli

animali da esperimento. I 3 pazienti successivi hanno ricevuto una dose di 600  $\mu$ g e gli ultimi 3 due dosi da 600  $\mu$ g ognuna. La principale preoccupazione è stata la sicurezza dei pazienti, quindi ogni paziente viene trattato solo quando si è certi che i pazienti precedenti non mostrano alcun segno di intolleranza immunitaria. È importante sottolineare che in questa fase dello studio, i partecipanti non godranno di alcun beneficio terapeutico, non è ancora infatti un trattamento terapeutico. Questa prima sperimentazione finirà intorno agli ultimi mesi del 2002 (*Braun, Strasbourg; Fardeau, Paris*).

**Sperimentazioni per superare i problemi immunologici:** Dal momento che il plasmide non contiene alcuna proteina, il trasferimento genico con questo particolare DNA nudo permette anche di esaminare potenziali problemi legati alla risposta immunitaria nei confronti della nuova distrofina senza l'interferenza di altre proteine che potrebbero essere state introdotte con altri metodi di trasferimento genico che utilizzino vettori virali o cellulari. Gli studi sul topo mdx hanno dimostrato che la risposta immunitaria di solito è diretta verso la distrofina umana ma non verso la distrofina del topo, pur mancando la distrofina normale nel muscolo dei topi. La mancanza di una risposta immunitaria verso la distrofina del topo potrebbe essere dovuta alla presenza di altre forme di distrofina. Questi risultati suggeriscono che la risposta immunitaria al trasferimento del gene potrebbe anche non costituire un grave problema nei pazienti Duchenne, specie in coloro i quali presentano delle mutazioni puntiformi che non interferiscono con la sintesi di altre forme di distrofina. Gli attuali lavori di sperimentazione sono concentrati sulla determinazione di quali altre forme di distrofina debbano essere presenti per indurre una tolleranza immunitaria all'apparire della nuova distrofina muscolare dopo il trasferimento genico (*Wells, London, updated April 2002*).

**Cellule staminali:** Le cellule staminali esistono in molti tessuti, anche nel muscolo scheletrico e nel midollo. Esse sono cellule non-specializzate che possono dare origine a molti tipi di cellule specializzate, ad esempio le cellule staminali del midollo possono dare luogo a vari tipi di cellule ematiche e le cellule staminali del muscolo possono originare nuove cellule muscolari. Queste cellule pluri-potenti sono delle cellule somatiche, o cellule staminali adulte, a differenza delle cellule staminali embrionali che sono invece totipotenti e quindi possono dare origine a tutti i tipi di cellule. La ricerca di una terapia della Duchenne con le cellule staminali utilizza solo cellule staminali adulte provenienti da animali da

esperimento, questo a causa dei problemi etici connessi all'uso di cellule staminali embrionali umane.

**Sperimentazioni con cellule staminali dal midollo:** È stata iniettata nella vena della coda di topi femmine omozigoti mdx, che non hanno distrofina, una quantità pari a circa 10/20,000 cellule staminali purificate provenienti dal midollo di topi normali. Tre mesi dopo, è stato possibile evidenziare la distrofina in almeno il 10% delle fibre muscolari, e almeno il 10% dei nuclei delle cellule avevano un cromosoma Y come prova che le cellule sane iniettate si erano fuse con le cellule muscolari malate. Esse erano arrivate a destinazione tramite la circolazione sanguigna ed avevano portato con sé l'informazione normale per la distrofina che quindi era stata utilizzata per produrre distrofina funzionale. Tuttavia, non è stato possibile aumentare oltre il 10%, inizialmente ottenuto, il numero delle cellule muscolari contenenti la nuova distrofina (*Kunkel, Boston*).

Sono stati fatti esperimenti anche per vedere se un trapianto di midollo da topi normali potesse produrre, in topi distrofici "mdx4cv" nuove cellule muscolari contenenti distrofina. Questi topi hanno uno stop-codone nell'esone 53 e, a differenza dei topi mdx con la mutazione all'esone 23, riescono a rigenerare spontaneamente solo pochissime fibre muscolari, le fibre revertanti, che contengono distrofina normale. Dieci mesi dopo l'iniezione di 15 milioni di cellule non purificate provenienti dal midollo in questi topi, il cui midollo era stato distrutto per mezzo di radiazioni, non più dell'1% delle fibre muscolari mostrava nuova distrofina. Quindi, un trapianto totale di midollo, non riesce ad alleviare una distrofia muscolare nei topi. I ricercatori hanno sottolineato, tuttavia, che i loro risultati non necessariamente dimostrano che la stessa tecnica sarebbe inefficace nei ragazzi, dal momento che la malattia è differente nei topi e nell'uomo (*Mavilio, Modena*).

Esperimenti simili sono stati fatti anche in giovani cani GRMD. Alcuni degli animali trattati sono già cresciuti. Sono quindi state pianificate delle estensive biopsie per determinare se i loro muscoli ora contengono nuova distrofina. Dato che la distrofia di questi cani è più simile alla forma umana, rispetto a quella dei topi, i risultati saranno più rappresentativi di quanto potrebbe accadere se si applicasse questa tecnica nei ragazzi Duchenne (*Storbe, Seattle*).

**Sperimentazioni con cellule staminali provenienti dal muscolo scheletrico:** Alcune cellule staminali derivate dal muscolo sono state isolate dal muscolo scheletrico di topi distrofici

mdx, quindi sono state trattate al di fuori dell'animale con un vettore virale che trasportava un mini-gene per la distrofina e, successivamente re-iniettate nella vena della coda del topo distrofico. Dopo 7 giorni è stata evidenziata una piccola percentuale di distrofina nei muscoli degli arti posteriori. Questo significava che alcune delle cellule staminali trattate geneticamente erano riuscite in qualche modo ad arrivare nel tessuto muscolare. Alcune cellule erano anche riuscite a migrare, attraverso il flusso ematico in altri organi, incluso il midollo. Etichettando con un gene reporter alcune cellule staminali muscolari purificate, provenienti da topi normali, e re-iniettandole nel topo mdx il cui midollo era stato distrutto, esse erano in grado di differenziare e di cominciare a produrre distrofina nel muscolo scheletrico. Esse, inoltre, riuscivano a trasformarsi anche in vasi sanguigni e tessuto nervoso. Quindi, tali cellule, contribuiscono in vari modi alla rigenerazione di muscolo funzionale e di altri tessuti che normalmente contengono la distrofina che manca invece negli animali distrofici e nei ragazzi Duchenne (*Huard, Pittsburg*).

**Trapianto di mioblasti:** Intorno al 1990-1991, sono stati fatti una serie di studi clinici su bambini Duchenne con una tecnica che aveva mostrato qualche risultato positivo sui topi mdx: alcuni mioblasti, i precursori delle cellule muscolari che possono produrre delle cellule muscolari mature, provenienti da un donatore sano e quindi contenenti il normale gene per la distrofina, sono stati iniettati direttamente in vari punti nel muscolo distrofico. Questi esperimenti non hanno avuto successo nei ragazzi Duchenne, perché i mioblasti non migravano in quantità sufficiente dal sito di iniezione, oltre a questo si verificavano dei problemi immunitari ma, soprattutto, quasi tutti i mioblasti iniettati morivano dopo un breve tempo (*Karpati, Montreal*).

Gli esperimenti sono ancora in corso, e si sta cercando di chiarire come mai sopravviva solo una quantità inferiore all'1% dei mioblasti iniettati nel muscolo distrofico. Queste poche cellule sembrano comportarsi come delle cellule staminali. Per poter isolare questi mioblasti attivi è necessario sviluppare delle tecniche di riconoscimento più efficaci. Per questo motivo sono allo studio alcune strutture di superficie, i cosiddetti markers, che potrebbero permettere di distinguere queste cellule da quelle inattive (*Partridge, London*).

**Terapia genica ex-vivo tramite i mioblasti, primi passi:** Isolando i mioblasti da un paziente Duchenne, introducendo in essi il gene corretto per la distrofina e re-iniettandoli si potrebbe

probabilmente prevenire la maggior parte dei problemi immunologici. Ma per far sì che una simile terapia genica somatica ex-vivo possa avere una possibilità di successo, bisogna migliorare in modo significativo la sopravvivenza dei mioblasti nel tessuto muscolare dopo il trapianto. Questo potrebbe essere ottenuto facendo sì che i mioblasti riescano a sintetizzare, almeno per un certo periodo di tempo, degli agenti anti-infiammatori o dei fattori di crescita. Quindi, bisognerebbe introdurre nei mioblasti, prima del trapianto, dei geni che codifichino per questi agenti. In alcuni esperimenti preliminari è stata usata una elettroporazione per trasportare dei plasmidi contenenti dei geni per una proteina fluorescente attraverso la membrana cellulare di mioblasti umani in coltura. Questa tecnica rende temporaneamente permeabili le membrane con uno stimolo elettrico, ad esempio 400 V attraverso un varco di 4mm. In condizioni ottimali, fino al 70% dei mioblasti vengono trasferiti col gene ed esprimono la proteina marker. L'abilità dei mioblasti a fondersi in miotubi, un altro stadio dello sviluppo muscolare, non viene compromessa. Quindi, le terapie geniche basate sulla correzione del gene e sul trapianto di mioblasti umani potrebbe trarre qualche beneficio dal trasferimento genico tramite elettroporazione (Bernheim, Genève).

**Cambiare l'informazione genetica:** Sono stati fatti degli esperimenti allo scopo di cambiare l'informazione genetica danneggiata e riparare la mutazione. Questa tecnica avrebbe quattro importanti vantaggi: (1) Potrebbe essere evitato il rischio di un trasferimento mediato da virus. (2) Potrebbe essere riparata non solo la distrofina a livello muscolare ma anche tutte le altre forme. (3) Potrebbe essere mantenuta la regolazione "tessuto-specifica" tipica della distrofina normale. (4) La manipolazione degli agenti terapeutici, gli oligonucleotidi, potrebbe essere più facile ed economica rispetto ai vettori virali che trasportano il materiale genetico. Gli oligonucleotidi sono brevi specifiche sequenze di DNA, formati da pochi nucleotidi e che possono essere creati in modo automatico.

Tre tipi di strategie sono state applicate finora: (1) Riparazione della mutazione a livello del gene stesso. (2) Modifica dell'informazione genetica durante la Trascrizione nel RNA tramite la tecnica "exon skipping". (3) Fare in modo che venga ignorato un prematuro "stop codon".

**Riparazione del gene:** I tentativi di riparare le mutazioni puntiformi a livello del gene sono stati fatti usando alcuni brevi oligonucleotidi chimerici, questi contengono sia RNA che DNA. Il braccio che contiene DNA è perfettamente complemen-

tare alla corretta sequenza genica nel sito della mutazione puntiforme del gene, mentre la porzione contenente RNA è perfettamente complementare alla sequenza mutante. Questo porta a strutture quadruplice appaiate, che sono capaci di correggere mutazioni così piccole attivando il meccanismo biologico di riparazione del DNA proprio della cellula. Con questa tecnica, è stato iniettato un DNA-RNA oligonucleotide, complementare al sito della mutazione trovato nel gene della distrofina di cani GRMD, in un cane di 6 settimane affetto da MD. I muscoli trattati hanno mostrato: (1) Evidenza della ricostituzione dell'esone che mancava a causa della mutazione. (2) Ricostituzione della regione della proteina codificata dall'esone mancante compresa la distrofina completa che è stata riscontrata nella sua localizzazione corretta a livello della membrana muscolare. (3) La cosa più importante, inoltre, dimostrava che il gene sul cromosoma X era stato corretto. La riparazione della mutazione si è mantenuta in questo cane per circa un anno. (Bartlett, Bethesda).

In un esperimento simile, è stata riparata in vitro la mutazione puntiforme nell'esone 23 di mioblasti provenienti dal topo mdx, questi mioblasti, inoltre, si erano fusi in miotubi che avevano prodotto una normale completa distrofina. Due settimane dopo una sola iniezione di oligonucleotidi nel muscolo di topi mdx, l'1.2% delle fibre inotro al sito di iniezione contenevano nuova distrofina che non era distrofina delle fibre dette revertanti, come ad esempio la normale distrofina dopo una spontanea soppressione della mutazione. Questa quantità di nuova distrofina è restata stabile per almeno 10 settimane (Rando, Palo Alto).

**Exon skipping:** Con questa tecnica si cerca di cambiare una mutazione tipica di una Duchenne in una mutazione tipica delle Becker. Questo può essere fatto inducendo un meccanismo di "splicing", che elimina gli introni dall'RNA-pre-messaggero per eliminare anche uno o più esoni specifici in modo che l'informazione genetica oltrepassi una mutazione puntiforme oppure che venga ripristinato il "frame" di lettura intorno ad una delezione genomica che provoca una lettura "out-of-frame". Il gene con la sua mutazione non viene alterato tramite l'exon skipping, ma in questo modo l'RNA messaggero, mRNA, non contiene più l'informazione dell'esone che è stato oltrepassato. Dato che l'mRNA è più corto del normale, anche la distrofina sarà più corta, contiene meno aminoacidi. Se gli aminoacidi mancanti appartengono alla regione centrale della distrofina, essi non sono fondamentali, la proteina risultante può ancora assolvere il suo compito di stabilizzare la membrana della fibra muscolare. Il risultato di questo processo potrebbe condurre a

trasformare una forma Duchenne in una forma più leggera del tipo Becker.

Questo approccio è stato usato per oltrepassare il difetto del singolo nucleotide, la mutazione puntiforme, nell'esone 23 del topo mdx. Un *nucleotide antisense*, che consiste di 25 nucleotidi complementari alla sequenza RNA del pre-mRNA in una delle regioni di confine dell'esone 23, è riuscito ad indurre lo skipping, cioè il salto, di quell'esone contenente la mutazione durante il processo di splicing. L'informazione genetica dell'esone 23 del gene, che codifica per 71 aminoacidi nel dominio rod, è stata quindi saltata durante il processo di lettura. I nucleotidi antisense sono stati impacchettati in liposomi, cioè circondati da un involucro di lipidi, ed iniettati nel muscolo di topi vivi. Dopo 2/4 iniezioni ad intervalli di una settimana, questi esperimenti in-vivo hanno condotto alla produzione di distrofina che, insieme ad altri componenti del complesso del complesso della distrofina, si sono localizzati correttamente a livello della membrana delle cellule muscolari. Ulteriori esperimenti sono tuttora in corso per migliorare la potenza di questi nucleotidi antisense. (Wilton, Perth).

Alcuni oligo-ribonucleotidi antisense particolarmente stabili sono stati creati bloccando i gruppi liberi -OH, dello zucchero Ribosio del RNA, con gruppi metilici. Con questi oligonucleotidi modificati si è riusciti a provocare uno skip, in colture tessutali di topi mdx, in quasi il 70% dell'esone 23 dell'mRNA della distrofina. La tecnica funziona anche nel topo vivente, con una efficacia minore, e riesce a dare un nuovo impulso alla formazione di distrofina nel muscolo (Dickson, London).

L'esone 45 del gene della distrofina è il singolo esone con la più alta percentuale di frequenza di mutazioni nei ragazzi affetti da Distrofia Duchenne. Questo causa uno spostamento di frame (*frame-shift*) nel mRNA ed un codice di stop prematuro, questo provoca la formazione di una distrofina troncata e non funzionale che viene quindi degradata all'interno della fibra muscolare. Tuttavia, se entrambi gli esoni 45 e 46, sono mutati il frame di lettura non viene cambiato, non viene spostato, questo provoca la formazione di una distrofina più corta del normale, cui manca un blocco di 108 aminoacidi non essenziali appartenenti alla regione mediana della proteina mancante. I pazienti che hanno questo tipo di delezione presentano i sintomi più deboli di una distrofia di Becker

Sono stati fatti degli esperimenti in vitro per provocare una delezione specifica dell'esone 46 dal pre-mRNA della distrofina di miotubi di topi mdx, lo studio ha avuto successo utilizzando 4 differenti RNA-oligonucleotidi antisense specifici

per una sequenza regolatoria di splicing all'interno dell'esone 46. Quindi, sono stati effettuati degli esperimenti simili con diversi RNA-oligonucleotidi antisense specifici per una sequenza analoga nell'esone umano 46. Con uno di essi, formato da 19 nucleotidi, è stato possibile provocare una delezione dell'esone 46 in circa il 15% del pre-mRNA della distrofina di miotubi ottenuti da due pazienti che avevano una delezione dell'esone 45. Questa percentuale di m-RNA accorciato, senza l'esone 45 e 46, ha prodotto una quantità normale di distrofina accorciata in almeno il 75 % dei miotubi. Dopo 24 ore, la nuova distrofina era distribuita omogeneamente all'interno dei miotubi, ma dopo 48 ore essa si era spostata verso la membrana dei miotubi ed è rimasta in loco per molti giorni.

Questa tecnica è molto specifica, infatti provoca la rimozione del solo esone 46. Con la stessa tecnica, è stato indotto il salto dei seguenti nove esoni (2, 19, 29, 41, 43, 44, 47, 50, e 51) in cellule muscolari in coltura. Quindi, questa strategia molto promettente, provata in esperimenti in vitro, potrebbe in seguito convertire una Duchenne in una Becker in circa il 65% dei pazienti con delezioni. Ci sono studi in corso che stanno prendendo di mira altri esoni e stanno sperimentando i metodi per riparare una varietà di altre mutazioni, comprese le duplicazioni e le mutazioni puntiformi. Inoltre, la stessa tecnica è stata usata per saltare l'esone 46 nelle fibre muscolari di topi viventi, con una efficienza di circa il 10%. Diversi metodi per il rilascio in-vivo di nucleotidi antisense sono attualmente allo studio, non solo per migliorare ulteriormente l'efficienza dell'exon skipping ma anche per permettere un futuro trattamento sistemico del muscolo distrofico nel paziente Duchenne (van Ommen, van Deutekom, Leiden).

I siti di "Splice" sono specifiche sequenze di RNA ai margini degli esoni e degli introni che sono essenziali per la corretta rimozione delle sequenze non codificanti degli introni dal pre-mRNA. L'RNA premessaggero, pre-mRNA, è il primo prodotto di un gene attivo; dopo la rimozione delle sequenze dell'introne tramite splicing esso diventa RNA messaggero, mRNA, che si sposta ai ribosomi dove svolge la funzione di trasportatore dell'informazione per la sintesi proteica. I mioblasti, o cellule satellite, fondono in miotubi i quali sviluppano in cellule muscolari adulte.

**Exon skipping spontaneo:** Un ragazzo Duchenne con una delezione nell'esone 45 era ancora in grado di camminare all'età di 14 anni. Quando aveva circa 18 mesi, era stato sottoposto ad un trapianto ed aveva ricevuto cellule staminali del midollo dal padre, perchè in quel momento era affetto da SCID (*severe combined*

*immuno deficiency*). Questo ha sollevato la questione se le sue cellule muscolari contenesero o meno distrofina normale costruita tramite l'informazione genetica proveniente dalle cellule staminali sane del midollo di suo padre. Le ricerche su nuovo materiale bioptico, tuttavia, hanno ora mostrato che i sintomi più lievi non dipendevano dal trapianto ma da un exon skipping causato dalla speciale natura della sua delezione. Inoltre, le sue cellule muscolari contengono alcuni nuclei cellulari che provengono dalle cellule del padre che attualmente continuano a produrre livelli molto bassi di distrofina normale. Quindi, le cellule del midollo contribuiranno certamente alla riparazione della fibra muscolare, ma non in maniera sufficiente ad alterare il corso della malattia in modo significativo (*Kunkel*, Boston).

**Ricombinazione omologa:** La mutazione puntiforme nel gene della distrofina nel topo mdx potrebbe essere riparata nel 15-20% di mioblasti isolati tramite addizione di un segmento di DNA di 603 nucleotidi con la corretta sequenza al sito di mutazione. Parte del nuovo segmento del gene è stato scambiato con un segmento omologo contenente la mutazione da C a T nell'esone 23 del topo. Questa tecnica di ricombinazione di un breve frammento omologo (*short fragment homologous recombination*, SFHR) ora viene applicata ai mioblasti isolati da pazienti Duchenne con delezioni negli esoni da 45 a 51 e 13. Se si mostrerà efficace questa tecnica potrà riparare il disturbo nella lettura del frame e quindi permetterà la reintroduzione di mioblasti corretti nel muscolo dello stesso paziente (*Kapsa*, Melbourne).

**Ignorare uno stop codon tramite l'uso di antibiotici:** Circa un 5% di ragazzi Duchenne hanno una mutazione puntiforme nel loro gene per la distrofina che ha trasformato il codice di un aminoacido in uno dei tre tipi di stop codons, TGA, TAG and TAA, quindi, dopo la trascrizione in mRNA, la sintesi di distrofina si ferma prematuramente. La *gentamicina* è un antibiotico che fa sì che il meccanismo di traslazione dell'RNA nei ribosomi ignori tali stop codons prematuri. Mentre i normali stop codons, che sono protetti da una speciale struttura tridimensionale, mantengono la loro normale funzionalità.

Nel topo mdx, in questo modo, si è riusciti ad ottenere fino al 20% della normale quantità di nuova e funzionale distrofina. La gentamicina ha il vantaggio di essere un farmaco ben conosciuto le cui procedure di approvazione per l'uso in una possibile terapia della distrofia muscolare potrebbero essere più rapide (*Sweeney*, Philadelphia).

Sono stati fatti due studi con gentamicina su

ragazzi Duchenne, sono stati iniettati 7.4 mg di gentamicina per kg al giorno per 14 giorni. A Bethesda, sono stati trattati 2 ragazzi Duchenne e 2 Becker, a Columbus 10 Duchenne e 3 affetti da distrofia dei cingoli. Al termine dello studio non è stata evidenziata nuova distrofina, ma i livelli di creatinichinasi, molto elevati all'inizio dello studio, erano diminuiti in maniera significativa e sono rimasti a livelli bassi per un certo periodo, ciò indica che il farmaco ha un certo effetto sulla membrana della fibra muscolare. Probabilmente il periodo di 14 giorni non è stato sufficiente per poter vedere un effetto significativo sulla sintesi di distrofina. Perciò, è stato avviato un altro studio più lungo con 36 pazienti è attualmente in corso a Columbus, in questo studio verranno praticate delle somministrazioni endovenose di Gentamicina ogni tre giorni per 6 mesi. Saranno inclusi anche alcuni pazienti con codoni di stop in seguito a mutazioni "frame-shift" (*Mendell*, Columbus; *Fischbeck*, Bethesda).

La gentamicina, tuttavia, può provocare gravi effetti collaterali, come danni all'orecchio interno e danni renali. Questi effetti possono essere evitati tramite delle modifiche della struttura del farmaco e controllando frequentemente i pazienti. Altri antibiotici simili alla gentamicina sono stati provati con qualche successo nei topi mdx, come ad esempio la *negamicina* (*Matsuda*, Tokyo), e la *geneticina* (*Flanigan*, Salt Lake City).

**Attivazione dell'utrofina:** L'Utrofina è una proteina simile alla distrofina. Nell'uomo, il suo gene è situato sul cromosoma 6, ha molti esoni come il gene della distrofina e contiene circa 1 milione di nucleotidi. La proteina utrofina è circa un 7% più corta della distrofina ma ha una struttura ed una funzione molto simile. Essa è presente in molti tessuti, anche nel muscolo, ma si concentra particolarmente alle giunzioni neuromuscolari, le regioni in cui i nervi motori entrano in contatto con la membrana muscolare. Prima della nascita, la concentrazione di utrofina nel muscolo è più alta. Questa proteina, anche quando è presente solo in piccole quantità, riesce ad alleviare i sintomi della distrofia Duchenne. Infatti i topi mdx, nei quali il gene dell'utrofina è stato bloccato artificialmente (knocked out), i quali quindi non hanno né distrofina né utrofina, presentano sintomi molto gravi rispetto ai normali topi mdx i cui muscoli neanche degenerano.

Gli studi sui topi mostrano che l'utrofina, se presente in quantità sufficiente, può rimpiazzare la distrofina ed assumere la sua funzione. La distrofia muscolare nei topi mdx è stata praticamente curata in questo modo. Questo è stato ottenuto tramite l'introduzione di un minigene dell'utrofina nella linea germinale, una tecnica che però non

può essere usata nell'uomo (*Davies, Oxford*).

Per una possibile terapia della Duchenne, è stata seguita un'altra strategia che potesse aumentare il livello (di solito molto basso) di utrofina tramite l'up-regulation (sovra-regolazione) dell'attività del suo gene. Per fare questo, è richiesta una sostanza che funzioni da attivatore, potrebbe essere un farmaco, oppure una sostanza chimica o naturale, che vada a modificare uno dei due promotori dell'utrofina. Usando alcuni sistemi di test automatici in vitro, sono stati testati migliaia di composti chimici, alcuni di essi creati artificialmente in modo automatico tramite chimica combinatoria, riguardo alla loro capacità di sovra-regolare il gene della luciferasi, più semplice da misurare rispetto all'utrofina. Qualsiasi prodotto si sia mostrato interessante in questi tests preliminari sarà ulteriormente investigato riguardo alle sue potenzialità di attivazione del gene per l'utrofina (*Davies, Oxford*).

Una compagnia privata, a Basel, sta testando vari gruppi di sostanze farmacologicamente attive, sintetiche o naturali, per verificarne la capacità di sovra-regolare l'utrofina. Questi test vengono svolti su muscoli umani normali e distrofici, in colture di cellule muscolari ottenute da biopsie. I primi risultati indicano che molti glucocorticoidi, tra cui il prednisone, possono sovra-regolare l'utrofina. Ma a causa dei loro effetti collaterali, questi farmaci non saranno probabilmente utilizzabili a lungo termine nella Duchenne. Basandosi sull'osservazione che alcune erbe tradizionali cinesi avevano mostrato effetti lievemente positivi sulla Duchenne, sono stati isolati diversi principi attivi da queste miscele, tra i quali unocretamente era in grado di sovra-regolare l'utrofina. Tuttavia il composto ha mostrato una attività simil-cortisonica e quindi probabilmente potrebbe causare ugualmente effetti collaterali. La compagnia sta ora lavorando su molecole con sono in grado di sovra-regolare l'utrofina senza avere gli effetti collaterali tipici dei cortisonici. (*Meier, Basel*).

Come in altri mRNA, una regione alla fine del mRNA dell'utrofina non viene traslata nella proteina. Questa regione dovrebbe contenere delle sequenze regolatorie che sembrano stabilizzare l'mRNA e dirigerlo specificamente al sito delle giunzioni neuromuscolari nella membrana delle cellule muscolari scheletriche. Potrebbe essere possibile trovare delle sostanze che possano essere in grado di intervenire su questi eventi rendendo possibile una omogenea distribuzione dell'utrofina in tutta la membrana muscolare come di solito fa la distrofina (*Jasmin, Ottawa*).

Sono stati creati dei topi mdx transgenici che

esprimono utrofina solo se ricevono della tetraciclina nell'acqua che bevono. Grazie a questi topi, sono stati sviluppati un certo numero di tests fisiologici standardizzati che saranno importanti per valutare l'effetto dell'utrofina sovra-regolata e quali possano essere utilizzabili in maniera diffusa, in modo tale da poter comparare obiettivamente i risultati ottenuti in diversi laboratori (*Gillis, Bruxelles*).

Un'altra promettente osservazione è che le infiammazioni croniche di basso grado nei muscoli di topi mdx portano ad una marcata sovra-regolazione dell'utrofina nelle regioni della membrana lontane dalle giunzioni neuromuscolari. Questo ha condotto infatti ad una mitigazione dei sintomi distrofici (*Karpati, Montreal*).

Ci sono due vantaggi nel sovra-regolare il gene dell'utrofina: (1) Le piccole quantità di utrofina, già presenti anche nei ragazzi Duchenne, farebbero in modo che il sistema immunitario possa riconoscere l'utrofina come una sostanza già conosciuta e non ci sarebbero problemi di rigetto. (2) Un ulteriore vantaggio è che un farmaco che sia in grado di sovra-regolare il gene potrebbe raggiungere tutti i muscoli e non solo quelli raggiungibili tramite una iniezione intramuscolare.

Tuttavia, una sostanza che attivi il gene dell'utrofina, potrebbe provocare anche l'attivazione di altri geni, anche se ci sono esempi di sovra-regolazioni che avvengono senza alterazione di altri geni. La selezione accurata nell'ambito delle sostanze che funzionano da attivatori, dovrebbe renderci sicuri che una futura applicazione terapeutica non produrrà effetti collaterali indesiderabili.

**Sintrofina:** Le cinque forme di sintrofina conosciute sono proteine che mediano l'interazione di proteine segnalatrici con il complesso della distrofina e dell'utrofina a livello della membrana della cellula muscolare. Gli studi su topi che mancano di  $\alpha$ -sintrofina suggeriscono che questa forma partecipi sia nella regolazione della sintesi dell'utrofina sia nell'assemblaggio del complesso dell'utrofina nella membrana della cellula muscolare. Comprendere questi effetti fin nei dettagli potrebbe risultare utile nel cercare una terapia della distrofia tramite l'utrofina (*Froehner, Chapel Hill*).

**Sovra-regolazione dell'Integrina:** Ci sono un certo numero di integrine, proteine che connettono le fibre muscolari fra loro e con la lamina basale che le circonda e che partecipano anche alla trasmissione di segnali da una cellula all'altra. I pazienti Duchenne e Becker hanno una quantità maggiore di  $\alpha 7 \beta 1$ -integrina rispetto alla

norma ed è stato suggerito che questo possa rallentare la malattia. Nei topi gravemente distrofici che non hanno né distrofina né utrofina, la catena  $\alpha 7$  dell'integrina che proveniva da ratti era espressa nei topi transgenici con il promoter creatin kinasi come attivatore e conduceva ad una maggiore quantità della subunità  $\alpha 1$ . Questa manipolazione genetica ha aumentato l' $\alpha 7\alpha 1$ -integrina di due o tre volte rispetto alla norma, con la conseguenza di estendere la longevità dei topi di circa tre volte, ridurre la cifosi, mantenere la mobilità e la struttura delle giunzioni neuromuscolari.

Perciò una quantità maggiore di questa particolare forma di integrina può aiutare la membrana cellulare del muscolo a rimanere intatta compensando per i difetti causati dalla distrofina e dall'utrofina mancanti. Le strategie per aumentare l'integrina nei ragazzi Duchenne, come possibile terapia per alleviare i sintomi della malattia, potrebbero comprendere l'inserzione di geni addizionali per l'integrina, o un trattamento farmacologico che possa sovraregolare l'attività del gene dell'integrina  $\alpha 7$  già esistente sul cromosoma 12. (Kaufman, Urbana).

**Leupeptina:** Questo è un tripeptide, che consiste di tre aminoacidi, che inibisce l'enzima calpaina. La calpaina distrugge le proteine quando il calcio entra in modo incontrollato nelle fibre muscolari, come avviene nella distrofia Duchenne e in altre malattie neuromuscolari. Collegando la leupeptina con la carnitina, l'effetto inibitore è addirittura maggiore. In esperimenti con scimmie e topi la degenerazione muscolare è stata inibita. Per il 2002 sono pianificati dei trials su pazienti. Il farmaco può essere somministrato oralmente piuttosto che per iniezione. E' possibile che anche la degenerazione muscolare tipica di altre malattie possa essere influenzata da questo trattamento (Stracher, Brooklyn).

**Stabilizzatori di membrana:** La sostanza sintetica *Polaxamer 188* (P188), che condivide molte delle proprietà chimiche delle membrane, è stata usata per stabilizzare i globuli rossi in un tipo di anemia e per prevenire danni al muscolo cardiaco durante un arresto cardiaco. Dato che la mancanza di distrofina porta ad un danno fisico della membrana muscolare, il p188 potrebbe essere usato per proteggere le fibre muscolari dall'effetto delle stress fisico. Sono in corso delle sperimentazioni sui topi mdx (Quinlan, Cincinnati).

**JNK1:** In topi senza distrofina e senza la proteina muscolare MyoD, viene attivata la proteina di segnale JNK1 e provoca l'apoptosi, un suicidio della cellula, che porta alla degenerazione delle cellule nella distrofia Duchenne. Questo effetto deleterio è dovuto alla inattivazione della proteina

muscolare NFATc1. L'iniezione diretta nel muscolo della proteina inibitore JIP1, inserita in un adenovirus, ha rallentato in maniera estremamente significativa la distruzione delle fibre. Attualmente, dei peptidi specifici, cioè piccoli pezzi di proteine, diretti contro la proteina JNK1 sono allo studio come una possibile terapia per fermare la degenerazione del muscolo nella Duchenne (Megenev, Ottawa).

**Ossido nitrico sintasi:** Nei topi mdx e nei pazienti Duchenne, la quantità di enzima NOS, nel complesso di membrana della distrofina è enormemente ridotta e addirittura il prodotto di quest'enzima, l'ossido nitrico, un gas biologicamente attivo, non riesce a svolgere le sue molteplici funzioni ed la sua assenza favorisce la degenerazione del muscolo. Un topo transgenico mdx con la normale quantità di Ossido Nitrico Sintasi ha mostrato una marcata riduzione dei segni tipici della patologia, come ad esempio l'infiammazione, le lesioni della membrana e l'attività della creatin kinasi. Un trial clinico per testare l'efficienza di farmaci anti-infiammatori nei pazienti Duchenne è in corso (Tidball, Los Angeles).

**Aumento della rigenerazione muscolare:** Dal momento che è conosciuto che la proteina *insulin-like growth factor* (IGF-1), è in grado di aumentare la sintesi proteica, sono stati fatti degli esperimenti per determinare se essa potesse essere usata per migliorare la rigenerazione nel muscolo distrofico. Sono stati creati dei topi distrofici che producessero questo fattore in quantità abbastanza significative nei loro tessuti muscolari, chiamati *strophic muscle insulin-like growth factor 1*, mIGF1. La massa muscolare di questi topi transgenici è aumentata di almeno il 40%, la fibrosi e il normale deterioramento muscolare riscontrabile nel diaframma di topi mdx anziani e nei loro quadricipiti, era sensibilmente ridotta e la rigenerazione del muscolo notevolmente aumentata (Rosenthal, Roma).

**Trasformare la pelle in muscoli:** La proteina *galectina-1* si trova nel muscolo scheletrico e nei suoi precursori cellulari, mioblasti e miotubi, e partecipa nei processi che conducono ad un nuovo tessuto muscolare. Si è visto che i fibroblasti, che sviluppano in tessuto connettivo, possono essere trasformati in fibre muscolari se vengono cresciuti in colture cellulari contenenti *galectina-1*. I fibroblasti sono stati ottenuti dalla pelle di topi neonati e feti umani. I lavori stanno proseguendo e si cerca di determinare quali siano le condizioni ideali per poter utilizzare fibroblasti provenienti da tessuti muscolari maturi. Questi fibroblasti potrebbero essere prelevati facilmente da un paziente Duchenne, potrebbero essere trasformati in muscolo tramite la *galectina-*

1, quindi modificati geneticamente per sintetizzare una distrofina normale e quindi trapiantati di nuovo nel paziente (*Watt, London*).

**Glucocorticoidi, steroidi:** Sedici studi clinici in tutto il mondo hanno dimostrato l'efficienza dei derivati del cortisone, specialmente *prednisone*, nel ridurre la perdita di forza muscolare nei ragazzi Duchenne. Quindi ci sono state indicazioni di un nuovo cortisonico, il *deflazacort*, che aveva una azione simile ma minori effetti collaterali. Dal 1992 al 1997, è stato fatto uno studio con la partecipazione di 14 centri in Germania, in questo studio sono stati comparati gli effetti, nel mantenere la forza muscolare, di due farmaci simili e rispetto al normale decorso della malattia. Le dosi utilizzate sono state 0.75 mg per kg di peso per giorno per il prednisone e 0.9 mg per kg e per giorno per il deflazacort. Entrambi i farmaci possono mantenere la forza per almeno due o tre anni ed in casi isolati, possono prolungare la capacità di camminare oltre i 14 anni. Il più grave effetto collaterale del prednisone è l'aumento di peso, (circa il 20% dei pazienti). Con il deflazacort, ci sono stati rischi moderati di cataratta (appannamento della lente dei nostri occhi) più facilmente che con il cortisone. Entrambi i farmaci hanno avuto un effetto ritardante sulla crescita, altri effetti sono stati insignificanti. Una volta interrotto il farmaco, la degenerazione muscolare riprendeva e la crescita tornava alla norma.

I risultati dello studio non permettono ancora di decidere quale sia il migliore momento per iniziare il trattamento, ad esempio prima dei 5 anni. I pazienti che desiderano iniziare questo trattamento dovrebbero farlo nell'ambito di uno studio ben documentato per poter ottenere maggiori informazioni possibili e garantire controlli estensivi a causa degli effetti collaterali. Lo studio in Germania è proseguito con una documentazione di lungo termine che include dati per alcuni pazienti che sono stati trattati per più di sette anni (*Reitter, Mainz*).

Per minimizzare gli effetti collaterali, sono stati intrapresi degli studi che prevedono la somministrazione del farmaco non quotidiana, ma a giorni alterni (*Topaloglu, Ankara*), oppure somministrando la dose settimanale in due giorni consecutivi (*Conolly, St. Louis*), o periodicamente, ad esempio tutti i primi dieci giorni di ogni mese (*Dubowitz, London*).

Nel Regno Unito, lo *steroid trial group* che comprende 16 centri neuromuscolari pediatrici sta ipotizzando un vasto trial terapeutico con gruppo di controllo con placebo, per determinare se i cortisonici siano o meno in grado di prolungare la

deambulazione e migliorare la qualità di vita. Saranno necessari per questo trial almeno 190 ragazzi Duchenne, occorreranno circa tre anni per poterli inserire nello studio e lo studio stesso durerà circa 8 anni. Verrà proposto un trattamento intermittente (10 giorni si e 10 giorni no) a basso dosaggio di prednisone presumibilmente (*Muntoni, London*).

Non si sa ancora perchè il prednisone, oppure il simile prednisolone ed il deflazacort siano in grado di ritardare la degenerazione del muscolo. Mentre una parte della loro azione certamente coinvolge la loro azione antinfiammatoria, di sicuro esistono altri meccanismi possibili. Analizzando l'attività di più di un migliaio di geni in topi mdx trattati con prednisone mediante la tecnica dei micro-arrays, si è visto che circa il 5% dei geni mostravano una attività ridotta o aumentata. Ulteriori analisi del tracciato di espressione genica indotto dai glucocorticoidi nel muscolo scheletrico potrebbero aiutare a sviluppare trattamenti più specifici e meno tossici con questi farmaci. Si spera che questo possa condurre a nuove opportunità terapeutiche (*Muntoni, London*).

*L'oxandrolone*, uno steroide anabolizzante usato a volte dagli atleti, è stato verificato in uno studio su 51 ragazzi Duchenne. Il modesto miglioramento ottenuto non giustifica però il suo uso al posto dei precedenti cortisonici (*Fenichel, Nashville*).

**Creatina:** Un'altra sostanza che forse può rallentare la degenerazione muscolare è la creatina, un composto naturale che è utilizzato in grande quantità dagli atleti per migliorare le proprie prestazioni. La creatina nella sua forma fosforilata, fosfocreatina, fornisce energia non solo per la contrazione muscolare ma anche per la rimozione del calcio superfluo, una delle cause della distruzione delle fibre muscolari. Le sperimentazioni con i topi mdx hanno mostrato che la creatina migliora la salute del muscolo e può fornire una base scientifica che ne giustifichi l'utilizzo come integratore nella Duchenne (*Wallimann, Zürich; Rüegg, Lausanne*).

Uno studio controllato, doppio cieco, con 8 ragazzi Duchenne, 10 Becker e 18 pazienti con altre malattie neuromuscolari ha mostrato, dopo 8 settimane, che una dose quotidiana di 5 grammi di creatina monoidrato nei bambini, e 10 grammi negli adulti, produce un leggero, ma significativo effetto a breve termine sulla forza muscolare senza effetti collaterali. Dovrebbero essere fatti ulteriori studi clinici per poter pensare ad un utilizzo a lungo termine nei ragazzi Duchenne (*Walter, München*).

**Studi clinici:** Studi clinici con ragazzi Duchenne saranno ancora sempre più necessari in vista dell'aumento di risultati incoraggianti nelle sperimentazioni animali. Dopo l'insuccesso del trapianto di mioblasti iniziato nei pazienti Duchenne nei primi anni 90, i ricercatori sono ora molto cauti nella pianificazione di queste sperimentazioni. Gli studi clinici che vengono pianificati devono essere condotti attraverso fasi successive, delle quali la prima, *fase I*, richiede già alcuni anni e consiste nella dimostrazione che il nuovo trattamento non sarà accompagnato da effetti collaterali indesiderabili. Solo successivamente, ulteriori studi possono accertare se il trattamento sia realmente in grado di migliorare o mantenere la forza muscolare, *fase II*, e quali siano le dosi ottimali, *fase III*. Praticamente tutti questi studi devono essere condotti come *trials doppio cieco*, cioè una metà dei pazienti riceve la sostanza che deve essere sperimentata mentre l'altra metà riceve un placebo, un composto inattivo, e né il paziente né il medico che somministra il farmaco conoscono i gruppi di appartenenza dei pazienti fino a che il trial non sia concluso ed i risultati non siano stati esaminati. Questi studi e le procedure di approvazione portano via una grande quantità di tempo, inoltre sono enormemente costosi. Tuttavia ci sono esempi di trattamenti che raggiungono in breve i pazienti come il *Gleevec*, il farmaco che è stato approvato nel 2001 in pochi mesi senza prenderne in esame tutti gli effetti collaterali dal momento che era stato dimostrato che esso era in grado di curare circa il 90% dei pazienti affetti da leucemia mieloide cronica.

Nell'ambito del *Cooperative International Neuromuscular Research Group*, CINRG, alcuni laboratori negli USA, in Canada, Belgio, Argentina, Australia, ed India stanno conducendo studi clinici su ragazzi Duchenne con sostanze che hanno mostrato risultati positivi in un programma di screening sul topo distrofico. Sono già iniziati degli studi con la creatina e la glutamina. Un trial con il coenzima Q10 in ragazzi trattati con cortisone è iniziato nell'agosto del 2001, un altro in pazienti già in carrozzina è stato pianificato. Uno studio pilota con *oxatomide* è iniziato nell'aprile 2002 ed uno con *pentossifillina* è iniziato nel mese di giugno 2002. Ulteriori trials partiranno nel 2002 con *taurina*, *carnitina* ed *acido nicotinico*. Inoltre, sono in preparazione numerosi studi di efficienza e di tossicità per molti potenziali farmaci nei topi e nei cani distrofici. Per la valutazione e la documentazione di questi studi, sono state sviluppate delle procedure di controllo standard. Non vengono misurate solo le funzioni muscolari ma altri parametri, come ad esempio la qualità di vita. Alcuni metodi sono stati modificati in modo tale da poter essere utilizzati per pazienti

molto giovani o adulti (*Escolar*, Washington).

L'organizzazione CINRG sta incontrando alcuni problemi nel trovare abbastanza pazienti che decidano di partecipare a questi trials. I pazienti che desiderano partecipare, al di fuori degli Stati Uniti, possono eventualmente contattare i centri CINRG più vicini.

**Controllo delle CK:** In Germania, bambini in età presintomatica (da 1 a 6 mesi di età), affetti da Duchenne e Becker, possono essere diagnosticati in un programma di screening volontario delle CK, in cui viene misurata la quantità di enzima creatin kinasi in una goccia di sangue. Dal 1974, più di 500,000 neonati sono stati esaminati e sono stati diagnosticati 130 ragazzi affetti da Duchenne (1:3,800) e 28 affetti da Becker (1:17,900). Questi programmi saranno necessari in futuro, perché i progressi nella ricerca terapeutica porteranno a studi su pazienti molto piccoli che non mostrano segni clinici e i cui muscoli sono ancora per lo più intatti. Un futuro trattamento sarà probabilmente in grado di fermare o di ritardare il processo distrofico, ma non di rimpiazzare il tessuto già perso (*Scheuerbrandt*, Breitenau/Freiburg).

Processi simili di screening sono stati condotti nel Wales (*Bradley*, Cardiff), in Belgio (*Eyskens*, Antwerpen), a Cipro (*Drousiotou*, Nicosia), ed in Canada (*Greenberg*, Winnipeg).

**Quando ci sarà una terapia?:** La distrofia Duchenne è sempre esistita negli uomini e negli animali che hanno il muscolo scheletrico. È stata descritta correttamente per la prima volta nel 1851 dal medico inglese *Edward Meryon*. Tuttavia, deve il suo nome al medico francese *Duchenne de Boulogne*, che descrisse nel 1861, non solo i sintomi, ma anche la sua istologia. Le modalità della sua ereditarietà, sono state scoperte intorno all'inizio del 20° secolo, quando fu riconosciuto un possibile difetto sul cromosoma X. Solo nel 1986 è stato identificato il gene responsabile della malattia, il gene della distrofina, (*Kunkel*, Boston) e poco dopo fu caratterizzata la proteina stessa, (*Hoffman*, Washington), che manca nei ragazzi Duchenne. Il rapido sviluppo della ricerca genetica ha dato speranze che presto si sarebbe potuto rimpiazzare o riparare il gene e quindi curare la malattia.

Ma questo ottimismo era prematuro. I primi studi nel 1991 con il trapianto dei mioblasti hanno mostrato che questa tecnica, che sembrava promettente nei topi, era inutile nei ragazzi Duchenne. Ora, più di sedici anni dopo la scoperta del gene, non c'è ancora una terapia. Come questo rapporto può testimoniare, il lavoro

di ricerca viene svolto mediante più di 30 modalità differenti che sono applicate nei topi e nei cani distrofici, ed alcuni addirittura in ragazzi Duchenne. Tuttavia, questi studi richiedono molto tempo e l'approvazione di un trattamento richiederà ancora molti anni.

Tutte queste necessità devono essere prese in considerazione e devono essere condotti ulteriori studi per poter raccogliere la maggior quantità possibile di dati prima di poter fare qualsiasi previsione sul "quando" sarà possibile avere una terapia sicura. La risposta a questa domanda è la

più importante per le famiglie e per i loro figli, probabilmente saranno ancora necessari molti anni prima che si possa sconfiggere questa malattia. Questo è meno di ciò che si sperava, questo è l'aspetto negativo di questo difficile problema, quello positivo è che centinaia di ricercatori preparati ed ostinati in più di 60 laboratori in tutto il mondo stanno cercando una cura: *perciò siamo sicuri che, prima o poi, ci sarà un trattamento efficace.*

### Ricercatori menzionati in questo rapporto:

I ricercatori sono elencati in ordine alfabetico, con i loro indirizzi abbreviati, e senza i loro titoli. Molti di loro sono professori, tutti hanno un MD o PhD. I loro numerosi collaboratori non sono menzionati per ragioni di spazio. Molte pubblicazioni originali, che contengono i nomi di tutti i membri di un gruppo di ricerca, possono essere richieste direttamente all'autore di questo rapporto.

Richard J. **Bartlett**, National Institutes of Health, Bethesda, MD  
Laurent **Bernheim**, Hôpital Cantonal Universitaire, Genève  
Don **Bradley**, University Hospital of Wales, Cardiff  
Serge **Braun**, Synthetic Vector Products, Transgène S.A., Strasbourg  
Kevin P. **Campbell**, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, IA  
Jeffrey **Chamberlain**, Dept. of Neurology, University of Washington, Seattle, WA  
Paula **Clemens**, Dept. of Neurology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA  
Anne **Conolly**, Dept. of Pediatric Neurology, Washington University, St. Louis, MO  
Judith C. T. **van Deutekom**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Med. Center, Leiden  
Kay **Davies**, Dept. of Genetics, University of Oxford, Oxford  
J. George **Dickson**, Royal Holloway College, University of London, Egham, Surrey  
Anthi **Drosiotou**, Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Nicosia  
Victor **Dubowitz**, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Campus, London  
Diana **Escolar**, Children's National Medical Center, Washington, DC  
François **Eyskens**, Centrum voor Opsporing van Metabole Aandoeningen, Antwerpen  
Michel **Fardeau**, Institut de Myologie, Paris  
Gerald M. **Fenichel**, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN  
Raimond **Fenwick**, Quest Diagnostics, San Juan Capistrano, CA  
Kenneth **Fischbeck**, Neurogenetics Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD  
Kevin M. **Flanigan**, Dept. of Neurology and Pathology, University of Utah, Salt Lake City, UT  
Stanley **Froehner**, Dept. of Cell Physiology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC  
Jean-Marie **Gillis**, Dept. de Physiologie, Université de Louvain, Bruxelles  
Cheryl **Greenberg**, Cadham Provincial Laboratory, Winnipeg, Manitoba  
Eric **Hoffman**, Children's National Medical Center, Washington, DC  
Paul C. **Holland**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal  
Johnny **Huard**, Children's Hospital, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA  
Bernard J. **Jasmin**, Center of Neuromuscular Diseases, University of Ottawa, Ottawa  
Robert **Kapsa**, Melbourne Neuromuscular Research Institute, Melbourne  
George **Karpati**, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal  
Stephen **Kaufman**, Dept. of Cell and Structural Biology, University of Illinois, Urbana, IL  
Louis **Kunkel**, Harvard University, Children's Hospital, Boston, MA  
Hanns **Lochmüller**, Genzentrum der Universität, München  
Ryoichi **Matasuda**, Dept. of Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo  
Fulvio **Mavilio**, Dept. of Biomedical Sciences, University of Modena School of Medicine, Modena  
Lynn **Megeney**, Health Research Institute, University of Ottawa, Ottawa, Ontario  
Thomas **Meier**, MyoContract Pharmaceutical Research AG, Basel  
Jerry **Mendell**, Dept. of Neurology, Ohio State University, Columbus, OH  
Clemens **Müller-Reible**, Humangenetisches Institut, Biozentrum der Universität, Würzburg  
Francesco **Muntoni**, Dept. of Paediatrics, Imperial College School of Medicine, London  
Gertjan B. **van Ommen**, Dept. of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden  
Terrence **Partridge**, Muscle Cell Biology Group, Hammersmith Hospital, London  
John **Quinlan**, University of Cincinnati, OH  
Thomas **Rando**, Dept. of Neurology, Stanford University School of Medicine, Palo Alto, CA  
Peter **Ray**, Division of Molecular Diagnostics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario

Nadia **Rosenthal**, European Molecular Biology Laboratory, Monterotonde, Roma  
Bernd **Reitter**, Kinderklinik der Universität, Mainz  
Urs T. **Rüegg**, Ecole de Pharmacie de l'Université, Lausanne  
Günter **Scheuerbrandt**, Testlaboratorium Breitnau, Breitnau bei Freiburg  
Rainer **Storb**, Fred Hutchinson Cancer Research Center, University of Washington, Seattle, WA  
Alfred **Stracher**, Dept. of Biochemistry, State University of New York, Brooklyn, NY  
H. Lee **Sweeney**, Dept. of Physiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA  
James G. **Tidball**, Dept. of Physiological Sciences, University of California, Los Angeles  
Haluk **Topaloglu**, Dept. of Child Neurology, Hacettepe Children's Hospital, Ankara  
Theo **Wallimann**, Institut für Zellbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich  
Maggie C. **Walter**, Friedrich-Baur-Institut, Medizinische Klinik der Universität, München  
Diana **Watt**, Dept. of Neuromuscular Diseases, Charing Cross Hospital, London  
Dominic **Wells**, Dept. of Neuromuscular Diseases, Imperial College of Medicine, London  
Steve **Wilton**, Australian Neuromuscular Research Institute, University of Western Australia, Perth  
Jon **Wolff**, Dept. of Pediatrics, University of Wisconsin Medical School, Madison, WI

Günter Scheuerbrandt, PhD. - Testlaboratorium Breitnau  
Im Talgrund 2, D-79874 **Breitnau** Germania, Tel.: +49-7652-91813-0, +49-7652-1777 Fax: +49-7652-91813-13  
e-Mail: [gscheuerbrandt@t-online.de](mailto:gscheuerbrandt@t-online.de)

Traduzione: Filippo Buccella, Duchenne Parent Project Italia, <http://www.parentproject.org>