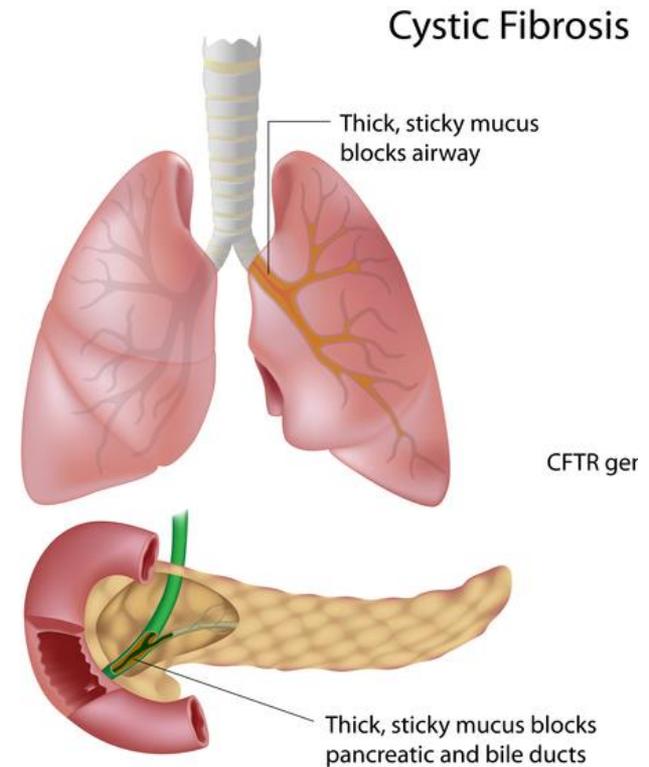


Fibrosi cistica

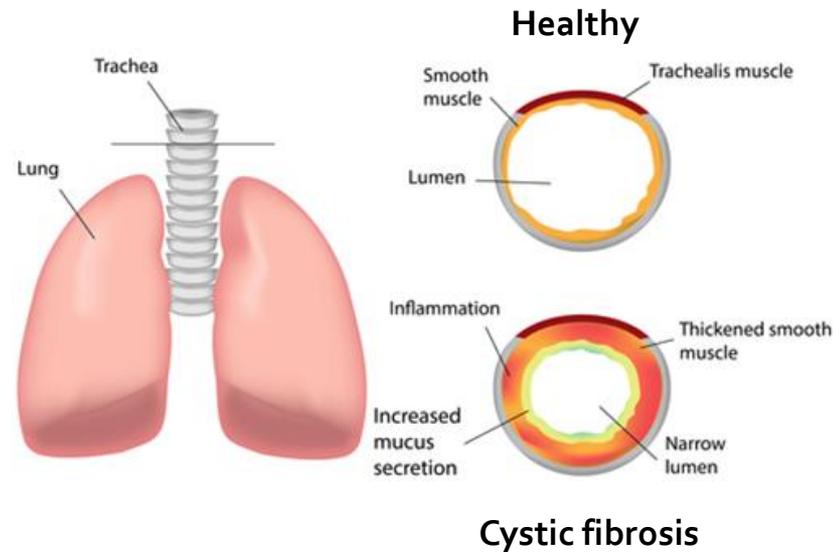
Fibrosi cistica: generalità

- La fibrosi cistica (o mucoviscidosi) è una malattia genetica che colpisce i sistemi respiratorio, digestivo e riproduttivo
- È causata dalla produzione di muco anormalmente denso.
- La malattia può portare a infezioni polmonari fatali.
- Può anche provocare disfunzione del pancreas e ostruzione ai dotti biliari, ostacolando la digestione.



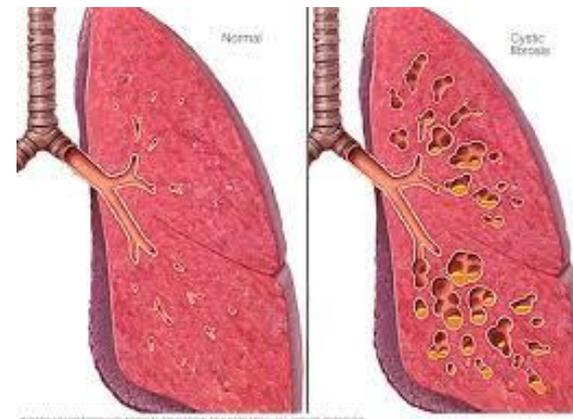
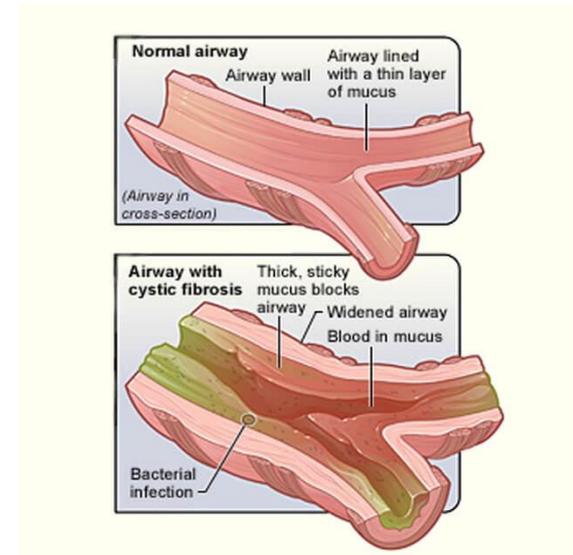
Fibrosi cistica: sintomatologia clinica

- Il muco è una sostanza viscida prodotta dalle cellule e serve a lubrificare e proteggere le mucose che rivestono le vie aeree, l'apparato digerente, l'apparato riproduttivo e altri organi e tessuti.
- Nelle persone con fibrosi cistica, il muco prodotto è anormalmente denso e appiccicoso.
- Anziché proteggere, può ostruire le vie respiratorie, causando gravi problemi respiratori e infezioni batteriche che sono causa di tosse cronica e infiammazione.
- Nel tempo, l'accumulo di muco e le infezioni provocano danni permanenti al polmone, inclusa la formazione di tessuto cicatriziale (fibrosi) e cisti.



Fibrosi cistica: sintomatologia clinica

- Il muco è una sostanza prodotta dalle cellule che lubrifica e protegge le mucose che rivestono le vie aeree, l'apparato digerente, l'apparato riproduttivo e altri organi e tessuti.
- Nelle persone con fibrosi cistica, il muco prodotto è anormalmente denso e appiccicoso.
- Anziché proteggere, può ostruire le vie respiratorie, causando gravi problemi respiratori e infezioni batteriche che sono causa di tosse cronica e infiammazione.
- Nel tempo, l'accumulo di muco e le infezioni provocano danni permanenti al polmone, inclusa la formazione di tessuto cicatriziale (fibrosi) e cisti.

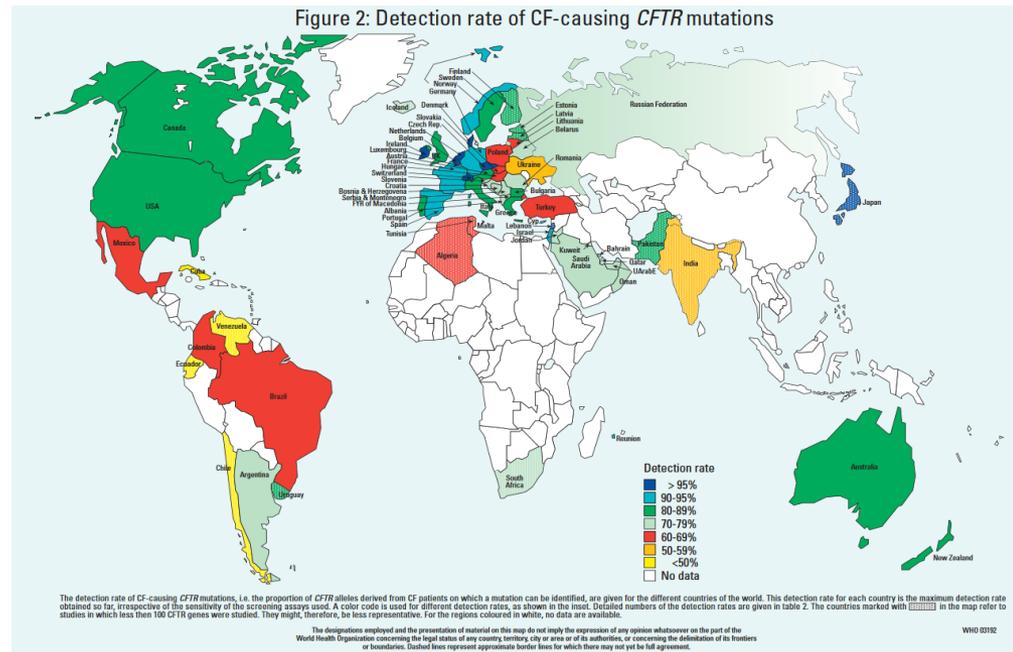


- La maggior parte delle persone con fibrosi cistica ha anche problemi digestivi.
- Il pancreas è un organo che produce insulina (un ormone che aiuta a controllare i livelli di glucosio nel sangue).
- Produce anche enzimi digestivi.
- Nelle persone con fibrosi cistica, l'accumulo di muco denso danneggia il pancreas, compromettendone la capacità di produrre sia insulina che enzimi digestivi.
- Nell'adolescenza o nell'età adulta, una carenza di insulina può causare una forma di diabete nota come diabete mellito correlato alla fibrosi cistica (CFRDM).



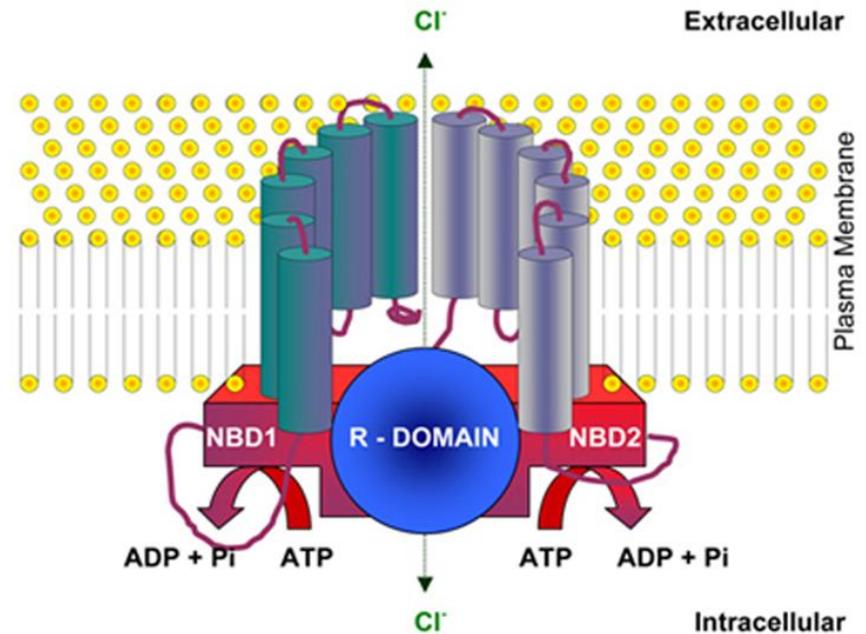
Cystic Fibrosis: Prevalence

- La fibrosi cistica (CF) è uno dei più comuni disordini genetici
- Colpisce circa 1 su 2500 individui di origine caucasica europea
- Tuttavia, l'incidenza è variabile nelle diverse popolazioni mondiali:
 - Nell'Unione europea 1 su 2000-3000 neonati sono affetti da CF.
 - Negli USA, l'incidenza di FC è 1 ogni 3500 nati
 - In Asia, la prevalenza della FC è invece più rara.



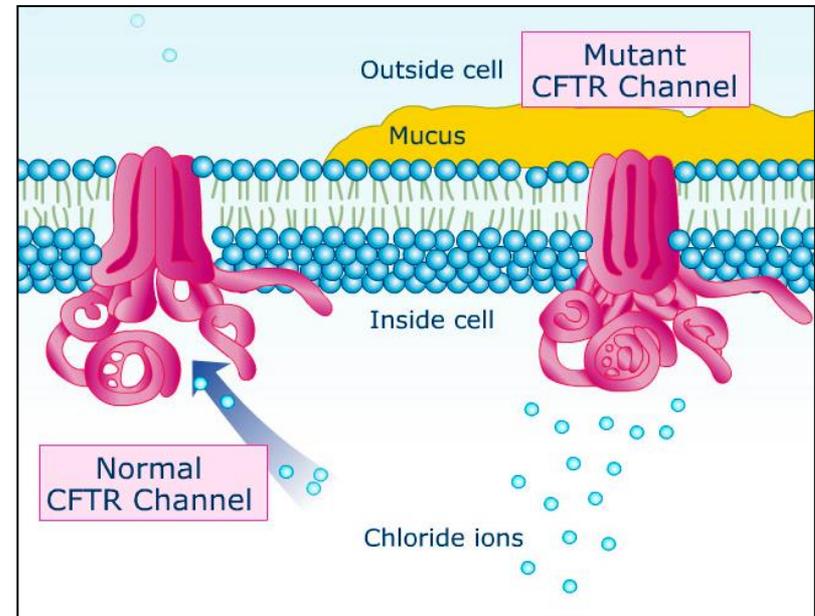
Fibrosi cistica: fisiopatologia

- La proteina CFTR funziona come un canale di membrana cellulare: un canale ionico capace di trasportare ioni cloruro (Cl⁻) dentro e fuori le cellule.
- Normalmente, la proteina consente il movimento di ioni cloruro presenti nella cellula epiteliale verso la superficie delle vie respiratorie.
- Nel fare ciò crea un gradiente osmotico capace di muovere molecole di acqua.
- Il movimento di acqua fuori dalla cellula è necessario per mantenere il muco fluido e sottile.
- Questo strato d'acqua è importante anche per consentire alle ciglia delle cellule polmonari, di muoversi e spostare il muco fuori dalle vie aeree.



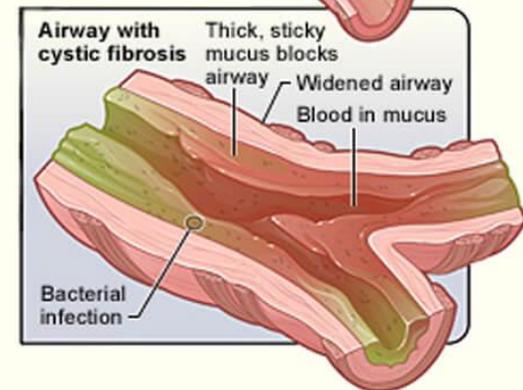
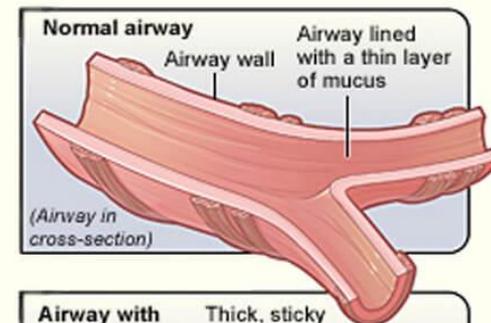
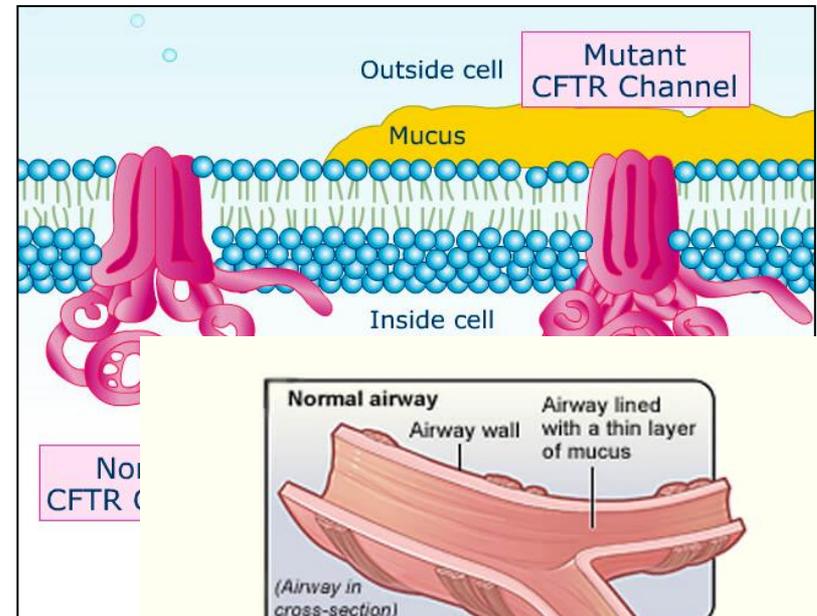
Fibrosi cistica: fisiopatologia

- La proteina CFTR funzionante è in grado di muovere ioni Cl^- verso l'esterno della cellula, e mantenere il muco sottile e fluido.
- La proteina CFTR mutante non ne è in grado, causando la formazione di muco spesso e denso.
- La proteina CFTR è ampiamente espressa nelle cellule del pancreas, epitelio intestinale e respiratorio e in tutte le ghiandole esocrine.



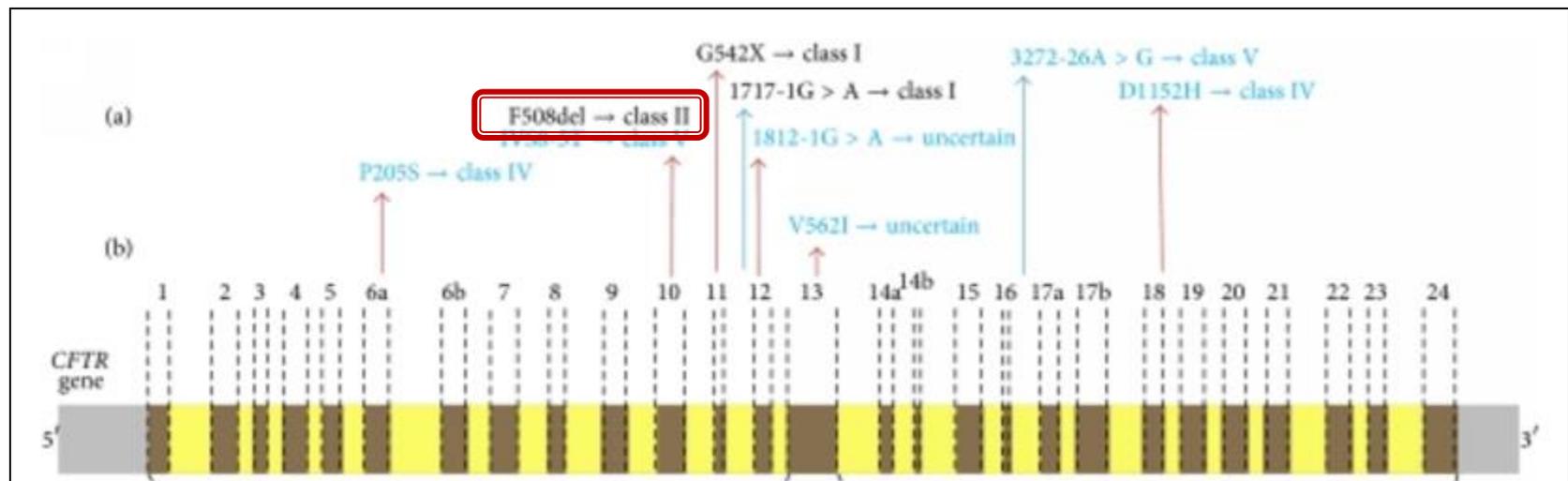
Fibrosi cistica: fisiopatologia

- La proteina CFTR funzionante è in grado di muovere ioni Cl^- verso l'esterno della cellula, e mantenere il muco sottile e fluido.
- La proteina CFTR mutante non ne è in grado, causando la formazione di muco spesso e denso.
- La proteina CFTR è ampiamente espressa nelle cellule del pancreas, epitelio intestinale e respiratorio e in tutte le ghiandole esocrine.



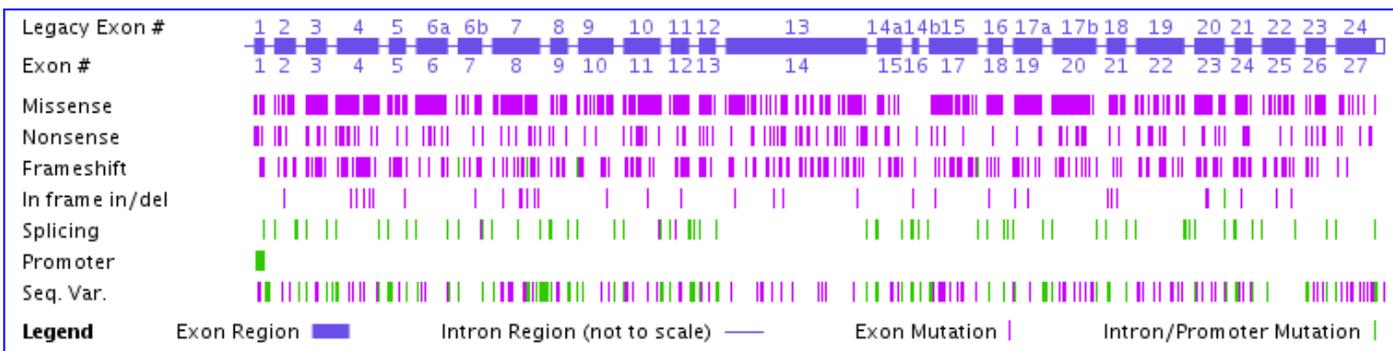
CFTR: mutazioni

- Sono oltre 1900 le varianti del gene CFTR catalogate
- La mutazione del gene CFTR più comune, p.Phe508del (storicamente chiamata **$\Delta F508$**), rappresenta oltre il 70% delle mutazioni CF nella popolazione europea.



CFTR: mutazioni

- Sono oltre 1900 le varianti del gene CFTR catalogate
- La mutazione del gene CFTR più comune, p.Phe508del (storicamente chiamata $\Delta F508$), rappresenta circa il 70% delle mutazioni CF nella popolazione europea.
- Tuttavia, la distribuzione di mutazioni CFTR note comprende tutti gli esoni, gli introni e le regioni regolatorie del gene.
- Le mutazioni nel gene CFTR possono includere mutazioni missenso, inserzioni / delezioni, nonsense, frame-shift in-frame o out-of-frame, siti di *splicing* o nel promotore.



The most common mutations are:

$\Delta F508$
G542X
G551D
N1303K
W1282X

Fibrosi cistica: mutazioni patologiche

- Le mutazioni CFTR sono state classificate in 6 classi basate sull'effetto che la mutazione ha sulla proteina CFTR:
 1. **Classe I:** mutazioni che causano un codone di arresto prematuro e provocano una sintesi proteica CFTR difettosa. In questa categoria sono incluse mutazioni Nonsense, mutazioni frame-shift, grandi delezioni e mutazioni di giunzione. Collettivamente, rappresentano circa il 10% delle mutazioni CFTR
 2. **Classe II:** mutazioni che portano a maturazione proteica difettosa. La mutazione CFTR più comune, p.Phe508del, alcune mutazioni missenso e tutte le mutazioni di delezione *in frame* rientrano in questa categoria.
 3. **Classe III:** mutazioni che provocano un difetto nella regolazione del canale che influenza il trasporto di cloruro.
 4. **Classe IV:** mutazioni che provocano una conduzione del canale difettosa a causa del restringimento del canale.
 5. **Classe V:** mutazioni causate da difetti di *RNA splicing*. Ciò porta ad una ridotta quantità di proteina.
 6. **Classe VI:** mutazioni che causano una stabilità ridotta della proteina CFTR.

	Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V	Class VI
Functional consequence	No protein synthesis	Defective trafficking or protein processing	Defect in channel regulating or "gating"	Altered channel conductance	Reduced protein synthesis	Reduced protein stability
Molecular defect	Nonsense, frameshift, deletions, splicing	Missense, in-frame deletions	Missense	Missense	Splicing, missense	Varies
Examples	p.Trp1282*	p.Phe508del	p.Gly551Asp	p.Arg117His	c.2789+5G>A	p.Asn287Tyr
	p.Arg553*	p.Asn1303Lys	p.Gly551Ser	p.Arg334Trp	p.Ala455Glu	c.4278insA
	p.Gly542*		p.Gly1349Asp	p.Arg347Pro		
	c.1717-1G>A					

Fibrosi cistica: fisiopatologia

	Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V	Class VI
Functional consequence	No protein synthesis	Defective trafficking or protein processing	Defect in channel regulating or "gating"	Altered channel conductance	Reduced protein synthesis	Reduced protein stability
Molecular defect	Nonsense, frameshift, deletions, splicing	Missense, in-frame deletions	Missense	Missense	Splicing, missense	Varies
Examples	p.Trp1282*	p.Phe508del	p.Gly551Asp	p.Arg117His	c.2789+5G>A	p.Asn287Tyr
	p.Arg553*	p.Asn1303Lys	p.Gly551Ser	p.Arg334Trp	p.Ala455Glu	c.4278insA
	p.Gly542*		p.Gly1349Asp	p.Arg347Pro		
	c.1717-1G>A					

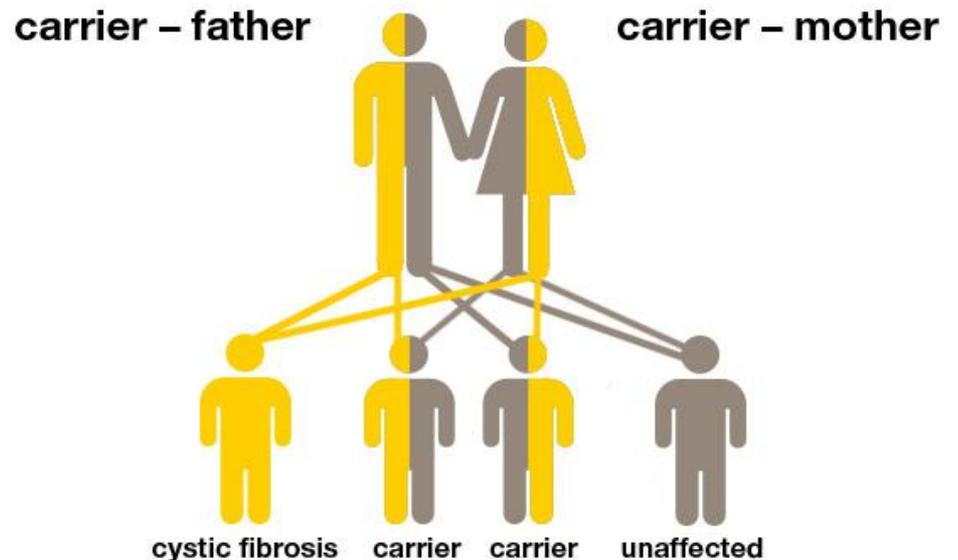
Classificazione del difetto	Normale	I	II	III	IV
					
Risultato del difetto		Nessuna sintesi	Blocco del trasporto	Blocco della regolazione	Alterazione della conduttanza
Tipo di mutazione		Nonsense; frameshift	Missense; delezione di aminoacido (ΔF508)	Missense; sostituzione di aminoacido (G551D)	Missense; sostituzione di aminoacido (R117H) (R347P)

The most common mutations are:

ΔF508 70%
 G542* 2.4%
 G551D 1.6%
 N1303K 1.3%
 W1282* 1.2%
 All others 27%

Fibrosi cistica: genetica

- La fibrosi cistica è trasmessa come carattere autosomico recessivo (AR)
- Cioè solo dall'incrocio di due portatori vi è la probabilità del 25% di nascita di un individuo omozigote affetto.
- In Europa, circa 1 su 25 individui è portatore della mutazione

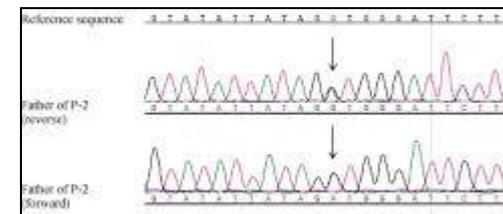


Fibrosi Cistica: Diagnosi

- La varietà di sintomi associati a CF può essere utilizzata per raggiungere una diagnosi
 - I pazienti affetti da CF hanno una pelle molto salata: il test del sudore è il saggio diagnostico standard. Essa misura la quantità di sali nel sudore. Alti livelli sono indicativi di CF.
 - Test genetici su sangue determinano chi ha un gene CFTR mutato
 - Test genetici possono essere usati anche per diagnosticare la condizione di portatore
- Risultati da Test aggiuntivi suggestivi di CF:
 - Test funzionali del fegato e del pancreas.
 - Radiografia di torace e addome
 - Ridotta secrezione di insulina tramite il monitoraggio dei livelli di glucosio nel sangue.



Chloride Concentration	Result
< 40 mmol/L	Normal
40-60 mmol/L	Borderline or indeterminate
> 60 mmol/L	Abnormal



Fibrosi Cistica: Diagnosi molecolare

- Pannello di 23 mutazioni da analizzare suggerito da ACOG (American Congress of Obstetricians and Gynecologists) e ACMG (American College of Medical Genetics)

Table 2 CFTR Mutation Frequency in CF Patients by Ethnic Group and in a Panethnic US Population

Legacy/cDNA name/HGVS protein	Non-Hispanic white	Hispanic white	African American	Asian American	Ashkenazi Jewish	Panethnic
DelF508/c.1521_1523delCTT/p.Phe508del	72.42	54.38	44.07	38.95	31.41	66.31
G542X/c.1624G>T/p.Gly542*	2.28	5.10	1.45	0.00	7.55	2.64
G551D/c.1652G>A/p.Gly551Asp	2.25	0.56	1.21	3.15	0.22	1.93
621+1G>T/c.489+1G>T/-	1.57	0.26	1.11	0.00	0.00	1.30
W1282X/c.3846G>A/p.Trp1282*	1.50	0.63	0.24	0.00	45.92	2.20
N1303K/c.3909C>G/p.Asn1303Lys	1.27	1.66	0.35	0.76	2.78	1.27
DelI507/c.1519_1521delATC/p.Ile507del	0.88	0.68	1.87	0.00	0.22	0.90
R553X/c.1657C>T/p.Arg553*	0.87	2.81	2.32	0.76	0.00	1.21
R117H/c.350G>A/p.Arg117His	0.70	0.11	0.06	0.00	0.00	0.54
3849+10kbC>T/c.3718-2477C>T/-	0.58	1.57	0.17	5.31	4.77	0.85
1717-1G>A/c.1585-1G>A/-	0.48	0.27	0.37	0.00	0.67	0.44
2789+5G>A/c.2657+5G>A/-	0.48	0.16	0.00	0.00	0.10	0.38
R347P/c.1040G>C/p.Arg347Pro	0.45	0.16	0.06	0.00	0.00	0.36
711+1G>T/c.579+1G>T/-	0.43	0.23	0.00	0.00	0.10	0.35
R560T/c.1679G>C/p.Arg560Thr	0.38	0.00	0.17	0.00	0.00	0.30
3659delC/c.3528delC/p.Lys1177Serfs	0.34	0.13	0.06	0.00	0.00	0.28
A455E/c.1364C>A/p.Ala455Glu	0.34	0.05	0.00	0.00	0.00	0.26
G85E/c.254G>A/p.Gly85Glu	0.29	0.23	0.12	0.00	0.00	0.26
R1162X/c.3484C>T/p.Arg1162*	0.23	0.58	0.66	0.00	0.00	0.30
2184delA/c.2052delA/p.Lys684Asnfs	0.17	0.16	0.05	0.00	0.10	0.15
1898+1G>A/c.1766+1G>A/-	0.16	0.05	0.06	0.00	0.10	0.13
R334W/c.1000C>T/p.Arg334Trp	0.14	1.78	0.49	0.00	0.00	0.37
3120+1G>A/c.2988+1G>A/-	0.08	0.16	9.57	0.00	0.10	0.86
Total	88.40	71.90	64.51	48.93	94.14	84.00

Adapted and modified from Watson et al,¹¹ with permission from Nature Publishing Group (*Genetics in Medicine*, copyright 2004).
CF, cystic fibrosis; CFTR, CF transmembrane conductance regulator; HGVS, Human Gene Variation Society; -, not applicable.

Fibrosi Cistica: Diagnosi molecolare

- Esistono vari metodi di analisi di genetica molecolare per evidenziare la presenza di mutazioni nel gene CFTR.

Table 4 Examples of Common Mutation Molecular Testing Methods for CF

Method	Advantages and limitations
Allele-specific PCR	Testing for known single-nucleotide variants. Initial setup/design must be performed carefully because mutation detection is on the basis of absence of PCR products.
Array-based testing Invader chemistry	Rapid, scalable testing for known single-nucleotide variants. Invader and primary nucleotide probe hybridize to target region, and fluorescent signal is generated in second reaction. Suitable for known single-nucleotide variants and small insertions and deletions.
Oligonucleotide ligation assay	Testing for known single-nucleotide variants. On the basis of differentially modified oligonucleotides for wild-type and variant alleles.
Mass spectrometry	Testing for unknown variants on the basis of mass size differences. Relatively expensive setup.
Sequencing	Gold standard for detection of unknown variants. Sequence variants are verified by sequencing of the opposite strand.
Multiplex ligation-dependent probe amplification	Forward and reverse probes must ligate for subsequent amplification. Used for identification of deletions and duplications of one or multiple exons, missed by most other approaches, including sequencing.
Next-generation sequencing	High output and economical on a per-base basis. Shorter reads and complex interpretation. Relatively expensive setup.



CF, cystic fibrosis.

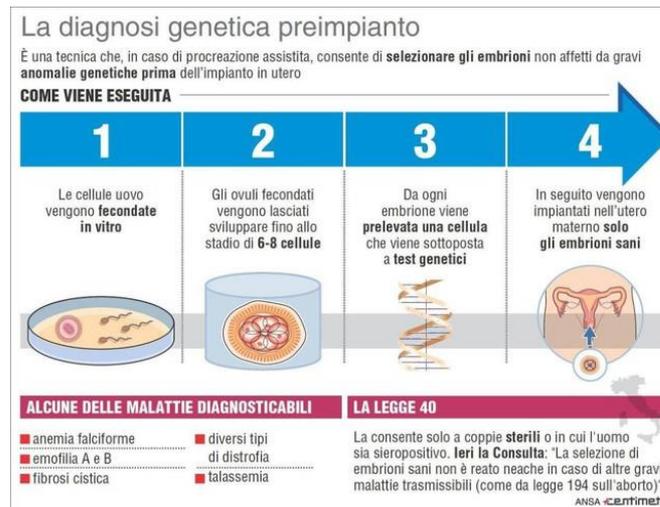
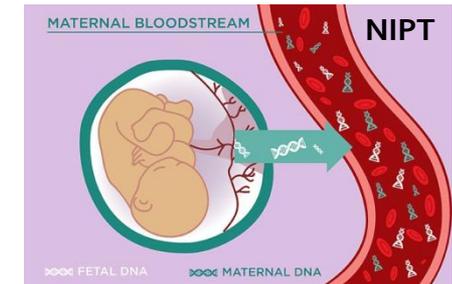
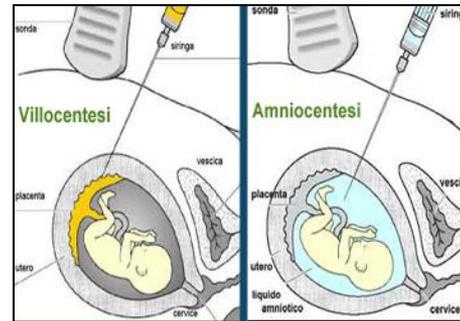
J Mol Diagn 18:3-14, 2016

- Next generation sequencing si sta affermando come il metodo che meglio consente la più completa e precisa analisi delle mutazioni note e nuove
- Un pannello NGS per uso diagnostico (Illumina) consente l'analisi di 139 diverse mutazioni

Fibrosi Cistica: Diagnosi prenatale e preimpianto

- Durante la gravidanza, di solito è possibile una diagnosi accurata di fibrosi cistica nel feto.
- Test diagnostici prenatali (amniocentesi, villocentesi o Non Invasive Prenatal Test, NIPT)
- sono fattibili in presenza di una storia familiare positiva per CF o per coppie che hanno una mutazione CF in entrambi i partner

- Nel corso di fecondazione assistita, Test genetici preimpianto sono praticabili, consentendo di ridurre significativamente la possibilità di trasmissione del carattere CF

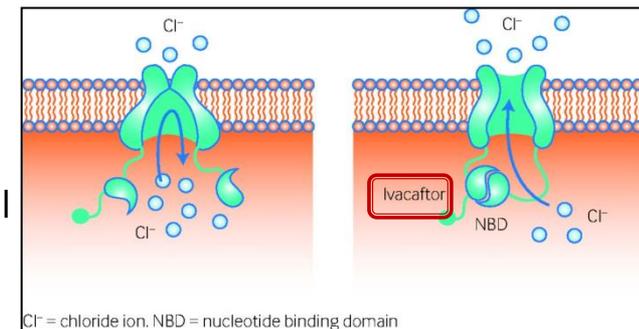


Fibrosi Cistica: Prognosi

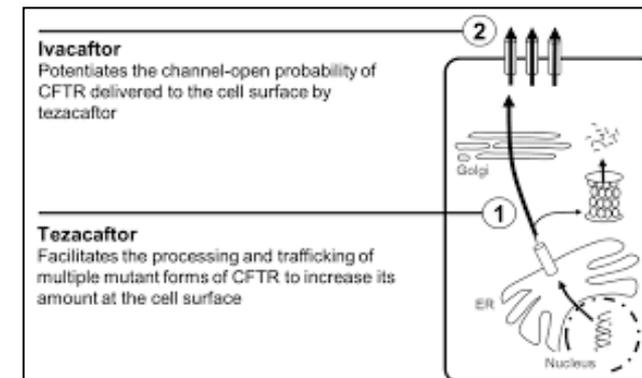
- La gravità della fibrosi cistica varia notevolmente da persona a persona
- La gravità della malattia è determinata in gran parte da quanto i polmoni sono interessati.
- Un tempo considerata malattia letale dell'infanzia, le prospettive sono tuttavia migliorate costantemente negli ultimi 25 anni, principalmente perché i trattamenti possono ora ritardare le patologie che colpiscono i polmoni. Tuttavia, il deterioramento è inevitabile e porta a disabilità e morte.
- Sebbene non siano note cure risolutive, i diversi trattamenti sono in grado di prolungare e migliorare la vita significativamente.
- Il numero di adulti con CF è in crescita costante nella popolazione
- Oggi, l'età mediana in Italia è di 41,7 anni. Alcuni pazienti superano i 50/60 anni.

Fibrosi Cistica: Management e terapie

- **Antibiotici:** individui affetti da CF assumono sempre uno o più antibiotici, anche se in salute, per la prevenzione delle infezioni.
- Sono inoltre stati sviluppati **farmaci che funzionano come modulatori e potenziatori di CFTR**. Sono farmaci che mirano a correggere il difetto della proteina CFTR.
- Poiché gli effetti terapeutici si basano su singoli specifici difetti proteici, è necessaria la conoscenza del genotipo di entrambi gli alleli CFTR per un'adeguata selezione dei pazienti.
 - Ad esempio, ivacaftor è stato approvato dalla FDA americana nel 2012, per l'uso con la specifica mutazione CFTR **G551D**. In questi pazienti migliora la funzione polmonare e riduce i sintomi respiratori
 - Nel 2018, la FDA ha approvato la combinazione ivacaftor / tezacaftor. Tezacaftor è progettata per trattare le persone con mutazione **$\Delta F508$** .
 - Nel 2019, la combinazione elexacaftor / ivacaftor / tezacaftor è stata approvata per l'uso nei pazienti che hanno una mutazione **$\Delta F508$** .

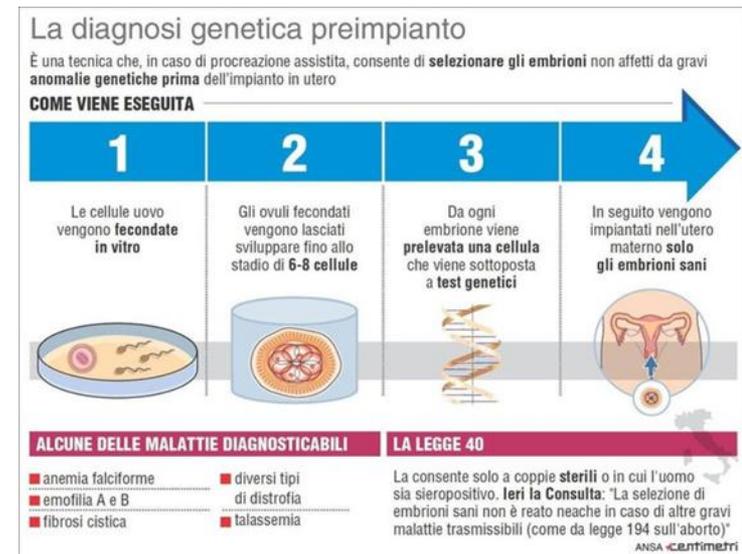


Cl⁻ = chloride ion. NBD = nucleotide binding domain



Fibrosi Cistica: Management e terapie

- Una volta adulti, i pazienti affetti da CF, possono avere ulteriori problemi di salute tra cui diabete e osteoporosi.
- La CF è causa di problemi riproduttivi: oltre il 95% degli uomini con CF è sterile.
- Con le nuove tecnologie preimpianto, è possibile che diventino padri.
- Sebbene molte donne con CF siano in grado di concepire, a causa della funzione polmonare limitata può essere difficile portare a termine la gravidanza.



Fibrosi Cistica: Management e terapie

Il trapianto di polmone, negli ultimi 10 anni, è divenuta una possibilità in grado di prolungare l'aspettativa di vita anche nelle forme più gravi

**Trapiantati 4
organi su paziente
con fibrosi cistica.
E' la prima volta in
Europa**



Counseling genetico

- Vista la frequenza nella popolazione, coppie che hanno programmato di avere figli, potrebbero voler sapere qual è la probabilità di avere figli con la malattia.
- I test genetici su campione di sangue possono aiutare a determinare se nella coppia è presente uno o più geni CFTR difettosi.
- A meno che entrambi i genitori non abbiano almeno uno di questi geni, i loro figli non svilupperanno CF.
- Se entrambi i genitori portano un gene CFTR difettoso, ogni gravidanza ha una probabilità del 25% di produrre un bambino con fibrosi cistica.

- La coppia va informata che durante la gravidanza, è di solito possibile acquisire una diagnosi prenatale accurata di CF del feto.

- Inoltre, è anche possibile, attraverso metodi di procreazione assistita, ottenere test genetici preimpianto per evitare di impiantare embrioni malati.

- In questa lezione, abbiamo imparato:

1. La fibrosi cistica è una malattia genetica frequente nei paesi occidentali
2. Quale sia il gene e la proteina implicata
3. Quale sia la funzione della proteina CFTR
4. Quali siano le mutazioni geniche più frequenti
5. Quali siano gli effetti di tali mutazioni sulla funzione della proteina
6. Quali siano gli approcci per diagnosi e cura
7. Come la consulenza genetica possa spiegare a genitori e parenti i rischi di trasmissione e le possibilità di gestione oggi disponibili

FINE