

Reparto Fisiopatologia dei radicali

In questi ultimi 10-15 anni i radicali liberi hanno conquistato un posto di grande rilevanza nella medicina. Questo interesse è legato alla constatazione che i radicali prodotti dai tessuti, inoltre, svolgono sia funzioni di messaggeri inter o intracellulari sia funzioni citotossiche nell'immunità innata. Il danno ossidativo prodotto dai radicali è presente in numerose, se non in tutte, le patologie ed è la causa di patologie a larghissima diffusione come i tumori e le malattie cardiovascolari. Gli studi effettuati nel 2007 sono stati:

- Meccanismi di *signaling* del perossinitrito (ossidante fisiologico derivato dalla reazione tra i radicali ossido nitrico e superossido). In questo anno abbiamo dimostrato che il trattamento con perossinitrito di eritrociti umani induce la comparsa di marcatori cellulari caratteristici della senescenza e dell'apoptosi. L'apoptosi sembra essere un evento metabolicamente reversibile e associato all'ossidazione di target intracellulari, mentre la senescenza sembra legata principalmente all'ossidazione irreversibile di target di membrana mediata da radicali. Abbiamo verificato mediante studi ¹³C, ³²P NMR che il perossinitrito induce una attivazione del metabolismo cellulare coinvolgendo il *pathway* dei pentoso fosfati. Mediante inibitori specifici della glicolisi sono in corso studi volti a caratterizzare il possibile meccanismo di *signaling* indotto dal perossinitrito.
- Valutazione degli eritrociti umani come "bio-sensori" in pazienti con *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD). Gli eritrociti sono stati da noi proposti come "bio sensori" della progressione di alcune patologie su base infiammatoria caratterizzate da una eccessiva produzione di radicali. Il comportamento anti- o pro-ossidante di una *reporter cell* come l'eritrocita può quindi determinarne la funzione e il destino. L'eritrocita può divenire quindi un *tool* di laboratorio per valutare la diagnosi, la progressione della malattia o l'efficacia di un trattamento farmacologico, come suggerito dal miglioramento osservato in pazienti COPD dopo trattamento con antiossidanti.
- Metabolismo di farmaci nella saliva a pH gastrico. Il clenbuterolo, un farmaco adrenergico b2-agonista usato come broncodilatatore ma anche come farmaco d'abuso, subisce una trasformazione nella saliva a pH acido. Il clenbuterolo reagisce con specie nitrosanti formando composti il cui potenziale citotossico e genotossico è poco conosciuto.
- Modulazione del *signaling* e del rilascio di superossido in macrofagi indotta da proteine virali (nef di HIV).
- Ruolo dell'emoglobina e degli eritrociti ossidati nella attivazione delle cellule endoteliali e dendritiche. L'emoglobina ossidata è in grado di attivare cellule endoteliali e dendritiche mentre gli eritrociti svolgono un'azione protettiva.
- Meccanismi molecolari del danno ossidativo nelle patologie neurodegenerative. Si è studiato un modello sperimentale della corea di Huntington. Gli studi hanno dimostrato che l'acido chinolinico, attraverso l'attivazione del recettore NMDA, stimola la sintesi di ossido nitrico, prodotto dalla nNOS e, di conseguenza, attiva i segnali cellulari dipendenti dalla fosforilazione in tirosina coinvolgendo le chinasi della famiglia di src.

Reparto *Imaging* molecolare e cellulare

Le attività del Reparto sono state principalmente finalizzate alla identificazione di nuovi indicatori di patologia e di *endpoint* farmacologici nel campo delle malattie tumorali e neurodegenerative, mediante lo sviluppo e la validazione di approcci integrati di *imaging* molecolare e cellulare in modelli sperimentali.

Nel campo dell'oncologia sperimentale, sono state sviluppate le seguenti linee di ricerca:

- Valutazione del significato del ciclo della fosfatidilcolina (PC) nella progressione del carcinoma ovarico. In particolare, sono state determinate le attività di enzimi coinvolti nei *pathway* di biosintesi e catabolismo della PC, come base per l'identificazione di nuovi bersagli molecolari di terapie mirate.
- Ruolo di una fosfolipasi PC-specifica (PC-PLC) nei processi proliferativi delle cellule di carcinoma ovarico e mammario.
- Ruolo della PC-PLC nella espressione di recettori di membrana in cellule di tumore mammario umano over-esprimenti Erb-B2 e in cellule NK umane, in relazione ai meccanismi di traffico cellulare e alle strutture citoscheletriche.
- Messa a punto di modelli preclinici di carcinoma ovarico umano in topi immunodepressi.
- Sviluppo di un metodo di analisi quantitativa del segnale ¹H-NMR della colina *in vivo*, durante la crescita tumorale e nella risposta a chemioterapici.
- Studi di Risonanza Magnetica (RM) *in vivo* sull'effetto del blocco farmacologico dei recettori metabotropici del glutammato in modelli sperimentali di gliomi ottenuti dall'impianto di cellule primarie e staminali di glioblastoma umano.
- Valutazione del significato di parametri RM in relazione alla risposta apoptotica indotta dall'interazione della rodanese con composti allil-tiosolfati in cellule leucemiche umane. Infine, sono stati svolti studi per la valutazione mediante NMR *in vivo* delle modulazioni di pH indotte in tumori sperimentali da inibitori delle pompe protoniche.

Nel campo della diagnostica oncologica, nel 2007 è stato concluso uno studio multicentrico non-randomizzato, iniziato nel 2000 e coordinato dall'ISS a livello nazionale, volto a definire il ruolo dell'*imaging* RM nella diagnosi precoce del carcinoma mammario in soggetti ad alto rischio genetico-familiare. È stato inoltre attivato un Network italiano di sorveglianza multimodale di donne ad alto rischio di tumore mammario (Accordo tra ISS e Ministero della Salute).

Nel settore delle malattie neurodegenerative sono state effettuate ricerche nell'ambito delle seguenti tematiche:

- Caratterizzazione del profilo metabolico e neurochimico di un modello di ADHD nel ratto. Sono stati inoltre effettuati esperimenti di *imaging* funzionale su cervello di ratti adolescenti e adulti a seguito di attivazione farmacologica.
- Sono state avviate prove di *imaging* RM pesato in diffusione e di spettroscopia RM *in vivo* su topi C57BL esposti a una dose acuta di clorpirifos.
- Progettazione, realizzazione e valutazione di probe RM fluorurati per la rivelazione *in vivo* di placche amiloidi in modelli murini di encefalopatie spongiformi trasmissibili e di malattia di Alzheimer.

Altre collaborazioni hanno riguardato i seguenti temi:

- Ruolo della PC-PLC nella produzione di CCL2 indotta da gp120 nel macrofago umano.
- Studio del metabolismo glucidico eritrocitario dopo stress ossidativo indotto da perossinitrito.
- Caratterizzazione strutturale di glucani isolati dalla parete cellulare di *C. albicans*.
- Sviluppo di un nuovo metodo per la misura della forza di torsione generata dal campo magnetico statico di uno strumento RM *in vivo* su una protesi cardiaca meccanica.

Reparto Immunoregolazione

L'interesse generale del Reparto Immunoregolazione è incentrato sullo studio dei meccanismi coinvolti nella modulazione delle risposte del sistema immunitario in alcune situazioni fisiologiche e patologiche.

L'attività del Reparto tende a focalizzarsi sempre più verso la ricerca traslazionale affiancando al tradizionale studio dei modelli animali il disegno e l'esecuzione di trial clinici in pazienti affetti da tumore.

Nel corso del 2007 sono state svolte le seguenti attività.

- *Coordinamento del progetto di ricerca finalizzata “Sviluppo di nuove strategie di immunoterapia e terapie combinate contro i tumori”*

Il progetto è terminato con uno studio clinico di fase I-II per la valutazione dell'efficacia di una vaccinazione contro antigeni di melanoma in associazione a chemioterapia. L'analisi dei parametri ematochimici e immunologici ha mostrato un evidente beneficio del pretrattamento con il chemioterapico che ha mostrato una maggiore efficacia anche in termini di tempo libero da malattia e di sopravvivenza. È stata effettuata, inoltre, mediante *microarray*, un'analisi dell'espressione genomica globale che ha indicato come il trattamento chemioterapico sia in grado di modulare rapidamente l'espressione di geni coinvolti nel controllo della risposta immune.

- *Studio della combinazione di chemioterapia e immunoterapia in modelli animali*

Questo progetto di ricerca preclinica ha fornito ulteriori indicazioni sui meccanismi del sinergismo della combinazione di chemioterapici e immunoterapia utili per il disegno di nuove strategie terapeutiche in pazienti oncologici. Ulteriori studi sono in corso per comparare l'efficacia di diversi chemioterapici nel modulare positivamente la risposta immune a vaccini antitumorale in modelli murini.

- *Studio dell'effetto di interferon di tipo I (IFN) come adiuvante nella vaccinazione contro antigeni virali e tumorali*

L'insieme degli studi condotti ha permesso di stilare un rapporto conclusivo sull'attività immunoadiuvante di IFN alfa sia nella vaccinazione classica che in quella mucosale.

- *Studio dell'immunità innata nella vaccinazione tubercolare di neonati e bambini*

Nell'ambito di questo progetto europeo sono stati caratterizzati il fenotipo e la funzione delle cellule dendritiche in età neonatale sia nell'uomo che nel topo e sono in corso studi molecolari sui meccanismi di trasduzione del segnale nelle DC neonatali umane.

- *Studi sugli effetti immunomodulatori di HIV-1 e della sua glicoproteina di superficie gp120 su macrofagi e DC*

Gli studi condotti hanno portato all'identificazione della fosfolipasi C fosfatidil-colina-specifica come componente essenziale nelle vie di trasduzione del segnale attivate dalla gp120 di HIV-1 e responsabili dell'induzione di CCL2. È stato anche analizzato il ruolo delle fosfolipasi C fosfatidil-inositolo-specifiche nella produzione di chemochine indotta da gp120, e sono stati condotti studi sulla capacità di HIV-1 di regolare l'espressione di CCL1. Abbiamo inoltre studiato la regolazione dell'espressione di CCL2 in cellule dendritiche (DC), osservando che questa chemochina è regolata in maniera peculiare da alcuni ligandi dei recettori Toll (TLR). Inoltre, è stata osservata una relazione inversa tra la produzione di CCL2 e quella dell'IL-12 indotta dai diversi ligandi, che suggerisce l'esistenza di un complesso circuito regolatorio. Sono in corso studi atti a determinare i meccanismi che regolano positivamente e negativamente l'attività di TLR in DC e macrofagi, così come i bersagli cellulari coinvolti.

- *Studio sul ruolo di lipidi bioattivi nell'infezione di HIV-1 di cellule del sistema immunitario*
Abbiamo analizzato il possibile coinvolgimento di una nuova famiglia di immunoregolatori presenti nei fluidi biologici, i lipidi bioattivi, nel controllo della replicazione di HIV-1 trovando un effetto potenziante sulla replicazione virale in macrofagi umani ma non in linfociti T CD4+ dello stesso donatore. Abbiamo osservato che tale diversità di effetti potrebbe essere ricondotta ad un pattern di espressione complementare dei recettori specifici di tali molecole nei due tipi cellulari. Studi sui meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione del ciclo di HIV-1 da parte di lipidi bioattivi sono attualmente in corso.
- *Studi sull'interazione reciproca tra cellule dendritiche e linfociti T gd*
Gli studi precedentemente svolti sono stati estesi alla caratterizzazione degli effetti di HIV-1 sul circuito attivatorio bi-direzionale tra DC generate da monociti e linfociti T gd autologhi. I risultati ottenuti indicano che le DC pre-esposte al virus hanno una ridotta capacità di stimolare l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T gd in risposta ai fosfoantigeni. Abbiamo inoltre osservato che l'esposizione delle DC al terreno condizionato di linfociti T HIV-infetti le rende suscettibili all'infezione con ceppi di HIV-1 T-tropici. Sono in corso studi volti all'identificazione dei meccanismi coinvolti.
- *Studi sui fattori coinvolti nel differenziamento e attivazione di DC*
Gli studi svolti hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra l'espressione della catena alfa del recettore del GM-CSF e la capacità dei monociti di differenziare in DC in risposta a quest'ultimo. Tali risultati indicano che il GM-CSF svolge un ruolo importante nel differenziamento dei monociti in DC, che non è ristretto alla sua attività come fattore di sopravvivenza.
- *Studi sulla regolazione da citochine dell'attività fagocitica dei macrofagi*
Studi iniziali hanno evidenziato che l'IFN- β è in grado di inibire l'espressione del recettore del mannosio e conseguentemente l'attività fagocitica dei macrofagi, effetto che viene recuperato in seguito a esposizione di questi ultimi a IL-3.
- *Studi sugli effetti immunomodulatori della lattoferrina bovina*
In un modello di macrofagi peritoneali murini abbiamo saggiato la capacità della lattoferrina bovina di modulare la risposta di queste cellule all'infezione virale. Tali studi hanno dimostrato che la lattoferrina promuove l'espressione di IFN di tipo I che a sua volta è responsabile dell'induzione di stato antivirale contro il virus della stomatite vescicolare. Abbiamo inoltre iniziato studi volti a definire gli effetti della lattoferrina sul differenziamento/attivazione di DC umane. I risultati ottenuti indicano che la bLf interferisce con la maturazione di tali cellule indotta da LPS e polyI:C.
- *Studi sull'utilizzo della tecnologia degli RNA interferenti nella modulazione della risposta immune*
Abbiamo messo a punto le condizioni ottimali per la trasduzione transitoria, mediante lipidi cationici, o stabile utilizzando vettori lentivirali, di monociti e DC con RNA interferenti, in grado di silenziare in modo specifico. Nel corso dell'anno abbiamo ottenuto il silenziamento della STAT3 in DC, un fattore trascrizionale coinvolto nel loro differenziamento/attivazione, e stiamo attualmente studiando le conseguenze fenotipiche e funzionali di tale silenziamento.
- *Studi sul ruolo del tessuto adiposo nella regolazione dell'infiammazione e della risposta immune*
Sono stati iniziati nuovi studi atti a definire il ruolo del tessuto adiposo e di fattori solubili da esso prodotti nell'infiammazione associata ad obesità e nella regolazione della risposta

immune. A tal fine, abbiamo messo a punto le condizioni per l'isolamento di adipociti e cellule del sistema immunitario da biopsie di grasso omentale di individui normopeso, soprappeso e obesi allo scopo di identificare alterazioni funzionali di adipociti e DC di rilevanza nell'insorgenza dell'infiammazione e disfunzioni immunologiche osservate nei pazienti obesi.

– *Progetto IRF-8*

Nell'ambito degli studi sul ruolo di IRF-8 nel differenziamento e nell'attività funzionale di cellule dendritiche in modelli pre-clinici la ricerca scientifica è stata così articolata:

- Modello murino "IRF-8 KO": i) analisi del ruolo di IRF-8 nel controllo dell'*uptake* di antigeni tumorali (EG7-OVA) in cellule dendritiche e loro presentazione a linfociti CD8+; ii) studio di espressione e regolazione genica e di microRNA in popolazioni di cellule dendritiche da topi IRF-8KO/WT± trattamento con IFN-I; iii) studio del ruolo di IRF-8 e delle popolazioni di cellule dendritiche da esso controllate nell'infezione da *Mycobacterium Tuberculosis* e in strategie vaccinali per la TB; iv) studio del ruolo di IRF-8 nel cross-talk tra cellule dendritiche e cellule T regolatorie.
- Modello umano: i) messa a punto di protocolli di silenziamento di IRF-8 in cellule dendritiche umane differenziate *in vitro* ±IFN-I.

– *Progetto IRF-1*

Questo progetto è stato finalizzato allo studio del ruolo del fattore di trascrizione IRF-1 nel differenziamento e nell'attività funzionale di cellule T regolatorie e nel *cross-talk* tra cellule dendritiche e cellule T regolatorie avvalendosi del modello dei topi IRF-1-KO.

– *Progetto IFN-DC*

Gli studi nell'ambito di questo progetto sono stati finalizzati a: i) studiare la via del segnale di LOX-1 nella capacità di cross-presentazione di antigeni da cellule apoptotiche in cellule dendritiche differenziate in presenza di IFN-I; ii) studiare l'espressione dei microRNA e loro silenziamento in IFN-DC.

– *Progetto BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites)*

Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS) è un gene *cancer testis* di nuova identificazione. Gli esperimenti condotti nell'ambito di questo progetto sono stati indirizzati ad identificare l'immunogenicità del peptide BORIS8-17 HLA-A(*)02.01-ristretto e hanno evidenziato che una risposta BORIS-specifica CD8+ T può essere indotta *in vivo* in topi transgenici per HLA-A(*)02.01 e *in vitro* in donatori HLA-A(*)02.01 sani. Sono state inoltre avviati le seguenti linee di ricerca: i) caratterizzazione dell'espressione di BORIS e sua modulazione da farmaci selezionati e generazione di linfociti CD8+ antigeni specifici; ii) caratterizzazione e regolazione dell'espressione di BORIS in cellule staminali da pazienti con cancro del colon e generazione di linfociti CD8+ antigeni specifici da PBMC di pazienti con cancro del colon BORIS+. Va sottolineato che gli esperimenti condotti nell'ambito di questo progetto hanno incontrato una serie di difficoltà, oggi in via di risoluzione, dovute ad assenza di reagentario, infezione dei topi transgenici, complessità scientifica e pratica degli esperimenti su cellule primarie umane.

– *Progetto Microarray. Laboratorio di Ricerca dei Microarray (LaRiM)*

Le attività in questo ambito sono state finalizzate per raggiungere tre obiettivi principali:

- Completare le prove di settaggio e validazione per la produzione di vetrini umani (34,580 70mer oligos della banca genomica umana della Operon Version 3.0).
- Messa a punto del *reference* da utilizzare negli esperimenti condotti nella *facility*.

- Progetti di ricerca di base e pre-clinica: i) studio della modulazione genica in popolazioni di cellule dendritiche da topi IRF-8 KO *versus* WT; ii) analisi dell'attività precoce di IFN di tipo I su cellule dendritiche di topi IFNAR-KO e WT; iii) *Development of a novel approach in hazard risk assessment of reproduction toxicity by a combination and application of in vitro, tissue and sensor technologies*; iv) *New therapeutics selective for TNF receptor subtypes and humanized animal models*.

Reparto Immunoterapia sperimentale

Il Reparto ha continuato un complesso di attività di ricerca preclinica nel settore dell'immunoterapia dei tumori. In particolare, si possono evidenziare le seguenti attività principali:

- Studi pre-clinici per la valutazione dell'efficienza di cellule dendritiche generate in presenza di IFN-alfa (IFN-DC) (secondo il metodo oggetto del brevetto US 09/845042-WO 02/088328) come adiuvanti cellulari di vaccini terapeutici contro il cancro o infezioni croniche gravi, con particolare riferimento alla capacità di mediare la cross-presentazione di antigeni assunti da cellule apoptotiche e di indurre il cross-priming di linfociti T CD8+ specifici.
- Applicazione di strategie di *microarray* per il monitoraggio immunologico di pazienti arruolati in protocolli clinici di immunoterapia, mediante lo studio dei profili di espressione genica delle cellule del sangue.
- Studi finalizzati allo sviluppo di una nuova piattaforma di *microarray* per analizzare la presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nei geni codificanti citochine e proteine ad esse correlate nel DNA di pazienti coinvolti in protocolli di immunoterapia.
- Studio dell'attività di polarizzazione delle cellule T-helper CD4 in senso TH1 e TH17, nella risposta primaria indotta da IFN-DC.
- Attività propedeutiche all'autorizzazione del laboratorio GMP FaBioCell alla produzione di farmaci cellulari:
 - sviluppo del Sistema di Qualità necessario alla gestione delle attività di produzione e controllo qualità;
 - convalida dell'impianto di trattamento aria e della strumentazione;
 - convalida del personale allo svolgimento di attività definite;
 - sviluppo e convalida dei principali metodi di controllo qualità.

Il Reparto è stato anche coinvolto nella formulazione di pareri su nuovi farmaci cellulari basati sull'uso di cellule dendritiche e sui relativi protocolli clinici.

Reparto Malattie rare

Il Reparto Malattie Rare svolge attività correlate alle malattie rare e farmaci orfani, sia a livello nazionale che internazionale.

In particolare, vengono svolte le seguenti attività:

Attività di ricerca:

Attraverso la collaborazione con i National Institutes of Health (NIH, USA) nell'ambito del Programma "Malattie Rare, accordi Italia-Usa" sono stati sviluppati progetti di ricerca su selezionate patologie rare (es. sindrome di Nijmegen 2003-5) e tumori rari (es. tumori delle ghiandole salivari, epatoblastoma 2005-9). Per lo studio di queste patologie vengono

utilizzate metodologie di citogenetica molecolare, per l'analisi delle alterazioni cromosomiche, e di genetica molecolare, per l'analisi dettagliata di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e nel mantenimento della stabilità genomica.

In particolare il Reparto Malattie rare è impegnato nella realizzazione dei seguenti progetti nell'ambito dell'accordo ISS-NIH:

- “*Salivary gland tumors: different approaches to identify genetic and prognostic markers*”

Studio di alterazioni genetiche ed epigenetiche in tumori rari delle ghiandole salivari. Sono stati raccolti ad oggi, in collaborazione con l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Bologna – Dr.ssa MP Foschini – e con l'Istituto IFO Regina Elena di Roma – Dr. Marandino – campioni di tessuto paraffinato da venti pazienti con tumori di diverso istotipo (quindici casi di carcinoma adenoido-cistico, ACC, cinque di carcinoma mucoepidermoide, un carcinoma mio-epiteliale e un carcinoma polimorfo-*low grade*). L'analisi citogenetica molecolare, mediante *Comparative Genomic Hybridization* basata su metafase, è stata eseguita su dodici campioni di diverso istotipo (dieci ACC, un carcinoma mioepiteliale e un carcinoma polimorfo *low grade*); i risultati hanno rilevato eterogeneità genetica, con una maggioranza di amplificazioni rispetto alle delezioni e nessuna anomalia ricorrente. L'analisi molecolare è stata focalizzata su geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e nei meccanismi patogenetici di tumori; in particolare ad oggi sono stati studiati i geni p53, CDKN2A (p16INK4A, p14ARF), CDKN2B, TP53, H-RAS, N-RAS, K-RAS, PTEN, LEU, MYC, BAT-26, CYLD, IFNA. Lo studio dei suddetti geni è stato eseguito mediante analisi dei microsatelliti, ove era disponibile il tessuto normale del campione in esame, e mediante analisi di mutazione. Risultati preliminari hanno evidenziato eterogeneità genetica tra i diversi tumori analizzati e all'interno dello stesso sottotipo istologico.

- “*Tackling rare diseases yet lacking diagnosis and/or prognosis: a pilot project integrating data collection and experimental studies*”

Obiettivi principali di questo progetto sono: i) comprendere e definire il ruolo e le interazioni di contaminanti ambientali quali gli ftalati (DEHP, DBP) con i *pathway* molecolari deregolati nell'epatoblastoma (HB); ii) analizzare e caratterizzare i *pathway* molecolari (Wnt/b-catenina e IGF2) implicati nella patogenesi dell'HB e comuni ad altri tumori rari caratterizzati da condizioni multi-fattoriali; e, infine, iii) caratterizzare alcuni marcatori precoci per la diagnosi e la prognosi dell'HB. Lo studio prevede lo sviluppo di un modello basato su approcci integrati di tipo *in vitro* (cellule epatiche primarie, di epatocarcinoma e di HB) e *in vivo* (impiego di un modello animale e campioni tissutali di HB) al fine di migliorare la comprensione della patogenesi dell'HB e dei meccanismi ad essa sottesi. Questo studio ha come scopo il miglioramento della comprensione dei *pathway* molecolari coinvolti in induzione e progressione dell'HB attraverso la caratterizzazione di possibili marcatori molecolari precoci di diagnosi e/o prognosi. Inoltre, la caratterizzazione a livello molecolare del ruolo degli ftalati su cellule epatiche *in vitro* e *in vivo* permetterà una migliore valutazione del rischio-beneficio legato all'esposizione ambientale e alimentare in fase pre-natale.

Sorveglianza epidemiologica attraverso il Registro Nazionale Malattie Rare (RNMR):

Il Registro mira ad ottenere informazioni epidemiologiche (in primo luogo il numero di casi di una determinata malattia rara e relativa distribuzione sul territorio nazionale) utili a definire le dimensioni del problema. Il Registro ha lo scopo, quindi, di definire la

prevalenza/incidenza delle malattie rare, identificare i possibili fattori di rischio, supportare la ricerca clinica e promuovere il confronto tra operatori sanitari per la definizione di criteri diagnostici.

Le attività del Registro sono state incentrate sulla raccolta dei dati di incidenza e/o prevalenza di malattie rare, attività iniziata nel 2001 e si è avvalsa della collaborazione di Centri o Presidi regionali identificati mediante le specifiche deliberazioni regionali. Attualmente tutte le Regioni hanno individuati i Presidi con Delibere Regionali.

Dal 2006 il Centro Nazionale Malattie Rare (CNMR) ha messo in atto una nuova modalità di raccolta dati che include un nuovo software; tale strumento può essere utilizzato sia dai singoli presidi/centri abilitati alla diagnosi e al trattamento dei pazienti affetti da malattie rare sia dai Responsabili dei Centri di Coordinamento Regionale che coordinano le attività e fanno da tramite tra l'ISS e i singoli presidi/centri.

I dati del RNMR sono stati utilizzati anche per le attività svolte nell'ambito del Tavolo Interregionale per le Malattie Rare in Conferenza Stato-Regioni per l'aggiornamento dell'allegato 1 del DM 279/2001.

Ad oggi, tutti i Referenti Regionali sono stati contattati e per alcune Regioni (quali ad esempio Calabria, Marche, Provincia Autonoma di Trento e Valle d'Aosta) si dispone della mappatura completa dei presidi/centri abilitati alla diagnosi e alla cura delle malattie rare. Il Piemonte e la Lombardia hanno già provveduto all'invio "massivo" dei dati sulle malattie rare presenti nel proprio Registro Regionale delle Malattie Rare. Le restanti Regioni sono in procinto di inviare i dati in base all'accordo Stato-Regioni del 19 luglio 2007.

I dati del RNMR verranno integrati con quelli derivanti da altri flussi informativi di statistiche correnti (schede di dimissione ospedaliera, certificato di cause di morte, ecc.).

Attività riguardante i farmaci orfani:

Il CNMR partecipa alle attività del Comitato per la Designazione dei Prodotti Medicinali Orfani (COMP) che, in seno all'Agenzia europea di valutazione dei medicinali (*European Medicines Agency*, EMA), ha principalmente il compito di esaminare le domande per l'assegnazione della qualifica di medicinale orfano.

Inoltre, il CNMR ha attivato nel 2004 il Registro Nazionale Farmaci Orfani (RNFO) presso l'ISS con l'idea di fornire uno strumento per gli studi a lungo termine e per studi di patologie con presentazione clinica eterogenea per cui i trial clinici sono più difficili da effettuare e per cui è più difficile identificare *end point* clinici di efficacia. Obiettivo primario del RNFO è quindi quello di attivare un sistema di sorveglianza per i farmaci orfani autorizzati a livello centralizzato dall'EMA e rimborsati dal Sistema Sanitario Nazionale (SSN). Il RNFO, inoltre, si propone di promuovere la collaborazione tra i diversi centri di riferimento esistenti in Italia al fine di evitare duplicazioni di interventi e incoraggiare un miglior coordinamento dei Centri per lo studio di specifici farmaci orfani e delle relative malattie rare. Il RNFO raccoglie dati di diagnosi e follow-up dei pazienti in trattamento con i seguenti obiettivi: i) valutare l'efficacia della terapia farmacologica su specifici *end point* clinici; spettro completo dell'andamento della patologia e mortalità; ii) registrare gli effetti avversi dei farmaci (tipo, frequenza, gravità, esiti); iii) definire il profilo rischio-beneficio dei farmaci; iv) valutare l'appropriatezza terapeutica.

Il RNFO si prefigge di avere una copertura totale del territorio nazionale ovvero di riferirsi a tutti Centri in Italia abilitati all'erogazione e alla prescrizione dei farmaci orfani.

Il CNMR ha predisposto e messo online le schede di diagnosi e follow-up di alcuni farmaci orfani (Ventavis, Revatio, Thelin, Tracleer, Fabrazyme, Replagal). Ad oggi, tutti i Referenti Regionali sono stati contattati e si dispone della mappatura completa dei

presidi abilitati alla prescrizione e alla somministrazione dei farmaci orfani per i quali è attivo il RNFO per sette regioni: Basilicata, Campania, Molise, Piemonte, Sicilia, Umbria, Valle d'Aosta.

Complessivamente sono stati abilitati per l'inserimento dei dati 92 presidi. Attualmente sono presenti nel RNFO 88 schede di pazienti con Ipertensione Arteriosa Polmonare e 21 schede di pazienti con Malattia di Fabry in trattamento con i farmaci orfani relativi. Tali numeri sono incoraggianti considerando che la raccolta dati è iniziata a marzo 2007.

Infine, il CNMR partecipa al Network di eccellenza "*Task Force in Europe for Drug Development for the Young (Teddy)*" per sviluppare e diffondere documenti e linee guida sui medicinali per malattie rare nei bambini. In questo ambito il CNMR ha recentemente organizzato, un Workshop internazionale su "*Epidemiological methods to define incidence, prevalence and mortality of rare diseases affecting the young*" al fine di elaborare strategie per la raccolta di dati epidemiologici validi sulle malattie rare.

Prevenzione primaria di difetti congeniti mediante acido folico:

Nel 2004 è stato istituito presso l'ISS il "Network Italiano Promozione Acido Folico per la Prevenzione Primaria di Difetti Congeniti". Ad oggi (ultimo aggiornamento sito 04/03/08), hanno aderito al Network 193 strutture pubbliche e private (organizzate in Gruppi di lavoro su diversi argomenti che includono aspetti inerenti la ricerca, l'assistenza, la diffusione dell'informazione). Il Network ha elaborato e approvato la Raccomandazione per l'uso periconcezionale dell'AF "Raccomandazione per la riduzione del rischio di difetti congeniti" e sta provvedendo alla sua diffusione su tutto il territorio nazionale.

Nel corso del 2007 è stato effettuato il primo anno di progetto pilota "Folati: mattoni per la vita!" nelle scuole medie superiori romane con l'obiettivo di diffondere la raccomandazione a tutti gli adolescenti di età compresa fra i 14 e i 18 anni. A tale scopo sono state elaborate (in collaborazione con INRAN, ISS e SIANET) e diffuse le seguenti brochure e poster:

- "Acido folico: Raccomandazione per la riduzione del rischio di difetti congeniti" (anche con il logo delle Regioni Marche e Sicilia);
- "Salute e folati: oggi costruiamo il nostro domani".

Inoltre nell'ambito delle attività svolte nel Network Italiano Promozione Acido Folico è stata elaborata la brochure "Acido Folico: un concentrato di protezione per il figlio che verrà".

La diffusione di questo materiale è stata effettuata in maniera capillare in tutta Italia (al 15 febbraio 2008 sono state inviate più di 180.000 copie tra brochure e poster).

Inoltre, il 5 ottobre 2007 si è svolto l'annuale workshop "Network Italiano Promozione Acido Folico – Prevenzione Primaria di Difetti Congeniti" durante il quale le principali tematiche affrontate hanno riguardato la ricerca biomedica di base, clinica e socio-sanitaria, lo studio dello stato nutrizionale della popolazione, la registrazione di malformazioni congenite; il trasferimento dei risultati della ricerca nella pratica clinica e nella normativa socio-sanitaria; la formazione, l'informazione, l'aggiornamento dei medici e dei cittadini, la valutazione rischio-beneficio degli interventi di prevenzione (i riassunti di tutti gli interventi della giornata sono riassunti nel Rapporto ISTISAN Congressi ISSN 0393-5620, 07/C6)

Elaborazione di linee guida:

L'elaborazione e la diffusione di linee guida per la gestione clinica di pazienti con MR hanno un ruolo fondamentale per garantire appropriatezza ed equità nei processi assistenziali.

Il CNMR è impegnato nella realizzazione di specifiche linee guida in collaborazione con il Piano Nazionale Linee Guida, enti di ricerca, operatori sanitari e sociali e soprattutto con le associazioni di pazienti e i loro familiari. Alcuni esempi di patologie per le quali sono in corso di elaborazione nuove linee guida sono: l'emiplegia alternante, l'epidermolisi bollosa ereditaria, l'esostosi multipla ereditaria e l'aniridia. Le "Linee guida multidisciplinari per l'assistenza integrata alle persone con sindrome di Down e alle loro famiglie" sono invece già state elaborate e sono disponibili al sito www.iss.it/cnmr alla voce linee guida.

Inoltre, il CNMR raccoglie e diffonde linee guida elaborate a livello nazionale e internazionale.

Assicurazione di qualità e standardizzazione dei test genetici:

Nell'ambito del Reparto Malattie rare viene svolta attività di Controllo Esterno di Qualità (CEQ) dei Test Genetici. Il CEQ, iniziato a livello operativo nel 2001, si occupa sia di test di citogenetica (prenatale, postatale e oncologica) che di genetica molecolare (test per la Fibrosi Cistica, la Beta talassemia, la Sindrome dell'X Fragile e la poliposi adenomatosa del colon-gene APC).

Nel primo semestre del 2007 è stata svolta attività di ricezione e archiviazione dei dati inviati dai laboratori partecipanti al CEQ relativi al quinto invio (2006). Alla ricezione dei dati sono seguite tre diverse riunioni di valutazione, per le quali sono state formate quattro commissioni (Citogenetica, APC, Fibrosi Cistica e Beta talassemia e Sindrome dell'X-fragile) di esperti nazionali che hanno valutato i risultati inviati dai laboratori partecipanti. Alle riunioni di valutazione è seguito l'invio dei risultati ai singoli laboratori e la pubblicazione dei dati stessi sul sito www.iss.it/cnmr alla voce test genetici.

Al fine di discutere e valutare i risultati ottenuti nel corso dei cinque anni di CEQ con i responsabili del Progetto e i laboratori stessi, il 20 settembre 2007 è stato organizzato il "V Workshop" annuale "Progetto Nazionale per la Standardizzazione e Assicurazione di qualità dei test genetici".

Nell'ambito dell'accordo fra Italia e USA è stato finanziato il seguente progetto: *Genetic testing for rare diseases: additional developments in the Italian External Quality Assessment Programme* (Programma Malattie Rare – Collaborazione Italia-USA) e nel secondo semestre del 2007 l'attività è stata svolta in tale ambito. In particolare, è stata realizzata una web-utility, al fine di uniformare questa attività agli altri schemi europei e disponibile al sito <http://www.iss.it/site/cnmr/privato/cqtg/entry.asp>. Tale strumento ha lo scopo di facilitare la diffusione di informazioni tecniche i metodi standardizzati dei laboratori, facilitare lo scambio e l'archiviazione di dati via web.

La web-utility è stata suddivisa in tre sezioni: i) sezione riservata esclusivamente all'organizzatore del CEQ; ii) sezione riservata al laboratorio partecipante, con accesso limitato mediante password, in cui si possono inserire i dati richiesti per il controllo di qualità; iii) sezione riservata alla valutazione dei dati, ad accesso limitato, attraverso codice identificativo e password, ai valutatori.

Per verificare l'effettiva funzionalità dello strumento, è stato eseguito un beta test che ha coinvolto personale del Reparto e alcuni laboratori partecipanti al CEQ.

Dal mese di febbraio 2008 è iniziato il VI turno di CEQ per i test genetici.

Nell'ambito dell'assicurazione di qualità dei test genetici, il CNMR collabora attivamente nel processo di armonizzazione internazionale con la OECD (con la quale ha contribuito ad elaborare le linee guida *OECD guidelines for quality assurance in molecular genetic testing*), l'European Commission (EC) e con il Network di eccellenza Eurogentest.

Formazione:

L'attività di formazione e aggiornamento è rivolta a ricercatori e operatori socio-sanitari e si realizza attraverso corsi, workshop, convegni e congressi nazionali e internazionali. I temi trattati, per specifici gruppi di MR, sono relativi ai recenti progressi nella ricerca scientifica, alla sanità pubblica e alle attività clinico-assistenziali. L'attività di informazione ai cittadini è svolta attraverso la realizzazione e diffusione di documenti divulgativi. Fra questi nel corso del 2007 sono stati elaborate e diffuse le seguenti brochure e poster:

- “Acido folico: Raccomandazione per la riduzione del rischio di difetti congeniti” (anche con il logo delle Regioni Marche e Sicilia);
- “Salute e folati: oggi costruiamo il nostro domani”;
- “Acido Folico: Un concentrato di protezione per il figlio che verrà”;
- “Centro nazionale Malattie Rare: Malattie Rare Farmaci Orfani”.

Inoltre viene curata la pubblicazione del supplemento del *Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità* che viene distribuito a tutti gli operatori dell'SSN e a quelli impegnati nel settore delle malattie rare.

Attività di informazione sulle malattie rare:

Il Servizio informazioni, attivo dal 2006, è diretto a fornire risposte ai quesiti di operatori socio-sanitari, pazienti e familiari, e singoli cittadini. Il Servizio si inquadra nel primo punto del Programma d'Azione sulle MR realizzato a livello europeo (Decisione n. 1295/1999/CE del 29 aprile 1999), che prevede “il miglioramento delle conoscenze sulle MR, incentivando la creazione di una rete europea l'informazione per i pazienti e le loro famiglie”. Il Servizio fornisce, inoltre, informazioni sulle MR (epidemiologia, diagnosi, prognosi, ecc.), sui farmaci orfani (disponibilità, rimborsabilità, ecc.), sui servizi e le prestazioni erogate dall'SSN (centri della rete nazionale, esenzioni, ecc.).

Il servizio di informazione utilizza anche il sito del CNMR (www.iss.it/cnmr) e le newsletter “Malattie Rare e Farmaci Orfani”.

Collaborazione con le associazioni dei pazienti:

Il Centro Nazionale Malattie Rare (CNMR) svolge diverse attività in collaborazione con le associazioni di pazienti, quale la realizzazione nel sito web www.iss.it/cnmr di una sezione dedicata alle associazioni di pazienti all'interno della quale è disponibile un database contenente informazioni utili su associazioni nazionali e internazionali (indirizzi web, recapiti, ecc.).

Il 5 giugno 2007 il Ministro della Salute, Senatrice Livia Turco, ha insediato la Consulta Nazionale delle Malattie Rare (costituita dai 34 rappresentanti eletti dalle associazioni di pazienti), presso il Ministero della Salute. La Consulta Nazionale, che si avvale del supporto tecnico-scientifico del CNMR, a oggi ha svolto la propria attività mediante gruppi di lavoro organizzati su diverse tematiche individuate come priorità dalla Consulta stessa (accertamento dell'invalidità, certificazione, esenzione; presa in carico e continuità assistenziale; integrazione socio-sanitaria; formazione degli operatori sanitari; ricerca scientifica; informazioni e comunicazione). Tutti i gruppi, al termine del proprio lavoro, hanno elaborato un documento sulle criticità e le possibili soluzioni nei diversi ambiti trattati.

Il testo è stato presentato al Ministro della Salute durante la Conferenza Internazionale “Malattie Rare e Farmaci Orfani” organizzata il 5 novembre 2007 presso l'ISS. Diverse e complesse le tematiche affrontate.

Medicina narrativa:

Il nostro Centro ha avviato, in collaborazione con un gruppo di Associazioni, il progetto “Malattie Rare e Medicina Narrativa” che prevede la raccolta di “storie di malattia” come modo per comprendere le persone nel proprio contesto, mettere a fuoco bisogni e nuove strategie di intervento e promuovere una cultura di partecipazione nei soggetti coinvolti dalle malattie rare.

Nell’ambito dell’accordo Italia-USA è stato presentato e finanziato il seguente progetto di ricerca: “*Effective communication and counselling: Improving listening in rare diseases*”.

Collaborazioni internazionali:

Oltre alla partecipazione alle attività del Comitato per i Medicinali Orfani (COMP – *Committee for Orphan Medicinal Products*), istituito all’EMA, allo scopo di esaminare le domande di assegnazione della qualifica di medicinale orfano, il CNMR è membro della Task Force Europea sulle MR (Rare Diseases Task Force – RDTF). La Task force è stata istituita dalla Commissione europea nel gennaio del 2004 con gli obiettivi di consigliare e assistere la Commissione Europea nella promozione di strategie per garantire prevenzione, diagnosi e trattamento delle MR in Europa e fornire un forum di discussione per lo scambio di esperienze e opinioni sui diversi problemi relativi alle MR. La Task force è composta da responsabili scientifici di progetti europei finanziati dalla Commissione Europea, esperti dei Paesi Membri e rappresentanti di organismi internazionali.

Il CNMR è attivo, inoltre, in diversi progetti europei:

- *European Project for Rare Diseases National Plans Development (EUROPLAN)*: progetto finanziato nell’ambito del Programma di Azione Comunitario della Sanità Pubblica (2003-2008). Il CNMR è il coordinatore del progetto che vede coinvolti altri 19 Paesi europei, l’Office of Rare Diseases dei National Institutes of Health (NIH-USA) e l’European Organisation for Rare Diseases (EURORDIS), l’organizzazione europea di associazioni di pazienti. EUROPLAN mira, in base all’esperienza dei suoi numerosi partner, a elaborare raccomandazioni per la definizione di piani strategici per le MR. A tal fine, il progetto mira a identificare e a descrivere *best practice* relative alle strategie di sanità pubblica più efficaci per affrontare le diverse criticità che le MR presentano.
- *Task force in Europe for Drug Development for the Young (TEDDY)*: Network di eccellenza finanziato dalla Commissione Europea, che comprende 11 Paesi, 19 partner e circa 300 ricercatori ed è coordinato dal Consorzio per le Valutazioni Biologiche e Farmacologiche (Pavia). Il progetto è iniziato nel giugno 2005 e terminerà nel 2010. Il CNMR è leader del *work package* WP5: “Malattie rare e farmaci orfani”. TEDDY ha l’obiettivo generale di promuovere la disponibilità di farmaci pediatrici sicuri ed efficaci. Attraverso la definizione dello stato dell’arte della ricerca nell’ambito di farmaci pediatrici, il Network mira a: raccogliere l’expertise esistente per definire linee guida e *best practice* per armonizzare e standardizzare la ricerca in ambito pediatrico; sviluppare specifici strumenti per lo scambio di informazioni; aumentare le conoscenze e le capacità per effettuare ricerche sui farmaci per bambini.
- *ERA-Net for research programmes on Rare diseases (E-Rare)*: network di nove partner, istituzioni pubbliche o di ricerca, responsabili dello sviluppo o gestione di programmi di ricerca sulle malattie rare in otto diversi paesi. L’obiettivo generale di E-Rare è quello di superare la frammentazione della ricerca sulle malattie rare creando possibilità per promuovere la collaborazione tra diversi ricercatori/clinici e

tra diversi istituti in ambito europeo. In particolare, gli obiettivi prevedono l'instaurazione di collaborazioni tra diversi paesi/partner; la limitazione della frammentazione nel campo della ricerca sulle malattie rare e la promozione di approcci multidisciplinari; l'armonizzazione e la coordinazione dei diversi programmi di ricerca nei paesi partecipanti al progetto; lo sviluppo e la promozione di politiche e priorità di ricerca comuni; l'aumento della competitività dell'Europa, rispetto ad altri paesi del mondo, relativamente alla ricerca su malattie rare. Il CNMR è responsabile del *Work Package* "Survey on national programmes and strengthening the knowledge on rare diseases programmes". In questo contesto ha condotto un *survey* sui diversi programmi di ricerca in ciascun paese partner del progetto e, nei prossimi anni, sarà impegnato nella valutazione di programmi di ricerca in paesi al di fuori della CE (Canada, USA, Giappone e Australia). Per quanto riguarda le attività si segnalano: i) raccolta di informazioni sui diversi programmi di ricerca disponibili a livello di ciascun Paese per definire e sviluppare attività collaborative tra i Paesi aderenti al progetto; ii) identificazione delle priorità per la ricerca sulle MR da inserire nella *research policy agenda* e nei futuri programmi di ricerca a livello nazionale e internazionale; iii) definizione e sviluppo di collaborazioni multidisciplinari tra i Paesi aderenti al progetto (possibile apertura di programmi per lo scambio di esperti tra diversi istituti/Paesi, *networking* per l'utilizzo delle nuove tecnologie disponibili per lo studio/trattamento delle MR, ecc.); iv) promozione di un bando di ricerca internazionale sulle MR co-finanziato dai partner del progetto. A marzo 2007 è stato aperto il primo bando transnazionale di ricerca europea sulle MR promosso nell'ambito del progetto E-Rare. In totale 120 progetti sono attualmente in fase di valutazione e i risultati sono attesi entro il prossimo mese di dicembre.

- Collaborazione con: Office for Rare Diseases (NIH-USA), Office of Orphan Products Development (FDA-USA), WHO e OECD.

Sito web:

Le attività del CNMR sono descritte nel sito www.iss.it/cnmr, il cui obiettivo principale è di fornire elementi informativi sulle malattie rare e i farmaci orfani, realizzando un canale interattivo tra ricercatori, operatori sanitari, istituzioni e Associazioni dei pazienti e familiari. Al suo interno sono contenuti tutti gli approfondimenti a livello nazionale e internazionale relativi agli aspetti scientifici, medici e normativi, progetti di ricerca, raccolta di dati epidemiologici, laboratorio di medicina narrativa, collaborazioni con la comunità scientifica, collaborazioni con le strutture dell'SSN e con le istituzioni internazionali, collaborazioni con i pazienti e familiari, nonché tutte le informazioni relative a congressi, workshop, corsi dedicati alle MR e ai farmaci orfani.

Reparto Metabolismo ed endocrinologia molecolare e cellulare

L'attività di ricerca è stata diretta allo studio dei meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nell'oncogenesi e nell'eziopatogenesi di malattie dello sviluppo e di patologie endocrino-metaboliche di particolare rilievo socio-sanitario.

- *Oncogenesi*. L'attività di ricerca è stata finalizzata all'identificazione di nuove cause molecolari coinvolte nella leucemogenesi. Gli studi hanno portato all'identificazione di mutazioni somatiche di JAK1 come evento ricorrente associato a prognosi sfavorevole nelle leucemie linfoblastiche acute della linea T dell'adulto. Gli studi funzionali hanno

dimostrato il ruolo attivante di queste mutazioni nella disregolazione della via di trasduzione del segnale mediata da questa chinasi.

- *Malattie dello sviluppo.* Gli studi finalizzati alla comprensione delle basi molecolari e cellulari sottostanti la patogenesi della sindrome di Noonan e di altre condizioni clinicamente correlate hanno permesso di identificare due nuovi geni-malattia (SOS1 e RAF1). L'analisi molecolare ha consentito di stimare che le mutazioni di SOS1 e RAF1 si osservano in circa il 15% dei soggetti con sindrome di Noonan, e che RAF1 è mutato anche in una minoranza di pazienti con sindrome LEOPARD. La caratterizzazione funzionale ha dimostrato il ruolo attivante delle mutazioni identificate. Le due proteine partecipano alla via di trasduzione del segnale mediata da RAS, confermando che la disregolazione di questa cascata rappresenta il meccanismo patogenico alla base di queste malattie. Studi di caratterizzazione funzionale di un gruppo selezionato di mutazioni nel gene PTPN11, frequentemente mutato in pazienti con sindrome di Noonan e sindrome LEOPARD, hanno consentito di comprendere il significato biologico di queste lesioni molecolari.
- *Ipofunzione tiroidea.* L'attività di ricerca condotta sull'ipotiroidismo congenito ha evidenziato un più elevato rischio di questa malattia nelle gravidanze multiple rispetto alle gravidanze singole e un basso tasso di concordanza della stessa tra gemelli, confermando l'origine multifattoriale dell'ipotiroidismo congenito. Il proseguimento della linea di ricerca relativa agli effetti dell'esposizione ad "Interferenti Endocrini" sulla funzione tiroidea ha dimostrato l'effetto tireostatico del chlorpirifos (pesticida organofosforico), a breve (gravidanza) e lungo termine (PND150), su un modello murino esposto a dosi comparabili a quelle rilevate in coorti di bambini sottoposti a biomonitoraggio. Sono inoltre proseguiti gli studi finalizzati a stabilire il ruolo della citochina immunosoppressiva TGFbeta1, quale marcatore di infiammazione nelle fasi che precedono la diagnosi di endocrinopatie su base autoimmune (tiroidite, diabete di tipo 1). È stata infine attivata una nuova linea di ricerca finalizzata allo studio e alla prevenzione dei disordini da carenza iodica.
- *Complicanze vascolari del diabete.* L'attività sperimentale è stata focalizzata sulla patogenesi della disfunzione neurogliale in corso di retinopatia diabetica attraverso lo studio delle alterazioni di specifiche molecole di segnale correlate al sistema renina-angiotensina e indotte dal milieu diabetico, e sulla messa a punto di una metodica di valutazione dei livelli di prodotti avanzati della glicazione (AGE) in pazienti diabetici. Inoltre è stata attivata una collaborazione con il CNESPS nell'ambito del Progetto IGEA (Integrazione, GESTione e Assistenza per la malattia diabetica) che ha come obiettivo l'implementazione di un modello di assistenza di tipo gestione integrata per la prevenzione delle complicanze del diabete mellito di tipo 2, che ha prodotto un documento di indirizzo sull'applicazione del modello di gestione integrata di questa patologia per le regioni e gli operatori interessati.

Per ciò che riguarda l'attività di sorveglianza svolta nel Reparto, è proseguita l'attività di controllo nel settore endocrino-metabolico attraverso il coordinamento di due registri nazionali di patologia. In particolare, i dati raccolti nel Registro Nazionale degli Ipotiroidi Congeniti hanno consentito di stimare un'incidenza della malattia pari a 1 caso su 2500 nati vivi, con un rapporto F/M = 1.7/1. L'attività condotta nell'ambito del Registro Nazionale degli Assuntori dell'Ormone della Crescita ha permesso la messa a punto di una scheda di segnalazione che regola le prescrizioni di ormone somatotropo preparata sulla base della normativa vigente, attraverso la consulenza di un gruppo di esperti clinici e di rappresentanti regionali.

Reparto Neurobiologia molecolare

Le attività del Reparto sono state indirizzate principalmente sui seguenti temi:

– *Malattie rare*

Sono proseguiti gli studi volti a chiarire le interazioni e il ruolo dei complessi di proteine associati alla distrofina (DPC) nel sistema nervoso, in situazioni fisiologiche e patologiche, nell'ipotesi di un suo possibile coinvolgimento in disfunzioni neuronali e nel deficit cognitivo spesso associato a distrofie muscolari congenite: i) i risultati ottenuti hanno rafforzato l'ipotesi che la distrobrevina, una delle componenti del DPC, sia una proteina scaffold che interviene in processi fondamentali per la cellula, quali il trasporto, il *signaling* e il differenziamento neuronale. L'interazione della distrobrevina con le subunità regolatorie RI e RII della proteina chinasi AMPc-dipendente (PKA) suggerisce che la distrobrevina sia un'AKAP (*A Kinase Anchoring Protein*), cioè una piattaforma molecolare per chinasi, fosfatasi e fosfodiesterasi in grado di connettere complessi multiproteici di membrana a meccanismi di trasduzione del segnale cAMP-dipendenti; ii) i risultati dell'identificazione dell'interazione della beta-distrobrevina con la pancortina, una glicoproteina specifica dei neuroni della corteccia cerebrale la cui espressione sembra correlata alla neurogenesi, e con iBRAF, una proteina regolatrice dell'attivazione del programma differenziativo neuronale suggeriscono che la distrobrevina possa anche giocare un ruolo nei processi di sviluppo e differenziamento del sistema nervoso; iii) attraverso analisi di Maldi-TOF, mutazioni specifiche di residui serina ed esperimenti SPR abbiamo studiato i siti di fosforilazione della beta-distrobrevina e stiamo identificando il sito di fosforilazione associato alla regolazione della sua interazione con il motore molecolare chinesina; iv) sono stati, inoltre, ottenuti dati che correlano il complesso DPC a proteine di membrana neuronali e astrocitarie e a proteine della matrice extracellulare suggerendo un suo coinvolgimento in patologie non solo muscolare ma anche del sistema nervoso.

– *Malattie neurodegenerative modelli in vivo e in vitro*

i) In un modello sperimentale di Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) di tipo familiare umano, topi transgenici SOD1/G93A(+) che esprimono la SOD1 mutata nella posizione 93, sono state analizzate le attività di tirosin chinasi della famiglia di src. Questa classe di chinasi, considerate target specifici dello stato redox intracellulare, è coinvolta nella funzionalità recettoriale glutamatergica (NMDA, AMPA) che nella SLA è notevolmente alterata. In sinaptosomi ottenuti da corteccia e da midollo spinale nei topi SOD1/G93A(+) rispetto ai topi WTSOD1(+) che over-esprimono la SOD1 umana non mutata, abbiamo osservato che mentre l'attività di c-src aumenta l'attività di lyn diminuisce significativamente nei due compartimenti suggerendo una regolazione di diversi recettori glutamatergici.

ii) Utilizzando un modello animale geneticamente epilettico (ratto WAG/Rij) abbiamo identificato una ridotta funzionalità dei recettori GABAB e la variazione dell'espressione e della distribuzione subcellulare delle sue subunità come possibili meccanismi patogenetici che intervengono nella genesi, nella propagazione e termine della scarica epilettica e in un modello *in vitro* di epilessia lobo temporale abbiamo iniziato ad analizzare il ruolo dello stress ossidativo nella genesi e propagazione della scarica epilettica, sia a livello dell'ippocampo che della corteccia entorinale.

Negli studi volti ad identificare fattori protettivi o tossici in patologie neurodegenerative: i) si è concluso lo studio sul ruolo del canale del cloro CLIC1 nella fagocitosi microgliale della beta amiloide e i risultati ottenuti indicano che il blocco di tale canale stimola la fagocitosi della beta amiloide, mentre sopprime la produzione di sostanze potenzialmente neurotossiche, quali

l'ossido nitrico, e permettono di identificare in questo canale un potenziale bersaglio nella terapia della malattia di Alzheimer; ii) abbiamo individuato un'azione neuroprotettiva della timosina b4 in diversi modelli sperimentali di eccitotossicità e i nostri studi indicano che la timosina b4 potrebbe essere impiegata per il trattamento delle malattie a patogenesi eccitotossica quali la malattia di Alzheimer, la malattia di Huntington, ALS, il morbo di Parkinson e l'ischemia; iii) lo studio del ruolo delle infezioni da Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) nella patogenesi della malattia di Alzheimer ci ha permesso di verificare che il virus HSV-1 è coinvolto nel processamento della proteina *Amyloid Precursor Protein* (APP); iv) negli studi delle malattie neurodegenerative della retina, è proseguita l'analisi degli effetti tossici di sostituti artificiali del vitreo in modelli *in vitro*, utilizzando colture primarie di retina; si è inoltre iniziato ad usare tale modello per la riproduzione del milieu diabetico *in vitro* (alte concentrazioni di glucosio, AGE) e per lo studio degli eventuali effetti neurotossici di farmaci anti-VEGF. Al livello molecolare sono proseguiti gli studi del ruolo di modificazioni in tirosina (nitrazioni e fosforilazioni) indotte dal perossinitrito in proteine sinaptiche e del ruolo della *DNA-dependent protein kinase* nella degenerazione neuronale e nella plasticità sinaptica.

Reparto Neuroscienze comportamentali

Nel 2007 sono proseguiti i vari filoni di ricerca tradizionali del gruppo, che vanno dall'analisi dei fenomeni di stress e *coping* (esteso ad ambienti estremi quali quello microgravitazionale spaziale e Antartico), agli studi epidemiologici e sperimentali su malattie neuropsichiatriche (inclusa la depressione associata al Parkinson), in particolare durante lo sviluppo. Sempre nell'ambito dei disordini neuropsichiatrici sono proseguiti gli studi su modelli murini transgenici (riferibili alla sindrome di Rett, alla corea di Huntington, all'autismo infantile o alla sclerosi laterale amiotrofica), anche in collaborazione con gruppi di ricerca intramurali, nazionali e internazionali. Sono stati inoltre analizzati gli effetti potenzialmente neurotossici del mercurio utilizzato come conservante nei vaccini (pertosse, epatite, ecc.). Sono state anche condotte analisi sperimentali degli effetti che agenti neurotossici (quali l'alcol e il clorpirifos) esercitano sul normale profilo neuroendocrino e comportamentale. Infine, lo studio dei fattori di rischio durante l'adolescenza ha ulteriormente caratterizzato specifici elementi psicobiologici responsabili di pattern comportamentali devianti e di accentuata vulnerabilità (farmaci di abuso).

Sono proseguite le ricerche sul ruolo patogenetico esercitato da ambienti caratterizzati da elementi fisici o sociali tali da modificare il sistema nervoso centrale e il comportamento fin nell'individuo adulto, dove i livelli di espressione centrale di NGF e BDNF variano in funzione di esperienze precoci. Da quest'anno, tali ricerche riguarderanno anche pazienti affetti da disturbi dell'umore e da varie patologie a carattere depressivo.

Nell'ambito di un progetto europeo sono state raffinate le tecniche automatizzate per la caratterizzazione fenotipica di ceppi murini mutanti e transgenici. Sono proseguite le attività mirate a migliorare le condizioni di benessere psicofisico negli animali da esperimento (roditori e primati) e, in forma crescente, nelle specie da affezione e da reddito. Sono state condotte regolari attività di formazione, aggiornamento e prevenzione nel settore dell'etologia, della psicobiologia, della psichiatria biologica, della neuropsichiatria infantile (Corsi di formazione ISS: 4-5 dicembre 2007 – “Complicazioni ostetriche e outcome neuropsicologico in età evolutiva: aspetti clinici e sperimentali”; 25-26 giugno 2007 – “Salute della donna e del bambino aspetti clinici e sperimentali dell'esposizione all'alcol; 13 novembre 2007, in collaborazione con il MUR – “Gli studi sul cervello, gli adolescenti e l'incontro con le sostanze psicotrope”) e della biostatistica, con un graduale coinvolgimento degli elementi più giovani del