

Reparto, attivamente impegnati nella storiografia scientifica e nella divulgazione della cultura tecnico-scientifica a livello nazionale e internazionale.

Sono state elaborate linee guida nazionali e internazionali (OCSE) per la teratologia comportamentale e vari aspetti di bioetica applicata, ed è stata effettuata una ricognizione sullo stato della *pet-therapy* in Italia. È proseguita intensamente l'attività di stesura di pareri sulle richieste di autorizzazione in deroga, secondo il DL.vo 116/1992 sull'impiego degli animali nella sperimentazione biomedica, per il settore delle neuroscienze e del comportamento (per roditori e primati).

Il sito istituzionale del Reparto ha preso ulteriore consistenza. Si sono intensificate le attività finalizzate a ottenere fondi da Agenzie nazionali e, soprattutto, internazionali, e la formulazione di pareri su temi di sanità pubblica sia per le malattie del SNC e del comportamento (inclusa la sindrome di Rett, una malattia rara), sia per temi di veterinaria e di conservazione della biodiversità animale.

Reparto Patologie neurologiche, degenerative e infiammatorie

Nel corso del 2007 sono proseguite le seguenti attività di ricerca:

- Meccanismi recettoriali coinvolti nella funzionalità e sopravvivenza delle cellule gliali al fine di identificare bersagli farmacologici per il trattamento delle patologie infiammatorie neurodegenerative e demielinizzanti.

Le linee di ricerca in atto riguardano: i) recettori purinergici P2Y in colture microgliali; ii) recettori nucleari PPAR-g, in cellule microgliali e oligodendrociti; iii) recettori nicotinici $\alpha 7$ come mediatori dell'attività anti-infiammatoria colinergica in modelli animali; iv) recettori adenosinici A2A come bersaglio di terapie neuroprotettive in patologie di degenerazione striatale. I risultati ottenuti sono stati oggetto di articoli pubblicati o in corso di pubblicazione;

- Marcatori di danno infiammatorio e ossidativo in patologie neurologiche infiammatorie del neonato e dell'adulto.

i) misurazione dei livelli di isoprostano nel plasma preparato dal sangue cordonale umano come indice di eventi di sofferenza fetale o perinatale, con particolare riguardo a nascite bi e trigemine; ii) misurazione dei livelli di isoprostano come indice del danno assonale nella sclerosi multipla; iii) valutazione della capacità anti-ossidante plasmatica (come indice di vulnerabilità o protezione individuale all'insulto di tipo ossidativo, in relazione al declino cognitivo dei soggetti) e di marcatori del danno cerebrale di tipo ossidativo (isoprostani; proteine) nel liquido cerebro-spinale di pazienti con moderato deficit cognitivo (MCI) o affetti da malattia di Creutzfeldt-Jakob (manoscritto in preparazione).

- Ruolo dell'infiammazione e dell'attivazione microgliale di neurogenesi nell'adulto. I risultati ottenuti indicano che in condizioni di attivazione cronica, le cellule microgliali possono svolgere un ruolo favorente la neurogenesi;

- Modelli animali per lo studio dei fattori predisponenti ai processi di neurogenerazione. Questi studi sono stati condotti su due modelli sperimentali. Sono, inoltre, iniziate le analisi del ruolo dell'attivazione microgliale e della risposta infiammatoria in un modello funzionale di morbo di Parkinson (lesione bilaterale con 6OH-dopamina), prevista dal programma di ricerca ex art. 56 2004 e in un modello di sclerosi laterale amiotrofica (nell'ambito dei Progetti di Ricerca Malattie Neurodegenerative SLA5-Art533);

- I meccanismi immunopatogenetici implicati nella sclerosi multipla (SM) mediante studi *in vitro*, in modelli sperimentali e analisi neuropatologiche su tessuto cerebrale post-mortem da pazienti con SM.

Risultati rilevanti per le implicazioni a livello clinico e terapeutico sono scaturiti dalla ricerca di marcatori dell'infezione da virus di Epstein-Barr (EBV) nelle lesioni infiammatorie della SM. Sulla base dei dati ottenuti è stato proposto un nuovo modello patogenetico di SM che identifica in una disregolata infezione da EBV la causa principale del processo infiammatorio cronico che colpisce il sistema nervoso centrale provocando deficit neurologici irreversibili. In parallelo, sono state sviluppate strategie atte a interferire con la risposta umorale intratecale in modelli preclinici di SM;

- Patogenesi molecolare di una rara leucodistrofia ad esordio infantile, la leucoencefalopatia megalencefalica con cisti suborticali.

Dati importanti per la comprensione del ruolo fisiologico della proteina MLC1 e del suo coinvolgimento nella leucoencefalopatia megalencefalica sono emersi dallo studio delle interazioni tra questa proteina e il complesso distrofina-distroglicano a livello delle membrane cellulari degli astrociti.

- L'analisi genetica per la ricerca di nuove mutazioni e fattori di rischio nella malattia di Alzheimer Familiare (FAD) e Sporadica (SAD), in pazienti provenienti da Unità Valutative regionali.

Uno dei risultati più rilevanti è stata l'individuazione di una mutazione sul gene dell'APP (*London mutation*) su un pedigree italiano, e di un nuovo fattore di rischio sul gene della presenilina 1 (E318G) per la malattia di Alzheimer, oggetto di una pubblicazione in collaborazione con numerosi gruppi Italiani.

Nel corso dell'anno si è inoltre concluso lo studio su "fattori epigenetici coinvolti nella malattia di Alzheimer", studio che ha permesso di rilevare una diversa modulazione della g-secretasi, in cellule di neuroblastoma e glioblastoma a seguito di trattamento con omocisteina. Tale lavoro è stato oggetto di una pubblicazione su *Journal of Alzheimer's Disease*.

Nell'arco del 2007 abbiamo inoltre concluso e pubblicato i risultati di progetti relativi all'uso dei test del liquor per la diagnosi di malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ), alla determinazione quantitativa degli allotipi di PrPres nelle arvicole e alla caratterizzazione di una forma atipica di MCJ.

Sono in preparazione i manoscritti sull'inattivazione dei prioni nei preparati alimentari di origine bovina, sull'infezione intranasale con i prioni, sul coinvolgimento dei muscoli dopo infezione orale con encefalopatia spongiforme bovina (BSE) e sulla rimozione dei prioni dal sangue.

Reparto Terapia genica e cellulare

Le attività di ricerca del Reparto si svolgono sulle seguenti linee:

- Regolazione della cellula staminale
Fenotipo indotto da ridotta espressione di GATA-1 (topi GATA-1low). È stata dimostrata una funzione del fattore nucleare GATA-1 nella regolazione dei progenitori bipotenti per la linea megariocitaria ed eritroide.
- Differenziazione eritroide
Si sono proseguiti gli studi sull'effetto dei corticosteroidi ed estrogeni sulla regolazione delle fasi terminali del differenziamento eritroide in cellule primarie.
È proseguita la sostituzione dei materiali animali con equivalenti umani per lo sviluppo di un prodotto che possa essere sperimentato in clinica.
- La proteina Nef di HIV-1 nel controllo dell'attività della NADPH ossidasi
Questo progetto di ricerca intende studiare il ruolo che la proteina Nef di HIV-1 svolge nel modulare i livelli di produzione dei ROS e nel regolare l'attività del complesso

enzimatico NADPH ossidasi. Utilizzando linee cellulari U937, geneticamente modificate per esprimere sia Nef *wild type* che alcuni suoi mutanti, abbiamo dimostrato, in quest'ultimo anno, che Nef è in grado di indurre in tempi brevi l'attività della NADPH ossidasi, ma richiede la localizzazione in membrana di Nef che l'integrità del suo dominio SH3, ed è indipendente dal *pathway* della chinasi MAP. Nef induce la fosforilazione e la migrazione in membrana della subunità citosolica della NADPH ossidasi p47phox mediante l'attivazione di alcune chinasi della famiglia Src (Hck, Lyn e c-Src) e della PI3K. L'insieme di questi risultati suggerisce che Nef può regolare l'attività della NADPH ossidasi attraverso una sorta di corto circuito molecolare, utilizzando un *pathway* alternativo a quello normalmente attivato da citochine infiammatorie.

- Sviluppo di progetti di formazione e networking per le strutture italiane coinvolte nella produzione di prodotti medicinali avanzati.
Questa attività si è concretizzata nella preparazione di un corso per gli addetti alla produzione di prodotti medicinali avanzati svoltosi presso l'ISS in data 23-24 ottobre 2007.
- Sviluppo del RIBBO, Rete Italiana delle Bio-Banche Oncologiche, un progetto finanziato dalla ACC per la formazione di una rete nazionale.
Questa attività si è concretizzata nel 2007 nella preparazione di un questionario per la raccolta dei dati sulla situazione italiana delle biobanche oncologiche.

DIPARTIMENTO DI EMATOLOGIA, ONCOLOGIA E MEDICINA MOLECOLARE

Il Dipartimento svolge attività di ricerca in ematologia e oncologia e in alcune aree delle malattie renali e cardiovascolari, delle neuroscienze e delle malattie genetiche, con particolare attenzione allo sviluppo di nuovi approcci terapeutici per malattie ematologiche, oncologiche e altre patologie molecolari ad elevato impatto socio-sanitario. Inoltre, il Dipartimento si occupa della valutazione della sicurezza ed efficacia di farmaci innovativi ad uso clinico delle patologie suddette.

Diversi progetti di ricerca in corso sono focalizzati sulle cellule staminali o cellule progenitrici post-natali purificate e sui meccanismi molecolari, biochimici e cellulari che controllano la loro proliferazione e differenziazione. In particolare, un'intensa ricerca è dedicata alle cellule staminali ematopoietiche e neurali e alle cellule progenitrici con lo studio di modelli preclinici di trapianto di cellule staminali a scopo terapeutico nelle malattie degenerative. Sono stati anche attivamente studiati i meccanismi oncogenici nei tumori solidi e nelle leucemie sia a livello fenotipico che molecolare e funzionale. Altri progetti di ricerca sono interessati allo studio dei meccanismi molecolari nelle malattie genetiche come le emoglobinopatie e le malattie lisosomiali, allo *switch* dell'emoglobina, alle basi molecolari dell'arteriosclerosi, alle ricerche in medicina trasfusionale e in medicina di laboratorio e allo studio dei marker diagnostici nelle nefropatie.

L'attività futura del Dipartimento sarà caratterizzata da una continuità nelle tematiche attuali, con lo scopo di sviluppare ulteriormente le ricerche che possano essere finalizzate ad identificare nuovi approcci terapeutici per una varietà di patologie con grande impatto sulla salute pubblica.

In diverse aree di ricerca il Dipartimento funge da centro di coordinamento di Programmi di ricerca nazionali e di collaborazione internazionale, che comprendono unità operative intra- ed extramurali: in particolare, il Programma Nazionale sulle Cellule Staminali, il Programma Oncotecnologico e i Programmi Italia-USA sulla Farmacogenomica Oncologica e sulla Terapia dei Tumori.

Il Dipartimento partecipa alla valutazione delle sperimentazioni di fase I, in particolare nel settore emato-oncologico, ed espleta controlli di qualità su sangue ed emoderivati. La strategia del Dipartimento sarà basata sull'interazione sinergica tra i Reparti e le diverse attività istituzionali. Verranno quindi potenziati gli interscambi tecnico-scientifici tra progetti di ricerca limitrofi, anche afferenti a Reparti diversi. Queste interazioni tecnico-scientifiche saranno ovviamente estese agli altri Dipartimenti dell'ISS e ai laboratori extramurali, anche sulla base dei Programmi di ricerca nazionale e internazionale coordinati dal Dipartimento. Sotto un altro profilo, le competenze acquisite in base alle attività di ricerca forniranno il supporto necessario per un migliore espletamento dei compiti dipartimentali di controllo, consulenza e formazione, in modo da ottenere una interazione sinergica tra queste attività istituzionali.

Resoconto attività 2007

L'attività svolta nel 2007 dal Dipartimento è stata dettagliata all'interno dei singoli reparti.

Descrizione dei reparti

Reparto Biochimica e biologia molecolare clinica

Nel settore della diagnostica medica, diverse attività mirano a migliorare la sicurezza di qualità dei metodi applicati e degli strumenti utilizzati nei laboratori ematologici.

Questo obiettivo sarà perseguito attraverso:

- lo studio dei fattori genetici, molecolari e biochimici che sono alla base di talune anemie ereditarie: deficit di G6PD, deficit di piruvato chinasi, sferocitosi ereditarie ed ellissocitosi ereditaria;
- l'individuazione di parametri diagnostici e l'elaborazione di protocolli diagnostici e di monitoraggio clinico, la proposta di linee guida e l'istituzione di un database clinico e di laboratorio specifico per patologia;
- la partecipazione ad azioni europee per la definizione di standard di qualità;
- l'organizzazione di programmi di valutazione esterna di qualità;
- l'attività come laboratorio di riferimento in settori specialistici nell'ambito di reti internazionali;
- l'attività di *Batch Release* dei prodotti medicinali emoderivati (DM 22/04/96);
- la certificazione di materiali di riferimento e di controllo.

Reparto Biotecnologie oncologiche ed ematologiche

Nel corso del 2007, il Reparto di Biotecnologie oncologiche ed ematologiche ha svolto un intenso lavoro nell'ambito dell'oncologia e dell'ematologia sperimentale.

Nel settore oncologico, sono state identificate le cellule tumorigeniche del tumore del polmone mediante l'utilizzo del marker di membrana CD133 (Eramo A. et al. "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population". *Cell Death Differ.* 15(3):504-14, 2008), che già aveva portato all'isolamento della popolazione tumorigenica del cancro del colon (Ricci-Vitiani L. et al. "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells". *Nature.* 445(7123):111-5, 2007). Sulle cellule staminali tumorali sono stati condotti studi volti alla caratterizzazione fenotipica, sia a livello del trascrittoma che a livello proteomico. In particolare, sulle cellule staminali tumorali di colon sono stati ottenuti dati relativi all'espressione deregolata di specifici microRNA dei quali si stanno attualmente valutando i potenziali target e il significato funzionale. Quanto all'analisi proteomica, è stato esaminato in cellule staminali tumorali di diversi tumori lo stato di attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale coinvolte nei processi di proliferazione e sopravvivenza mediante analisi fosfoproteomica condotta grazie ad una collaborazione con la George Mason University (Virginia, USA). Tali studi hanno permesso l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici potenzialmente efficaci per l'eradicazione dei tumori esaminati. L'analisi dei dati finora ottenuti ha mostrato che le cellule staminali tumorali possono essere "clusterizzate" non solo per tipo tumorale ma per *signaling pathways* attivate. Si sta attualmente valutando l'efficacia di specifici inibitori e/o di combinazioni di inibitori nell'indurre l'arresto della proliferazione di tali cellule, *in vitro* e in seguito su modelli tumorali basati sul trapianto di cellule staminali tumorali. Sugli stessi modelli animali sono stati effettuati esperimenti preliminari per lo studio dei processi di metastatizzazione, mediante marcatura delle cellule staminali tumorali con un tracciante bioluminescente e successiva rilevazione mediante tecniche di *imaging in vivo*. Infine, è stato condotto uno studio prospettico su pazienti affetti da glioblastoma multiforme che dimostra

come l'analisi della componente staminale in tali tumori rappresenti un potente strumento prognostico (manoscritto sottomesso per la pubblicazione).

Nel settore ematologico, nel corso del 2007 l'attività di ricerca si è concentrata sullo studio dell'effetto protettivo dello *Stem Cell Factor* (SCF) sui progenitori ematopoietici in corso di trattamento chemioterapico. In particolare, è stato dimostrato che i farmaci chemioterapici inducono la morte per apoptosi dei progenitori megacariocitici, principale causa della trombocitopenia nei pazienti sottoposti a chemioterapia e, come per altri progenitori ematopoietici, è stato osservato un effetto protettivo dell'SCF (Zeuner A *et al.* "Chemotherapy-induced thrombocytopenia derives from the selective death of megakaryocyte progenitors and can be rescued by stem cell factor". *Cancer Res.* 15;67(10):4767-73, 2007). Tali studi stanno attualmente procedendo su modelli animali nella prospettiva di una futura applicazione clinica.

Reparto Cellule staminali ed endotelio

L'attività di ricerca sarà focalizzata sulle cellule staminali post-natali, che rappresentano uno strumento prezioso per lo sviluppo di terapie rigenerative, attraverso la purificazione, la caratterizzazione funzionale, l'espansione *ex vivo* e il trapianto dei diversi tipi di cellule staminali. In particolare, le cellule staminali ematopoietiche e/o precursori endoteliali hanno già consentito lo sviluppo di modelli preclinici innovativi nella terapia di affezioni cardiovascolari di grande rilievo. In fase post-natale, le cellule staminali ematopoietiche sono caratterizzate dall'espressione di *marker* endoteliali (es. recettori 1 e 2 del VEGF): i fenomeni di interconnessione fenotipica e funzionale tra cellule staminali ematopoietiche ad endoteliali saranno oggetto di indagini *in vitro* e *in vivo*.

Le cellule staminali mesenchimali costituiscono una grande promessa nell'ambito della medicina rigenerativa, ematologia, oncologia, neurologia, ortopedia e immunopatologia. Una chiara separazione fra queste discipline risulta artificiosa poiché nella pratica clinica sono spesso embricate e interconnesse. Le cellule staminali mesenchimali sono attualmente utilizzate in studi preclinici o clinici di fase I/II/III nell'infarto del miocardio, ischemia cerebrale, sezione di midollo spinale, sclerosi multipla, reazione di trapianto contro l'ospite, malattia di Crohn, rigenerazione del menisco, rigenerazione ossea, riparazione di fratture ossee, tendinite, osteoartrite, osteoporosi, chemio/radioprotezione. Nonostante il crescente successo di questi studi clinici pionieristici, i mediatori di queste funzioni, che vanno dal controllo della cicatrizzazione e apoptosi, alla stimolazione dell'angiogenesi e delle cellule staminali tessuto specifiche fino a profondi effetti immunomodulatori, sono parzialmente oscuri. La necessità per una comprensione dettagliata delle molecole mediatrici di questi effetti profondi diventa quindi imperativa. Abbiamo recentemente isolato all'omogeneità e caratterizzato le cellule staminali mesenchimali, mediante una serie estesa di marcatori positivi (es. CD146) e negativi.

È stato definito il profilo secretivo e differenziativo delle cellule. È stato inoltre definito il profilo di espressione dei microRNA in condizioni basali, senescenza, osteogenesi, condrogenesi, adipogenesi e stromagenesi. Questi studi aprono la strada alla comprensione dettagliata e al controllo funzionale delle cellule staminali mesenchimali.

Reparto Emoglobinopatie ed ematopoiesi

Sulla base dei risultati conseguiti precedentemente nell'adulto normale, uno degli obiettivi principali di questo Reparto è quello di fornire una dimostrazione per l'uso terapeutico del kit-ligando (KL) nel trattamento efficace delle beta emoglobinopatie, in particolare della beta-talassemia umana. Esso sarà raggiunto perseguendo tre principali obiettivi: i) caratterizzazione

in vitro degli effetti antiapoptotici e proliferativi del KL nell'eritropoiesi talassemica; ii) ottimizzazione dell'induzione della sintesi di HbF nelle cellule eritroidi talasemiche attraverso il KL in associazione o meno con sostanze chimiche che ne potenziano la sua attività proeritroide; iii) validazione *in vivo* dei dati *in vitro* utilizzando modelli murini beta-talassemici che mimano la malattia umana.

Sempre in soggetti talassemici sarà valutata l'espressione della ferroportina sia a livello di RNA messaggero che di proteina durante il differenziamento eritroide *in vitro* di progenitori emopoietici isolati dal sangue periferico; sarà altresì effettuato lo studio di eventuali mutazioni nel gene della ferroportina allo scopo di evidenziare una co-presenza del tratto talassemico ed eventuali alterazioni di uno dei geni principali coinvolti nel controllo del metabolismo del ferro. L'analisi può essere estesa anche al gene dell'epcidina, del recettore 2 della transferrina e dell'emojuvelina.

Un altro obiettivo principale del Reparto è quello di proseguire gli studi sulle basi cellulari e molecolari dell'ematopoiesi utilizzando metodologie di purificazione dei progenitori e colture di differenziazione e maturazione unilinea degli stessi. In particolare, per quanto riguarda lo studio della megacariocitopoiesi, i nostri risultati ci hanno portato recentemente ad ipotizzare un primo modello di attivazione a cascata dei segnali di traduzione Shc/Ras/MAPK e PI3K/AKT che inducono la cellula Mk alla poliploidizzazione. Ci proponiamo quindi di proseguire lo studio degli eventi alla base dell'indirizzo e del differenziamento megacariocitario e di analizzare inoltre i meccanismi molecolari alla base dell'attivazione piastrinica, poiché questa gioca un ruolo critico nella patogenesi della sindrome coronaria acuta ed è di particolare importanza nell'individuazione di nuove terapie nel trattamento di pazienti con disordini cardiovascolari.

Reparto Fisiopatologia delle malattie genetiche

Nel campo della medicina sperimentale verrà sviluppato lo studio dei meccanismi patogenetici alla base delle malattie genetiche con particolare attenzione alle malattie lisosomiali. Le più recenti ricerche sulla biologia dei processi degradativi lisosomiali sono culminate nella messa a punto di vari trattamenti per le malattie lisosomiali quali la terapia enzimatica sostitutiva (infusioni periodiche dell'enzima mancante) e la terapia da riduzione del substrato (uso di inibitori per ridurre la sintesi dei prodotti accumulati). Queste terapie che si sono dimostrate estremamente efficaci su numerosi pazienti offrono un esempio concreto di come la ricerca biologica e molecolare possa dare risultati concreti a livello di diagnosi e trattamento. Rimangono comunque varie problematiche irrisolte come la possibilità di intervenire a livello del sistema nervoso centrale e del sistema osseo; non si è riusciti inoltre a trovare ancora le condizioni per attuare un'efficace terapia genica. Per aprire la strada a nuovi approcci terapeutici verranno quindi studiati i processi cellulari coinvolti nelle singole malattie genetiche e verranno identificati a tutti i livelli i fattori che modulano tali processi. Verranno inoltre aggiornate e ottimizzate le metodiche di diagnosi biochimica e molecolare che costituiscono il prerequisito di ogni intervento. Un'intensa attività di formazione contribuirà infine a divulgare le nuove acquisizioni nell'ambito della diagnosi e del trattamento delle malattie genetiche.

Reparto Fisiopatologia delle malattie renali e patologie correlate

Il settore di intervento del Reparto è focalizzato sulle malattie del rene, in particolare insufficienza renale cronica (IRC) e patologie ad essa correlate. L'IRC è una malattia progressiva che consiste nella perdita graduale e irreversibile della funzione del rene e comporta

nel suo stadio più avanzato il ricorso obbligatorio ad un trattamento sostitutivo di funzione renale (dialisi o trapianto d'organo). L'elevata incidenza di questa malattia – con un trend in continua crescita – e l'elevato rischio di patologie correlate – prima tra tutte quella cardiovascolare – fanno sì che l'IRC sia oggi un problema maggiore di sanità pubblica. Promuovere ricerche di base e traslazionali al fine di: i) investigare i meccanismi patogenetici che sono alla base della progressione del danno renale e delle malattie correlate e ii) identificare nuovi indicatori biochimici di danno renale più sensibili e precoci di quelli attualmente in uso, sono tra gli obiettivi principali perseguiti dal Reparto. Tali attività vengono svolte in collaborazione con Centri di Nefrologia e Dialisi dell'SSN e Dipartimenti universitari di ricerca clinica e biomedica.

Reparto Lipidi ed arteriosclerosi

Il Reparto svolge attività di studio e consulenza nel settore delle malattie genetiche e degenerative caratterizzate da alterazioni della omeostasi e del trasporto intercellulare dei lipidi, in particolare:

- Studio delle basi molecolari di dislipidemie primarie e secondarie.
- Studio del ruolo dei lipidi circolanti sulla risposta infiammatoria e immunitaria di macrofagi e neutrofili in relazione allo sviluppo della lesione ateromastica e al danno vascolare.
- Studio *in vivo* e *in vitro* delle priorità ipocolesterolemizzanti e anti-aterosclerotiche di lipidi, antiossidanti e sostanze naturali.
- Identificazione di biomarcatori idonei alla diagnostica delle dislipidemie genetiche, delle vasculopatie e allo studio dei processi di apoptosi e necrosi in vari modelli cellulari.
- Sviluppo di modelli cellulari tridimensionali per lo studio dei meccanismi alla base dell'insorgenza e progressione dei tumori e la valutazione dell'efficacia dei trattamenti antineoplastici.
- Sviluppo di modelli *in vitro*, alternativi ai modelli *in vivo*, per lo studio delle patologie dovute ad alterazioni nell'assorbimento, trasporto o metabolismo dei lipidi e per la valutazione delle proprietà dei biomateriali in relazione alla loro potenziale citotossicità.
- Pareri per autorizzazione in deroga agli art. 8 e 9 del DL.vo del 27/01/1992 in relazione a ricerche sulle alterazioni patologiche del metabolismo lipidico a livello epatico e circolatorio.

Reparto Metodologie trasfusionali

L'attività del Reparto sarà indirizzata ad approfondire lo studio di modelli di trapianto di cellule CD34+ amplificate con l'utilizzo di fattori di crescita e altre molecole che hanno dimostrato avere effetto sul *lineage* MK, in topi NOD/SCID. Verrà valutata l'efficacia del trapianto di cellule espanse verso il *lineage* MK contemporaneamente a cellule staminali o CD34+ indirizzate verso altre popolazioni cellulari per un ripristino a breve e lungo termine di tutte le componenti ematopoietiche.

La capacità differenziativa del VPA sulla linea cellulare megacarioblastica UT7 verrà studiata utilizzando cellule primarie, mettendo a punto protocolli di espansione/trapianto in modelli animali.

Un altro aspetto dell'attività del Reparto riguarderà il miglioramento del flusso dei dati del Registro Nazionale delle Coagulopatie Congenite che attualmente è organizzato su base volontaria e non consente di avere dati completi. Il Registro delle Coagulopatie Congenite, per

la lunga storia e per le conoscenze acquisite, potrebbe rappresentare un modello di sorveglianza e di strumento gestionale per le altre malattie rare.

Reparto Oncologia medica

Nell'area oncologica medica si rileva la necessità di promuovere lo sviluppo di terapie oncologiche mirate, sia nel quadro degli attuali trattamenti chemioterapici, sia per quanto concerne lo sviluppo di trattamenti mirati contro alterazioni molecolari oncospecifiche (es. Glivec STI571 per l'inibizione della tirosinchinasi del recettore kit nella leucemia mieloide cronica). Sul primo aspetto, verrà valutata la rilevanza clinica del saggio *in vitro* della *extreme drug resistance* delle cellule neoplastiche, al fine di ottimizzare la scelta tra le diverse opzioni chemioterapiche, inizialmente nel carcinoma dell'ovaio e della mammella. In questi trial multicentrici, il Reparto svolgerà l'attività laboratoristica, interagendo con i diversi Centri oncologici clinici coinvolti nel trial specifico. Sul versante farmacogenomico, verranno proseguite le indagini sulle anomalie funzionali dei recettori dei fattori di crescita (es. IL-3, Flt3 ligando, VEGF) nelle leucemie acute. Inoltre, in base alle risultanze degli studi di *microarray* oncologici e degli studi di oncoproteomica, verranno sviluppate le terapie anti-neoplastiche mirate contro alterazioni molecolari specifiche dei diversi tipi di tumore (es. tirosinchinasi di recettori di fattori di crescita). Queste indagini di farmacogenomica verranno condotte dapprima *in vitro* e quindi in modelli preclinici *in vivo*. Il Reparto è inoltre implicato nello studio del ruolo svolto da alcuni microRNA nel controllo del differenziamento emopoietico, con la definizione di *loop* regolativi che hanno anche potenziale rilevanza fisiopatologica. Infine, altri studi hanno documentato che il recettore 2 della transferrina (TfR2) è un neoantigene tumorale, frequentemente e altamente espresso in alcuni tumori (gliomi maligni) e potrebbe, quindi, rappresentare un importante bersaglio terapeutico.

Reparto Oncologia molecolare

In questo settore saranno sviluppate ricerche di base, con l'obiettivo principale di contribuire all'analisi dei meccanismi molecolari alla base dell'oncogenesi. Lo studio comprenderà diversi modelli tumorali con particolare attenzione ai melanomi.

Sulla base dei profili di espressione genica ottenuti mediante la tecnica del *microarray*, abbiamo effettuato un'analisi comparativa con programmi informatici specifici tra cellule neoplastiche e corrispondenti controparti normali allo scopo di identificare geni selettivamente modulati nel programma genetico della cellula neoplastica. In particolare ci siamo focalizzati sul ruolo funzionale dei microRNA (miR). Nel melanoma, dove abbiamo già dimostrato il ruolo tumorigenico dei miR-221 e -222 attraverso la regolazione dei processi di proliferazione e differenziamento cellulare, i nostri studi proseguiranno su cellule staminali isolate da melanomi metastatici attraverso lo studio di modelli di tumorigenesi *in vitro* e *in vivo*. Un secondo aspetto riguarda lo studio dei processi di differenziamento in direzione neurale della linea umana di teratocarcinoma NT2/D1. In quest'ambito è in corso lo studio del ruolo svolto dal microRNA miR-10b nella soppressione dell'espressione di alcuni geni omeotici (HOX) e nell'indirizzo dato al processo differenziativo verso una specifica sottopopolazione di neuroni. Lo studio proseguirà precisando ulteriormente la regolazione genica dei geni bersaglio del miR-10b e dei geni HOX coinvolti.

Un'altra linea di ricerca consiste nella caratterizzazione del programma genico responsabile della proliferazione e differenziamento di cellule staminali embrionali (cES) murine. Le cES derivano direttamente dalla *Inner Cell Mass* dell'embrione di topo e sono un sistema ideale per

comprendere i meccanismi molecolari che controllano il ciclo cellulare mitotico di cellule con caratteristiche tumorigeniche. La capacità delle cES di generare teratocarcinoma, dopo inoculo in un sito ectopico nel topo, è un fenomeno molto peculiare poiché le cES sono geneticamente normali, a differenza della maggior parte cellule neoplastiche la cui crescita sembra essere associata a specifiche lesioni genetiche di oncogeni o geni tumore-soppressore. Questo studio potrebbe essere di primaria importanza nella comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della formazione di tumori originati da “cellule staminali tumorali”.

DIPARTIMENTO DEL FARMACO

La missione del Dipartimento del Farmaco (FARM) dell'ISS è centrata sulla valutazione di qualità, sicurezza, efficacia e appropriatezza d'uso dei medicinali e delle terapie disponibili e sulla ricerca su nuovi farmaci e nuove terapie per le malattie che colpiscono l'uomo.

Oltre a promuovere la ricerca nei settori più innovativi della farmacologia sperimentale, il FARM realizza e coordina iniziative orientate a potenziare la ricerca farmacologica e clinica di tipo pubblico nel nostro Paese, per favorirne l'integrazione, in funzione del comune obiettivo di curare e prevenire le malattie. Prioritario è chiaramente lo sviluppo delle collaborazioni con i centri di ricerca nazionali e internazionali più attivi e qualificati.

Le attività di consulenza tecnico-scientifica sono generalmente svolte su mandato del Ministero della Salute, dell'AIFA e di altre istituzioni nazionali. Con i suoi esperti il Dipartimento del Farmaco esegue la valutazione dei dossier regolativi per quanto attiene a qualità, sicurezza d'uso ed efficacia dei medicinali in relazione alle procedure centralizzate europee e al mutuo riconoscimento. Il Dipartimento svolge anche una consistente attività di consulenza altamente qualificata per l'EMA (Londra). Il Direttore del Dipartimento è, infatti, membro di due importanti Gruppi di lavoro dell'Agenzia stessa e precisamente: lo *Scientific Advisory Group for HIV/Viral Diseases* (SAG) e lo *Scientific Advice Working Party* (SAWP) che ha il ruolo rilevante di fornire supporto scientifico per lo sviluppo di nuovi farmaci e terapie. Altri esperti del Dipartimento partecipano ad ulteriori gruppi di lavoro tecnici dell'EMA e precisamente al *Pharmacovigilance Working Party*, l'*Efficacy Working Party*, il *Safety Working Party*. Il Dipartimento è responsabile del monitoraggio delle sperimentazioni cliniche sull'uomo con prodotti di nuova istituzione, ed è attivo nel settore della farmacovigilanza attiva su farmaci e terapie di particolare rilievo di sanità pubblica.

Per quanto riguarda le attività di controllo strumentali, il FARM – in collaborazione con istituzioni pubbliche nazionali e internazionali – sviluppa programmi per la valutazione delle caratteristiche chimiche e della purezza dei medicinali (incluse le specialità, i prodotti generici, i medicinali magistrali e officinali e quelli derivati dalle piante medicinali), dei prodotti di erboristeria, dei presidi medico-chirurgici e dei prodotti cosmetici, anche come Laboratorio Ufficiale di Controllo per la qualità dei Medicinali (OMCL-EDQM). La farmacovigilanza sui medicinali dopo la loro immissione in commercio comprende gli accertamenti sperimentali per la verifica della qualità dei medicinali e quelli conseguenti a segnalazioni di difetti e di reazioni avverse e quelli ispettivi sull'osservanza delle norme di buona pratica di laboratorio (*Good Laboratory Practice*, GLP) e di fabbricazione (*Good Manufacturing Practice*, GMP). Il Dipartimento del Farmaco svolge anche attività di consulenza su richiesta dall'Autorità Giudiziaria. Tutte le attività di controllo del Dipartimento sono svolte sotto Sistema di Assicurazione di Qualità.

Altre attività istituzionali del Dipartimento includono: i) il coordinamento del Segretariato della Farmacopea Ufficiale Italiana che, in quanto ente deputato alla definizione degli standard di qualità dei prodotti medicinali e delle sostanze usate nella loro fabbricazione, è anche punto di riferimento nazionale per il Segretariato della Farmacopea Europea; ii) l'Osservatorio su Fumo, Alcol e Droga: il Dipartimento si propone l'attività di rilevazione e informazione dei cittadini sui danni relativi all'uso e all'abuso di tali sostanze e educarli sul buon uso del farmaco e delle terapie disponibili.

Infine, il Dipartimento è impegnato in un'intensa attività di formazione degli operatori sanitari, in particolare su farmaci e terapie, e partecipa alla messa a punto di linee guida e protocolli terapeutici oltre che svolgere studi su qualità della vita e farmaco-economia.

Con l'attività dei propri esperti partecipa ai lavori di organismi nazionali e internazionali, compresi quelli relativi ai piani di intervento e alle iniziative socio-sanitarie per facilitare l'accesso a farmaci e alle terapie nei Paesi del sud del mondo (WHO, UNAIDS, *Global Fund*).

Per quanto riguarda i progetti di ricerca, sia clinica che di base, il Dipartimento sviluppa, in accordo con gli organi istituzionali dell'ISS, con il Ministero della Salute, con l'Agenzia del Farmaco e con le Autorità Sanitarie Regionali, attività di ricerca clinica su terapie innovative e strategie terapeutiche a grande impatto di sanità pubblica. Questa attività viene svolta in collaborazione con gli altri Dipartimenti e Centri dell'ISS e con i più avanzati centri di ricerca clinica e farmacologica nazionali (IRCCS, università, aziende sanitarie e ospedali, società scientifiche, enti di ricerca pubblici e privati) e internazionali in modo da creare reti clinico-terapeutiche e dipartimenti funzionali ai quali l'Istituto potrà fornire servizi di supporto e coordinamento. Per incrementare la ricerca clinica nazionale pubblica il Dipartimento del Farmaco si propone di potenziare la ricerca clinico-farmacologica in Italia fin dalle fasi precoci di sviluppo di una nuova molecola e di sviluppare piani di ricerca autonomi, non condizionati da logiche esclusivamente di mercato.

L'attività di ricerca del Dipartimento del Farmaco è principalmente orientata verso le seguenti aree cliniche: tumori; malattie cardiovascolari e dismetaboliche; malattie neurodegenerative e psichiatriche; patologie del sistema immunitario; AIDS e malattie di origine virale. Le aree prioritarie di intervento, all'interno delle aree cliniche, includono la salute del bambino, della donna e dell'anziano; la farmacogenomica e la farmacogenetica; la farmacoresistenza; l'aging e fattori di longevità; la farmacodipendenza, tossicodipendenza, sostanze d'abuso; lo sviluppo di farmaci innovativi e di bioterapie.

Per quanto riguarda gli aspetti metodologici lo sforzo del Dipartimento del Farmaco è indirizzato verso la promozione della ricerca traslazionale, verso studi su strategie terapeutiche innovative; sui farmaci e le terapie per i quali non si dispone di informazioni sufficienti; sui farmaci orfani e studi sulle nuove indicazioni; studi comparativi e sulle associazioni e combinazioni di farmaci; studi a lungo termine e sulla qualità della vita.

Resoconto attività 2007

Per quanto riguarda l'attività di ricerca, il Dipartimento, di concerto con i Direttori di Reparto e con tutto il personale, ha investito risorse e capacità nei seguenti specifici argomenti:

– Tumori

- Meccanismi di farmacoresistenza, in particolare quelli che rendono le cellule tumorali non più suscettibili al trattamento chemioterapico e quelli che inducono resistenza negli agenti infettivi.
- Produzione di anticorpi monoclonali umani per la diagnosi e terapia dei tumori.
- Studi sull'attività cannibalica dei tumori umani. Possibile ruolo nell'evasione tumorale e approcci terapeutici innovativi.

– Malattie neurodegenerative

- Possibilità di modulazione farmacologica dei fenomeni neurodegenerativi.
- Patogenesi, modelli sperimentali e nuovi approcci farmacologici nelle malattie neurodegenerative: SLA, Alzheimer, Parkinson.

- *Malattie cardiovascolari*
 - Trattamento e prevenzione farmacologica delle patologie cardiovascolari e della degenerazione miocardica.
 - Valutazione a lungo termine dell'impatto clinico della prevenzione secondaria cardiovascolare.
 - Strategie terapeutiche sperimentali delle patologie cardiovascolari attraverso la costruzione e lo studio di ceppi di topi geneticamente modificati.
- *Psichiatria e psicofarmacologia*
 - Efficacia e sicurezza dei farmaci per il trattamento dei disturbi cognitivi e del comportamento.
 - Invecchiamento
 - Fattori cellulari di longevità, farmacologia del differenziamento cellulare.
 - Ruolo delle alterazioni *redox* nei meccanismi di invecchiamento e degenerazione cellulare: studi *in vitro* ed *ex vivo* in pazienti con Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva.
- *HIV/AIDS e malattie da virus*
 - Nuovi farmaci e nuove strategie di trattamento antiretrovirale dell'adulto e del bambino e in gravidanza.
 - Progetto di ricerca sull'interruzione della trasmissione materno-fetale di HIV in Paesi in via di sviluppo.
 - Efficacia e sicurezza della terapia antiretrovirale in Paesi con risorse limitate.
 - Nuovi bersagli antiretrovirali: gli inibitori dell'integrasi.
 - Nuove strategie terapeutiche e farmaci eziologici contro le epatiti virali.
 - Valutazione della qualità della vita nei pazienti con infezione da HIV/AIDS.
- *Sistema immunitario*
 - Effetto immunomodulante di proteine virali e farmaci antiretrovirali.
 - Studio delle alterazioni indicative di immunotossicità farmacologica.
- *Tossicodipendenza e doping*
 - Studi e ricerche sulle nuove sostanze d'abuso.
 - Studi e ricerche sulle nuove sostanze nel doping.
 - Meccanismi alla base della tolleranza e della dipendenza dei farmaci psicotropi.
- *Salute della donna e del bambino*
 - Studio delle basi perinatali di patologie croniche dell'adulto.
 - Modelli sperimentali per lo studio degli effetti avversi sul sistema riproduttivo di farmaci somministrati durante lo sviluppo.
 - Farmacologia per la salute della donna: studio dei meccanismi alla base dell'influenza del genere (*gender differences*) sulla reattività vascolare.
- *Farmacologia generale*
 - Interpretazione delle basi molecolari, cellulari e fisiopatologiche dei processi di traduzione dei segnali biologici che hanno rilevanza in terapia clinica e nello sviluppo di nuovi farmaci.
 - Il controllo del dolore acuto e cronico: nuovi approcci farmacologici.
 - Potenziale impiego di tossine batteriche in terapia.

- Nuovi approcci per la valutazione preclinica dei farmaci: modelli sperimentali per la definizione del potenziale effetto in clinica dei farmaci.
- *Progetti di ricerca trasversali*

Alcuni progetti di ricerca trasversali sono stati direttamente coordinati dalla Direzione del Dipartimento, in particolare:

 - La partnership internazionale con i National Institutes of Health (NIH) degli Stati Uniti, per ricerche nel campo delle terapie oncologiche, cardiovascolari, anti-infettive e neurodegenerative.
 - Il Network europeo per la ricerca clinica HIV (NEAT).
 - Il Network europeo per la ricerca oncologica (EUROCAN).
 - Il Progetto Salute della Donna e *Gender Medicine* (cofinanziato 1% MinSal).
 - Il Progetto sullo studio dei determinanti genetici e molecolari della relazione tra invecchiamento e patologie cardiovascolari (cofinanziato MinSal).
 - Il programma di Solidarietà con i Paesi in via di sviluppo (Esther).
- *Attività istituzionali di controllo e consulenza*

Per quanto riguarda le attività istituzionali di controllo e consulenza, la Direzione del Dipartimento ha rinforzato la partnership con l'AIFA e insieme ad altre istituzioni pubbliche, nazionali e internazionali, ha portato avanti programmi dedicati alla valutazione delle caratteristiche chimiche e della purezza dei medicinali e quelli derivati dalle piante medicinali, dei presidi medico-chirurgici e dei prodotti cosmetici. In particolare, si segnala il programma sperimentale per la verifica della qualità dei medicinali e per combattere la contraffazione e il programma sulla qualità dei medicinali generici: valutazione dell'effettiva similarità tra prodotti generici e corrispondenti prodotti originatori.

Attraverso l'impegno nella Commissione per i farmaci di nuova istituzione (ex Comma C) il FARM ha rafforzato il suo ruolo di promozione e monitoraggio della sperimentazione clinica di fase I in Italia.

Le attività di farmacovigilanza sui medicinali dopo la loro immissione in commercio sono state portate avanti, di concerto con l'AIFA, attraverso il monitoraggio attivo dell'impiego di nuovi farmaci e il coordinamento di Registri nazionali. Il Dipartimento ha infine svolto una consistente attività di consulenza tecnico-scientifica altamente qualificata per l'EMA (Londra) e ha portato avanti altre importanti attività istituzionali che includono il coordinamento del Segretariato della Farmacopea Ufficiale Italiana e l'Osservatorio su Fumo, Alcol e Droga.
- *Altre attività*

Nell'anno 2007 il Dipartimento del Farmaco ha organizzato convegni e corsi di formazione su temi strategici di sanità pubblica, alcuni dei quali hanno ottenuto crediti formativi ECM.

 - Il Convegno nazionale Tabagismo e Servizio Sanitario Nazionale, giunto alla sua IX edizione, è stato organizzato al fine di contribuire allo sviluppo di un sistema di monitoraggio e comunicazione per tutti gli utenti nell'ambito delle politiche di prevenzione sulle tossicodipendenze e sugli stili di vita sani.
 - Nel Convegno nazionale Tutela della salute nelle attività sportive e la lotta contro il doping, sono stati illustrati i risultati e l'attività svolta dalla Commissione per la vigilanza e il controllo sul doping e per la salute nelle attività sportive (CVD), i progetti di ricerca nella lotta al doping e le campagne informative e formative sul tema del doping.

Di interesse anche i seguenti convegni:

- Terapie estetiche: reazioni avverse ed effetti collaterali (organizzato in collaborazione con l'ISPLAD).
- Sperimentazioni cliniche di nuove terapie contro il cancro: una guida per i pazienti.
- Attualità sull'impiego e sulla sperimentazione dei Radiofarmaci in Italia (organizzato in collaborazione con l'Associazione Italiana di Medicina Nucleare e *Imaging Molecolare*).

Per quanto riguarda i corsi di formazione è stato organizzato un corso di formazione per la tutela della salute nelle attività sportive e la prevenzione del doping (svoltosi in sei edizioni) e il master per ispettore investigativo antidoping.

Descrizione dei reparti

Reparto Farmacodipendenza, tossicodipendenza e doping

Missione:

- studiare ed analizzare gli aspetti epidemiologici, sociologici, farmacologici e clinici legati all'uso, abuso e/o misuse di sostanze.

Attività di ricerca:

- studi di farmacocinetica e di farmacodinamica di farmaci e sostanze d'abuso;
- studi di immunofarmacologia e di immunotossicologia.

Attività istituzionali e di controllo:

- vigilanza doping;
- controllo farmaci inseriti nelle tabelle sostanze stupefacenti;
- Programma nazionale di Valutazione Esterna di Qualità delle Droghe nei Capelli (HAIRVEQ);
- Osservatorio su Fumo, Alcol e Droga.

Reparto Farmacogenetica, farmacoresistenza e terapie sperimentali

Missione:

- anticorpi monoclonali umani in forma di *single chain fragment variable* (scFv) per lo sviluppo di immunoterapie per patologie virali a carattere pandemico (H5N1, Co-SARS);
- sviluppo e sperimentazione in modelli animali Hu-SCID di nuovi composti anti-HIV di derivazione biologica e biotecnologica inclusi anticorpi monoclonali specifici;
- immunoterapia di tumori a resistenza multipla ai farmaci (MDR). Disegno, costruzione e sviluppo di proteine di fusione composte da anticorpi monoclonali ed enzimi e/o linfochine per la cura loco-regionale del cancro;
- studio di nuovi composti ad attività pro-apoptotica inclusi anticorpi monoclonali capaci di inibire in modo specifico e selettivo la proliferazione di tumori a resistenza multipla ai farmaci (MDR) mediata da MDR1-P-glicoproteina e/o MRP1;
- terapie antitumorali innovative.

Attività di ricerca:

- caratterizzazione strutturale, funzionale e genica dei meccanismi di azione che influenzano l'efficacia dei farmaci, inclusa l'identificazione di agenti non-tossici capaci di accrescere l'efficacia e il metabolismo di vari composti farmaceutici;

- caratterizzazione dei meccanismi cellulari in grado di acidificare l'ambiente cellulare e uso di inibitori specifici delle pompe protoniche al duplice scopo di chemiosensibilizzare i tumori umani e di usare la alcalinizzazione dell'ambiente tumorale come nuovo approccio anti-neoplastico;
- caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base del cannibalismo tumorale e messa a punto di nuovi presidi terapeutici basati sull'inibizione dell'attività fagocitica delle cellule tumorali;
- terapie antitumorali e dirette verso agenti infettivi e trasmissibili mediante anticorpi monoclonali somatici e ricombinanti. Modulazione del fenotipo MDR mediante l'uso di anticorpi monoclonali. Identificazione di composti terapeutici in grado di modulare le connessioni citoscheletriche alle proteine di membrana;
- messa a punto e utilizzo di modelli tumore umano-topo SCID per test preclinici sulla efficacia di nuovi approcci terapeutici anti-tumorali, incluse immunoterapie adottive;
- studio dei microbicidi come nuova strategia terapeutica per la prevenzione della trasmissione di malattie trasmesse sessualmente e utilizzo del modello uomo-topo SCID.

Attività istituzionali e di controllo:

- valutazione di dossier di prodotti di derivazione immuno/biotecnologia per la prima esposizione sull'uomo di terapie anti tumorali, anti infettive e anti infiammatorie;
- collaborazioni alle attività ispettive con AIFA di siti GMP destinati allo sviluppo di farmaci biotecnologici inclusi anticorpi monoclonali;
- sviluppo di linee guida e realizzazione di monografie nazionali e internazionali per la produzione, l'uso e la commercializzazione di prodotti di derivazione biotecnologica/cellulare somatica/genica;
- autorizzazioni in deroga per l'uso di modelli animali per la sperimentazioni di farmaci di derivazione biotecnologica;
- partecipazione a progetti cooperativi italiani ed europei in qualità di membri del comitato scientifico e unità operativa;
- brevetti per lo sviluppo industriale di prodotti e farmaci anti infettivi e anti tumorali;
- attività didattiche nell'ambito di corsi universitari e corsi di formazione biotecnologica;
- attività di tutoraggio per l'espletamento di tesi sperimentali;
- valutazione, in qualità di esperto, dei profili scientifici e accademici per l'arruolamento e l'inquadramento del personale di ricerca e d'insegnamento in ambito nazionale e internazionale.

Reparto Farmacologia biochimica e unità di coordinamento dell'attività di consulenza tecnico-scientifica

Missione:

- studiare e valutare la sicurezza dei farmaci;
- contribuire alla diffusione di conoscenze sull'uso corretto dei prodotti medicinali;
- coordinare l'attività di consulenza scientifica del Dipartimento.

Attività di ricerca:

- studio di meccanismi di tossicità in modelli sperimentali non clinici *in vitro* e *in vivo*, tramite indagini sul sistema enzimatico di biotrasformazione metabolica, sul sistema nervoso colinergico e sul sistema immunitario.