

## XIV LEGISLATURA – DISEGNI DI LEGGE E RELAZIONI - DOCUMENTI

Tabella 6. Contributi autorizzati per la pubblicazione ripartiti per tipologia

Tipo di contributo	Pubblicazioni italiane	Pubblicazioni straniere	Totale
Contributi su riviste	104	416	520
Contributi su monografie	36	19	55
	Congressi nazionali	Congressi internazionali	
Relazioni a congressi	43	17	60
Comunicazioni a congressi	13	11	24
Riassunti a congressi	74	76	150
Totale	270	539	809

Per un utile confronto della produzione editoriale dell'ultimo quinquennio, si riportano in Tabella 7 i dati relativi ai singoli anni (1996-2000); in media sono stati presentati 823,2 contributi per anno, con una leggera flessione nel 1998 (774 contributi).

Tabella 7. Numero dei contributi autorizzati per la pubblicazione negli anni 1996-2000

Tipo di contributo	1996	1997	1998	1999	2000
Contributi su riviste e monografie					
<i>pubblicazioni italiane</i>	109	91	88	88	140
<i>pubblicazioni straniere</i>	416	407	391	439	435
Relazioni, comunicazioni e riassunti					
<i>congressi nazionali</i>	137	117	116	96	130
<i>congressi internazionali</i>	251	196	179	186	104
Totale	913	811	774	809	809

Nel corso del 2000 sono stati acquisiti dall'Institute for Scientific Information (ISI) di Philadelphia e resi disponibili su rete locale i dati sull'impact factor dei periodici sui quali sono stati pubblicati i lavori dell'Istituto; in questo modo è stata offerta ai ricercatori l'informazione sul numero di citazioni ottenute dagli articoli pubblicati e indicizzati dall'ISI fino al luglio 2000. Considerata l'utilità di disporre di strumenti di confronto e valutazione della produzione scientifica interna, si prevede di richiedere aggiornamenti periodici dei dati elaborati dall'ISI.

È stata inoltre realizzata una nuova versione del sito web istituzionale caratterizzata da una migliore organizzazione delle informazioni, dall'aggiornamento e dall'aggiunta di nuovi contenuti (es. Inventario nazionale delle sostanze chimiche e Archivio dei preparati pericolosi). Si è inoltre raggiunta la consapevolezza che l'informazione da diffondere in rete deve rispondere ad un piano organico e coordinato che assicuri la massima fruibilità del sito e la sua più ampia flessibilità in riferimento alle finalità istituzionali dell'Ente.

### Sviluppo di sistemi informativi

È proseguita nel corso del 2000 l'attività di sviluppo di procedure automatizzate messe a punto dal Servizio Elaborazione Dati.

Tra le realizzazioni a più alto impatto per la fluidità della comunicazione sia interna che esterna, si segnala la costruzione del portale Intranet raggiungibile al seguente indirizzo <http://www.intranet.iss.it>. Il portale, oltre a fornire link utili verso siti istituzionali e non, intende raggruppare tutte le informazioni

relative all'attività dell'Istituto avviando un servizio di web-hosting rivolto a tutti i laboratori, servizi e ad altre entità presenti in Istituto.

Nel portale trovano la loro collocazione anche i link a tutte le basi di dati attualmente consultabili in Istituto, in modo tale da soddisfare l'esigenza di poter accedere a strumenti di lavoro da un'unica fonte di informazione. Il portale offre inoltre il servizio di WebMail che permette l'utilizzo della posta elettronica tramite un qualsiasi navigatore (evitando l'utilizzo di programmi di posta elettronica) e la possibilità di accedere al servizio anche dall'esterno dell'Istituto.

L'attività di collaborazione del Servizio Elaborazioni Dati a progetti di ricerca curati dai vari laboratori dell'Istituto ha riguardato, tra l'altro:

- la realizzazione dell'applicativo software occorrente per la gestione delle informazioni inerenti la sperimentazione di piante geneticamente modificate;
- la messa a punto e l'implementazione di parte del software realizzato per la gestione del Registro nazionale degli assuntori di ormone della crescita;
- la realizzazione di strutture per siti web relativi a malattie rare, farmaci orfani e Progetto europeo NEPHIRD, la costruzione di database relazionali e la preparazione di un software dedicato per la gestione dei dati relativi al progetto Malattie rare, in collaborazione con il Laboratorio di Ultrastrutture;
- l'analisi della problematica di trasformazione di un archivio di piante officinali in un database relazionale, in collaborazione con il Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia.

## **Attività di ricerca**

PAGINA BIANCA

## PROGETTI DI RICERCA D'ISTITUTO

Tali progetti sono articolati in 14 aree tematiche, individuate sulla base dei bisogni sanitari del Paese e in linea con i programmi di ricerca definiti nell'ambito dell'UE.

I progetti, originati da linee autonome proposte dai ricercatori e vagliati alla luce dei compiti che l'Istituto è chiamato a svolgere nell'ambito del Servizio sanitario nazionale, sono stati discussi e approvati dal Comitato scientifico dell'Istituto.

L'attività documentata per il 2000 riguarda i progetti del triennio 1997-1999 che hanno ottenuto la proroga di un anno.

### AREA 1 - FARMACI

#### La base molecolare dell'efficacia dei farmaci

*Responsabile scientifico*

Tommaso Costa (Laboratorio di Farmacologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

L'identificazione di mutanti in serina 207 in elica 5 del recettore  $\beta_2$  adrenergico, aventi caratteristiche divergenti per quanto riguarda la stimolazione da agonista, affinità per agonisti o antagonisti e livello di attività costitutiva, ha permesso di classificare quattro diversi fenotipi che sono indotti dalla modificazione di questo residuo.

Particolarmente interessanti sono i mutanti che recano sostituzioni con residui idrofobici del tipo valina o isoleucina. In questi recettori è aumentata l'affinità per ligandi non catecolici e per alcuni antagonisti mentre risulta molto diminuita quella per le catecolamine, indicando un completo cambiamento della configurazione del sito di riconoscimento del recettore.

Altre mutazioni appaiono completamente alterare la scala di efficacia dei vari agonisti, sopprimendo la differenza tra agonisti pieni e agonisti parziali nell'indurre l'attivazione della G proteina. I mutanti più significativi dei vari gruppi fenotipici, sinora caratterizzati, saranno utilizzati per la preparazione di linee cellulari permanenti per poter studiare in dettaglio la loro capacità di stimolare l'adenilciclasi.

Una serie di nuovi studi sono stati dedicati al recettore della nociceptina (OP4), un membro della famiglia dei recettori oppioidi, dai quali si distingue per le differenze nel profilo farmacologico. Con l'utilizzo di una serie di composti ad elevata efficacia e affinità per tale recettore e la preparazione di una proteina di fusione fra il recettore OP4 e Go proteina, è stata esaminata la capacità del recettore attivato di indurre rilascio di GDP. Il costrutto sarà utilizzato per analizzare le differenze tra agonisti e superagonisti.

#### Effetti sulla struttura di farmaci dei processi di sterilizzazione mediante irraggiamento con radiazioni ionizzanti

*Responsabile scientifico*

Luisa Valvo (Laboratorio di Chimica del Farmaco)

*Sintesi dell'attività svolta*

La sterilizzazione mediante radiazioni ionizzanti è principalmente utilizzata per quei farmaci che, a causa della loro termolabilità, non possono essere sterilizzati con i metodi convenzionali. Si è quindi ritenuto opportuno proseguire gli studi sugli effetti dell'irraggiamento sulla struttura delle cefalosporine. Tali studi hanno permesso di evidenziare:

- la formazione sia di prodotti di degradazione sia di radicali liberi stabili indotti dalle radiazioni;
- l'idoneità della tecnica ESR nell'individuazione di antibiotici irraggiati.

Sono stati inoltre intrapresi studi su farmaci antiulcera contenenti ranitidina, presenti sul mercato sotto forma di soluzioni iniettabili pronte all'uso e che subiscono degradazione per effetto della luce e del calore.

Lo scopo della ricerca è di evidenziare se l'irraggiamento possa influire sulla velocità di degradazione e sulla formazione di impurezze e, di conseguenza, se alla base del fenomeno di ingiallimento caratteristico delle soluzioni iniettabili siano ipotizzabili reazioni innescate da meccanismi radicalici.

### **Farmacologia dell'età evolutiva**

*Responsabile scientifico*

Alberto Loizzo (Laboratorio di Farmacologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Le ricerche svolte sull'influenza dello stress lieve e ripetuto postnatale, unito ad un lieve stimolo dolorifico, sugli ormoni "da stress", hanno dimostrato un aumento significativo del contenuto di (ir)ACTH nell'ipofisi e nel plasma dei topini, perdurante almeno fino a 24 ore dopo l'ultimo trattamento, antagonizzato dal trattamento concomitante di naloxone.

Gli studi preliminari sui potenziali evocati visivi e sui potenziali oscillatori nel topo hanno dimostrato l'effetto inibitorio tempo e dose correlati su questi parametri dell'anestesia con uretano.

Gli studi sul sistema orfaninergico hanno evidenziato l'effetto composito dell'orfanina sulla soglia nocicettiva nei roditori (analgesia dopo somministrazione intratecale e iperalgesia dopo somministrazione intracerebroventricolare) e il suo effetto antagonista sulle risposte epilettiformi degli oppioidi nei roditori e lagomorfi. Questi effetti sono bloccati dall'antagonista del recettore dell'orfanina Phe1y. Infine, l'orfanina riduce l'aumentato release di dopamina e dei suoi metaboliti, indotto dalla morfina, preferenzialmente nel *nucleus accumbens* rispetto al *nucleus caudato*.

Gli studi sui cannabinoidi sintetici e naturali hanno dimostrato l'assenza di attività del nabilone sui fenomeni di plasticità sinaptica e di apprendimento spaziale nel ratto adulto, così come è stato dimostrato anche per alcuni bloccanti dei canali del K<sup>+</sup> (4-aminopiridina e TEA).

### **Identificazione di principi attivi da piante usate in Africa come antitumorali e antimalariche, previa conferma biologica**

*Responsabile scientifico*

Corrado Galeffi (Laboratorio di Chimica del Farmaco)

*Sintesi dell'attività svolta*

Dalla *Peschiera fuchsiaeifolia*, usata in Brasile come antimalarico, sono stati isolati sei alcaloidi indolici dimeri tra cui la voacamina che ha mostrato attività *in vitro* antimalarica, antischistosomiasi e antitubercolare.

L'attività antimalarica sarà saggiata *in vivo*, anche in considerazione della ridotta attività citotossica.

Dalla *Curculigo pilosa* del Benin furono isolati nuovi glucosidi norlignanici (del tipo dell'antitumorale hypoxoside da noi isolato da *Hypoxis* della stessa famiglia Hypoxidaceae), quali la pilosidina, che ha mostrato attività antiaritmica, potenziante della adrenalina, e intrinseca attività vasocostrittrice per la quale sono in corso studi *in vivo* come ipertensivo.

Da altre specie del genere *Strychnos* del Madagascar, da cui furono isolati alcaloidi come la malagashanina, che inverte la resistenza alla cloroquina in ceppi di *Plasmodium* clorochino-resistenti, sono stati isolati e identificati nuovi alcaloidi C-3 epimeri.

Nuovi composti isoflavonoidici sono stati identificati nella *Millettia pervilleana* (Leguminosae) del Madagascar, dalla quale si erano ottenuti isoflavanoni attivi su linee di cellule tumorali di polmone, seno e Sistema nervoso centrale.

### **Modelli e metodi di valutazione del potenziale immunomodulante di xenobiotici**

*Responsabile scientifico*

Roberta Pacifici (Laboratorio di Biochimica Clinica)

*Sintesi dell'attività svolta*

L'esposizione *in vitro* all'ecstasy (3,4 metilendiossimeramfetamina, MDMA) altera alcuni parametri immunitari quali la funzione regolatoria delle cellule T, l'attività citotossica dei linfociti T, l'attività delle cellule *natural killer* e la funzione dei macrofagi.

Nel ratto, la somministrazione di MDMA produce una soppressione della risposta linfoproliferativa e una diminuzione dei linfociti circolanti, accompagnata da un aumento del corticosterone plasmatico. È stata ipotizzata un'azione diretta dell'MDMA sui linfociti ovvero un'azione indiretta mediata dall'asse adreno-pituitario (asse AP) e/o dal Sistema Nervoso Simpatico (SNS).

Il trattamento acuto con MDMA su volontari sani produce una disfunzione immune che si correla alle caratteristiche farmacologiche e quindi alle concentrazioni plasmatiche di MDMA. Si osserva una diminuzione delle cellule T CD4+, della risposta funzionale dei linfociti a stimoli mitogenici e un incremento del numero di cellule *natural killer* circolanti. Un contemporaneo aumento del cortisolo plasmatico supporta l'ipotesi della liberazione, indotta dall'MDMA del fattore di rilascio della corticotropina dall'ipotalamo e conseguente attivazione dell'asse AP e del SNS.

**Modulazione farmacologica della neurotrasmissione da aminoacidi eccitatori: possibili implicazioni terapeutiche per patologie del SNC***Responsabile scientifico*

Stefano Sagratella (Laboratorio di Farmacologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

È stato proseguito lo studio sull'effetto dei neurosteroidi su modelli di neurodegenerazione. Nella eccitotossicità da glutammato su colture primarie di ippocampo di ratto è stato dimostrato un ruolo protettivo da parte dell'allopregnenolone e analoghi risultati sono stati riscontrati sul ruolo protettivo del deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) contro la eccitotossicità da NMDA. Su fettine di ippocampo di ratto è stato evidenziato un ruolo protettivo di allopregnenolone e THDOC su alcuni modelli di epilessia.

Sono stati valutati gli effetti del deidroepiandrosterone (DHEA) e del DHEA-S sulla tossicità indotta da proteina  $\beta$ -amiloide in colture primarie di neuroni di ippocampo. In tale modello, neuroni di ippocampo trattati per 72 ore con il frammento 25-35 della proteina amiloide (A) nella sua forma fibrillare, vanno incontro a morte cellulare in maniera dose-dipendente. Il pretrattamento dei neuroni con DHEA o con DHEA-S (in un range di dosi compreso tra 10 nM e 1  $\mu$ M) ha indotto un lieve aumento della sopravvivenza cellulare in seguito a trattamento con (A).

**Modulazione farmacologica della neurotrasmissione dopaminergica striatale in modelli di patologie dei gangli della base***Responsabile scientifico*

Patrizia Popoli (Laboratorio di Farmacologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

I risultati ottenuti hanno confermato l'ipotesi che i recettori A2A dell'adenosina possano costituire dei target alternativi per lo sviluppo di trattamenti per patologie neurodegenerative striatali. È stato infatti dimostrato che antagonisti A2A contrastano il disordine ipocinetico tipico del morbo di Parkinson (modello della lesione unilaterale della *substantia nigra* da 6-idrossidopamina), e risultati preliminari indicano che tali farmaci possiedono effetti neuroprotettivi in un modello sperimentale di corea di Huntington (lesione bilaterale dello striato da acido chinolinico).

È stato inoltre studiato il possibile coinvolgimento dei recettori mGlu5 del glutammato nella modulazione della funzionalità striatale. I risultati iniziali hanno dimostrato che un agonista mGlu5 (CHPG) induce effetti simili a quelli ottenibili tramite stimolazione degli A2A, il che suggerisce un possibile ruolo neuroprotettivo degli antagonisti mGlu5.

La futura attività di ricerca sarà dedicata alla verifica di questa ipotesi e alla definizione delle interazioni funzionali tra recettori mGlu5 e A2A nella regolazione della funzionalità striatale.

**Modulazione farmacologica del processo apoptotico: ruolo del bilancio ossidativo***Responsabile scientifico*

Valter Malorni (Laboratorio di Ultrastrutture)

Il progetto si articola in tre linee di ricerca:

- **Ossidazione delle *Low Density Lipoproteins* (LDL) e alterazioni dell'omeostasi cellulare**  
*Responsabile scientifico:* Valter Malorni
- **Meccanismi oncogenetici della progressione neoplastica (invasività tumorale, neoangiogenesi): prospettive di sviluppo bioterapeutico**  
*Responsabile scientifico:* Valter Malorni
- **Abnormal purine metabolism in Duchenne-type muscular dystrophy: does adenosine play a role in promoting muscular degeneration and loss of function?**  
*Responsabile scientifico:* Carla Fiorentini

*Sintesi dell'attività svolta*

Si riassumono i principali risultati conseguiti:

- **Meccanismi di regolazione del processo di degenerazione e morte cellulare**  
I processi di morte cellulare programmata sono caratterizzati dal ruolo chiave svolto da alcune molecole ad attività redox e da alcuni organelli subcellulari.  
Sono stati studiati l'effetto dei radicali dell'ossigeno e la variazione del potenziale della membrana mitocondriale. In particolare, è stata studiata la sensibilizzazione all'apoptosi sia recettore mediata che indotta da agenti che agiscono direttamente sul potenziale della membrana mitocondriale.  
È stato individuato il ruolo chiave svolto dalle proteine della famiglia 4.1 nella morte Fas-mediata e della iperpolarizzazione della membrana mitocondriale in quella mitocondrio-mediata.
- **Farmaci e composti capaci di influenzare il processo di degenerazione, invecchiamento e morte cellulare**  
Sono stati individuati i meccanismi subcellulari coinvolti nella modulazione dell'apoptosi da parte di farmaci purinergici adenosinici e di composti con attività antiossidante.  
È stata in particolare studiata l'attività di una classe di composti di particolare interesse in chimica medica: i carbossifullereni.  
Questi composti si sono dimostrati di grande efficacia protettiva nell'invecchiamento e nella morte sia spontanea che indotta in cellule appartenenti a differenti istotipi: linfoidi, epiteliali, e neuronali.
- **Ruolo della degenerazione cellulare in patologia umana**  
È stato determinato il ruolo dei processi di *spreading* citoscheletro-mediati, con particolare riguardo al ruolo delle integrine e la loro modulazione tramite farmaci e citochine sia nei processi degenerativi che nel controllo della proliferazione e della morte cellulare (anoikia).  
Sono anche state analizzate le relazioni tra alterazioni dell'omeostasi cellulare in modelli molto diversi selezionati per caratteristiche di crescita e il ruolo dei processi di adesione omotipica ed eterotipica. Sono anche stati considerati alcuni enzimi e farmaci di rilievo nella regolazione del bilancio ossidativo intracellulare associati a processi degenerativi e di morte cellulare in sistemi *in vitro* di tipo neuronale.  
È anche iniziata un'analisi *ex vivo* di parametri redox su cellule e plasma (es. LDL ossidate) provenienti da pazienti con patologie degenerative o associate ad invecchiamento (es. le bronchiti croniche ostruttive).  
Sono anche state studiate alcune caratteristiche di interesse diagnostico in una malattia genetica caratterizzata da alterazioni redox e invecchiamento precoce (Anemia di Fanconi). Infine, sulla base di precedenti risultati sono stati analizzati i meccanismi apoptotici delle cellule muscolari differenziate, i miotubi.



### **Modulazioni morfologiche, biochimiche e metaboliche, ed effetti dei farmaci nei modelli di patologie cerebrali vascolari in animali giovani e vecchi**

*Responsabile scientifico*

Annarita Meneguz (Laboratorio di Farmacologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Sono iniziati alcuni studi sulla caratterizzazione metabolica di ceppi di ratti non usati di routine in studi di tossicità, quali il ceppo Lewis e il Dark Agout che manifestano polimorfismo genetico.

La conoscenza delle caratteristiche metaboliche di questi ceppi, che possono essere suddivisi in metabolizzatori lenti e veloci, è necessaria per analizzare la possibilità di ottenere un modello preclinico attendibile e adeguato per studi cinetici e metabolici *in vivo*, da affiancare a studi *in vitro* di meccanismi d'azione, mirati in particolare allo studio di problemi di *safety* farmacologica.

### **Nuovi composti potenzialmente attivi nel trattamento di neuropatologie degenerative**

*Responsabile scientifico*

Franco Gatta (Laboratorio di Chimica del Farmaco)

*Sintesi dell'attività svolta*

Nell'ambito del programma di ricerca sulla sintesi di inibitori della colinesterasi atti a correggere il deficit colinergico, uno dei responsabili del progressivo deterioramento delle funzioni cerebrali nelle neuropatie degenerative, sono stati preparati analoghi mono e bicicli della Rivastigmina, farmaco attualmente impiegato nel trattamento delle forme lievi e iniziali del morbo di Alzheimer.

Le prove farmacologiche *in vitro* e *in vivo* dei composti sintetizzati hanno consentito di individuarne uno ad attività comparabile con quella del farmaco di riferimento.

Contemporaneamente a tale attività, sono stati sintetizzati derivati pirazolopirimidinici analoghi dello Zaleplon, recente farmaco utilizzato per il trattamento delle forme persistenti di insonnia.

### **Parametri strutturali, conformazionali ed energetici di rilevanza nello studio delle interazioni farmaco-sito attivo**

*Responsabile scientifico*

Marina Cotta Ramusino (Laboratorio di Chimica del Farmaco)

*Sintesi dell'attività svolta*

Scopo del progetto è quello di approfondire lo studio di parametri molecolari che influenzano i meccanismi di interazione farmaco-sito attivo.

Sono stati oggetto di studio alcuni derivati degli acidi 1-4 diidropiridindicarbossilici ad azione calcio bloccante, utilizzati nella terapia delle affezioni cardiovascolari.

Mediante l'uso di tecniche computazionali di meccanica molecolare *force-field* sono state investigate le interazioni di tali derivati diidropiridinici con un peptide sintetico che riproduce le caratteristiche del canale del calcio di tipo L.

Lo studio ha permesso di valutare l'energia di interazione di ciascuna struttura considerata con il canale sintetico del calcio e tale parametro è stato correlato con i dati di attività biologica (valori di IC50 per il blocco, indotto dallo ione Ca<sup>2+</sup>, della contrazione dell'aorta di ratto depolarizzata dallo ione K<sup>+</sup>).

La procedura computazionale si è dimostrata in grado di differenziare la (S) amlodipina (eutomero) dalla (R) amlodipina, predicendo, in accordo con il dato di attività biologica, una maggiore energia di interazione della prima rispetto alla seconda.

## **Proprietà di stato solido dei farmaci**

*Responsabile scientifico*

Marina Cotta Ramusino (Laboratorio di Chimica del Farmaco)

*Sintesi dell'attività svolta*

Scopo del progetto è lo studio delle proprietà di stato solido dei farmaci in relazione alla loro influenza sulle caratteristiche di stabilità e sulla biodisponibilità del prodotto finito. Nel 2000 lo studio è stato rivolto a farmaci di consolidato e ampio uso terapeutico, quali il flunisolide e il beclometasone dipropionato, che sono stati caratterizzati mediante tecniche spettroscopiche e termoanalitiche.

I principali obiettivi conseguiti si possono riassumere nei seguenti punti:

- caratterizzazione chimico-fisica del flunisolide nelle due varianti commerciali: la forma anidra e la forma emiidrata. Preparazione e caratterizzazione di una seconda forma anidra del flunisolide. Comparazione del comportamento termico dei due polimorfi e della forma emiidrata, della loro stabilità nello stato solido a stress meccanici e della loro solubilità all'equilibrio;
- caratterizzazione chimico-fisica della forma anidra e idrata del beclometasone dipropionato e studio della loro stabilità fisica mediante stress termici e meccanici.

## **Qualità dei medicinali. sistemi analitici combinati e/o complementari per la definizione della qualità di materie prime**

*Responsabile scientifico*

Anna Farina (Laboratorio di Chimica del Farmaco)

*Sintesi dell'attività svolta*

Sono continuati gli studi finalizzati allo sviluppo di metodologie convalidate per la verifica della qualità di principi attivi di specialità medicinali, al fine di garantire la loro sicurezza d'uso. In particolare, sono stati presi in considerazione principi attivi costituiti da un solo enantiomero per i quali la purezza enantiomerica è un requisito indispensabile ai fini della definizione della loro qualità.

I risultati ottenuti nello studio per valutare l'adeguatezza di un sistema HPLC non enantioselettivo utilizzando un rivelatore a dicroismo circolare (CD), per la determinazione della purezza enantiomerica della dexchlorfeniramina, sono tali da consentire la determinazione dell'eccesso enantiomerico entro i limiti definiti dalla relativa monografia della Farmacopea Europea. Il metodo può pertanto essere utilizzato ai fini del controllo dell'eccesso enantiomerico della dexchlorfeniramina.

È stato anche intrapreso lo studio per valutare l'applicabilità dello stesso sistema HPLC-CD ad altri principi attivi chirali per i quali è previsto il controllo della purezza enantiomerica.

## **Separazione di composti chirali di interesse farmaceutico mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione**

*Responsabile scientifico*

Francesco La Torre (Laboratorio di Chimica del Farmaco)

*Sintesi dell'attività svolta*

Scopo del progetto è lo sviluppo di nuove metodiche cromatografiche convalidate per la separazione dei singoli enantiomeri di prodotti farmaceutici, al fine di poter determinare la purezza stereochimica di prodotti in commercio o prossimi alla immissione sul mercato.

Sono state scelte importanti classi di farmaci quali antimicotici a struttura triazolica, inibitori acetilcolinesterasi (ACE) e antiparkinsoniani; in molti casi, l'attività farmacologica è dovuta principalmente ad uno dei singoli enantiomeri. La tecnica per la separazione dei singoli enantiomeri è stata messa a punto per antimicotici a struttura triazolica di nuova sintesi e per un inibitore della acetilcolinesterasi. Per un composto  $\beta$ -lattamico e sue impurezze di sintesi, ad attività ipocolesterolemica, è stata ottimizzata la separazione chirale in funzione della rigidità molecolare. Per due ACE inibitori sono state separate potenziali impurezze chirali e non, mediante cromatografia in fase inversa.

**Studio a livello cellulare e subcellulare dell'effetto di farmaci sul sistema immunitario***Responsabile scientifico*

Marina Viora (Laboratorio di Immunologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Durante l'anno 2000 è stato dimostrato che la N-acetilcisteina (NAC), un antiossidante utilizzato nella terapia contro l'HIV up-regola *in vitro* le funzioni immuni di PBMC umani normali e abroga gli effetti down-modulanti indotti dalle lipoproteine a bassa densità ossidate (LDL-ox), un agente pro-ossidante fisiologico.

È stato inoltre dimostrato che le LDL-ox inducono alterazioni morfologiche e funzionali sulla linea cellulare A431, abrogate da un antiossidante quale l' $\alpha$ -tocoferolo, e che sia le LDL-ox che la NAC inibiscono l'induzione della produzione di anticorpi specifici verso antigeni della *C. albicans*.

In particolare, è stato osservato che in un sistema di stimolazione T-dipendente, sia antigene specifico che policlonale, la NAC induce una down-regolazione significativa e dose-dipendente dell'espressione delle molecole di costimolo CD40 e CD27, fortemente coinvolte nell'interazione tra cellula B e cellula T. D'altra parte, la NAC non mostra alcun effetto sull'induzione di una risposta policlonale in un sistema T-indipendente.

**Studio dei fattori locali che condizionano la reattività cardiovascolare e polmonare: aspetti fisio-farmacologici***Responsabile scientifico*

Paola del Basso Orsini (Laboratorio di Farmacologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Gli studi riguardanti l'ipertensione polmonare hanno evidenziato che alcuni fattori coinvolti nella sua insorgenza, quali il fattore attivante piastrinico (PAF) e l'endotelina, agiscono attraverso la liberazione di secondi mediatori, derivanti dal metabolismo dell'acido arachidonico anche attraverso la cicloossigenasi-2 (cuore-polmoni di cavia).

Gli studi sui possibili meccanismi alla base della genesi degli spasmi vascolari hanno evidenziato il ruolo del calcio intracellulare, il cui aumento in seguito a deplezione del pool del reticolo sarcoplasmatico induce la liberazione di fattori contrattili dall'endotelio, che potenziano il tono vascolare simpatico.

Gli studi sullo scompenso cardiaco hanno consentito di interpretare l'effetto favorevole del propranololo come dovuto ad un incremento della quantità di energia disponibile nel miocardocita per ogni ciclo cardiaco. Infatti, a dosi capaci di inibire i canali rapidi del Na<sup>+</sup> (quindi riducendo la quantità di ATP consumata dalla pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> per espellere lo ione Na<sup>+</sup>), il farmaco previene l'ipertrofia cardiaca senza determinare una maggiore mortalità degli animali o la comparsa precoce dei segni dello scompenso cardiaco.

**AREA 2 - TECNOLOGIE BIOMEDICHE****Biocompatibilità di materiali per uso clinico: studi morfo-funzionali *in vitro* e *in vivo****Responsabile scientifico*

Salvatore Caiazza (Laboratorio di Ultrastrutture)

*Sintesi dell'attività svolta*

Nel settore odontoiatrico è proseguita la valutazione del ruolo delle membrane di collagene nella guarigione di difetti ossei sperimentalmente indotti creando cavità nel femore di coniglio, ricoprendole con tali membrane e verificando la neoformazione di osso. I risultati consentono la realizzazione di impianti dentali umani in cresta ossea compromessa. È stato studiato il comportamento meccanico a fatica di un impianto sperimentale ai fini del suo impiego con applicazione di un carico precoce. Sono state inoltre valutate alcune ricostruzioni post-endodontiche e l'efficacia ritentiva di quattro diversi tipi di perni endocanalari non metallici di ultima generazione evidenziando il positivo ruolo assunto dalla sabbiatura della loro superficie.

Nel settore oftalmologico sono proseguite le ricerche sui sostituti artificiali del corpo vitreo (SAV), tra i quali l'idrossipropilmetilcellulosa (IPMC), usando colture primarie di retina di ratto nelle quali sono presenti principalmente cellule neuronali, gliali e dell'epitelio pigmentato, caratterizzate con la microscopia elettronica a trasmissione, a scansione e con tecniche di immunocitochimica (TUNEL), che evidenziano cellule in apoptosi colorandone frammenti di DNA tipici; sono state osservate modificazioni di strutture altamente differenziate quali i neuriti e le sinapsi. Infine, è proseguito lo studio del *pigment epithelium-derived factor* (PEDF), fattore prodotto dall'epitelio pigmentato che, nel modello *in vitro* studiato, ha mostrato un effetto differenziativo sulle cellule epiteliali.

Nel settore biofisico sono proseguiti gli studi sulla interazione della linea cellulare eritroleucemica umana K562 con il poliammino acido a carica netta positiva (polilisina) e vari agenti inibenti tale interazione, evidenziando che il legame cellula-polilisina potrebbe essere mediato dalla fibronectina. Sono stati inoltre condotti studi sull'effetto differenziativo di superfici silaniche sulla linea cellulare di osteosarcoma umano Saos-2, evidenziando che alcune di queste sono capaci di indurre il differenziamento mentre altre sono potenzialmente tossiche.

## **Biomateriali e ingegneria dei tessuti**

### *Responsabile scientifico*

Pietro Chistolini (Laboratorio di Ingegneria Biomedica)

### *Sintesi dell'attività svolta*

Il progetto ha affrontato le seguenti due tematiche: biomateriali in odontoiatria e ingegneria dei tessuti.

Durante il 2000 sono proseguiti gli studi sui materiali, sui perni endocanalari e sugli impianti dentali. Sono state valutate alcune resine composite utilizzate come materiale ammortizzante nelle ricostruzioni conservative e altre sostitutive dell'amalgama. Sono state eseguite prove per la valutazione della ritenzione endocanalare di perni non metallici con trattamenti superficiali.

È stato messo a punto il protocollo per prove a fatica su impianti dentali, investigando le prestazioni sia di impianti sperimentali sia di ultima generazione. Sono stati conclusi gli studi finalizzati al miglioramento delle prestazioni biomeccaniche dell'osteointegrazione tramite rigenerazione ossea mediante membrane di collagene.

È stato avviato uno studio sistematico volto alla caratterizzazione di tessuti biologici attraverso prove meccaniche di indentazione sia su scala macroscopica che microscopica consistenti nel testare il tessuto sotto indagine con una sonda controllata in forza e posizione. In precedenza, erano state condotte prove su tessuto osseo usando punte dell'ordine del millimetro di diametro. Queste hanno mostrato la validità della tecnica e la possibilità di sistematizzarla ed estenderla a maggiori risoluzioni.

## **Riabilitazione del sistema locomotore**

### *Responsabile scientifico*

Velio Macellari (Laboratorio di Ingegneria Biomedica)

### *Sintesi dell'attività svolta*

È proseguito nel 2000 lo studio approfondito delle condizioni di carico del piede di pazienti diabetici con neuropatia periferica, durante la deambulazione. Tale studio è stato reso possibile dallo strumento pedana piezodinamometrica, progettato e costruito in Istituto. Peculiarità di tale strumento è la misura delle componenti tangenziali delle forze di reazione del suolo agenti (su aree della superficie di appoggio al suolo del piede selezionabili) maggiori od uguali a 0,25 cm<sup>2</sup>.

L'integrazione di tale strumento con un sistema optoelettronico per la misura della cinematica dei segmenti scheletrici del piede e della gamba ha portato alla realizzazione di un sistema di misura particolarmente efficace per lo studio della cinematica delle articolazioni del piede e delle loro leggi di carico durante la deambulazione.

Nel campo dell'analisi del movimento è proseguito lo studio delle caratteristiche dinamiche dei sensori piezoresistivi, utilizzati nell'acquisizione di mappe di pressione generate nel contatto piede-suolo. Mediante un sistema elettromagnetico di prova appositamente realizzato sono stati acquisiti dati sulla risposta armonica di tali sensori in un ampio spettro di frequenze.

## **Studi dei meccanismi di controllo del rigetto nei trapianti allo- e xenogenici**

*Responsabile scientifico*

Francesca Quintieri (Laboratorio di Immunologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

Durante il 2000 sono stati eseguiti esperimenti per chiarire l'effetto del farmaco calcioantagonista diltiazem sulle cellule dendritiche umane.

È stato messo in evidenza come il farmaco abbia la capacità di attenuare la differenziazione delle cellule dendritiche a partire dai monociti del sangue periferico e di ridurre il processo di maturazione in presenza di stimoli normalmente usati *in vitro*. Il comportamento del diltiazem è in linea con quello di altri farmaci immunosoppressori comunemente utilizzati nella prevenzione del rigetto nel campo dei trapianti d'organo.

Nell'ambito dell'attività connessa al Registro trapianti di organi è stata effettuata un'analisi delle caratteristiche dei donatori e dei riceventi negli anni 1995-1999. In particolare, sono state evidenziate variazioni nell'ambito della popolazione dei donatori che, durante gli ultimi cinque anni, ha subito graduali ma costanti cambiamenti in relazione all'età e alla causa di morte cerebrale.

## **Tecnologie per il sistema cardiovascolare**

*Responsabile scientifico*

Vincenzo Barbaro (Laboratorio di Ingegneria Biomedica)

*Sintesi dell'attività svolta*

Il progetto si è articolato nelle seguenti linee di ricerca:

- Studio delle interferenze elettromagnetiche sui dispositivi medici;
- Trattamento delle tachiaritmie;
- Sviluppo di tecniche per la valutazione funzionale di valvole cardiache di protesi vascolari e stent;
- Analisi dei rischi connessi con l'uso di stent intravascolari;
- Sviluppo di nuove tecnologie e protocolli nel settore della biomeccanica cardiovascolare.

In particolare:

- è stato valutato il rischio di interferenza elettro-magnetica (EMI) tra i dispositivi portatili di radiocomunicazione (telefonini e radio UHF dei sorveglianti) e le apparecchiature mediche, presenti nei centri ospedalieri, iniziando dai ventilatori polmonari;
- sono state studiate terapie elettriche per la fibrillazione atriale; in particolare è stato seguito un approccio di tipo elettrofisiologico per l'identificazione delle zone da ablare;
- sono stati svolti nuovi esperimenti di tipo anemometrico tramite laser continuo e pulsato per la valutazione dei flussi ematici in un simulatore di circolo sistemico per caratterizzare valvole cardiache protesiche, protesi vascolari e stent. Per quanto riguarda gli stent è stato realizzato un modello per l'analisi del rischio nell'uso di dispositivi innovativi;
- è stato progettato un esperimento *in vitro* su valvole cardiache per valutare il potenziale emolitico.

## **AREA 3 - DISTURBI MENTALI E NEUROLOGICI**

### **Le encefalopatie spongiformi trasmissibili dell'uomo e degli animali causate da agenti infettivi non convenzionali**

*Responsabile scientifico*

Maurizio Pocchiari (Laboratorio di Virologia)

*Sintesi dell'attività svolta*

- Sorveglianza  
Nel periodo dal 1° gennaio 2000 al 31 dicembre 2000 sono pervenute al Registro Nazionale della Malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ) e sindromi correlate, 177 segnalazioni di casi con sospetto clinico di CJD dai reparti di Neurologia, Malattie Infettive e Geriatria di tutto il territorio nazionale. L'attività di sorveglianza si è articolata sui seguenti punti:
  - per tutte le 177 segnalazioni sono stati contattati telefonicamente i medici che hanno segnalato i casi; periodicamente, i consulenti clinici del Registro hanno aggiornato questi casi in base al decorso clinico, le indagini strumentali, biochimiche, genetiche e neuropatologiche eventualmente effettuate;
  - 34 pazienti sono stati visitati dai consulenti clinici del Registro per un corretto inquadramento clinico del caso e, contemporaneamente, per la somministrazione di un questionario epidemiologico ai parenti di questi pazienti per rilevare eventuali fattori di rischio;
  - sono stati elaborati i dati di mortalità relativi all'anno 2000.
- Caratterizzazione  
Per la caratterizzazione dei ceppi di agente infettivo della Malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ), è stata effettuata la purificazione della PrP patologica e l'analisi del glicotipo di questa proteina da materiale cerebrale congelato di soggetti con MCJ sporadica e familiare. Per la stabilizzazione dei ceppi di MCJ circolanti in Italia, è stato effettuato il secondo passaggio nei topi C3H e C57 Bl.
- Meccanismi patogenetici  
È stata valutata l'influenza di possibili variazioni polimorfiche in un nuovo gene doppel nelle manifestazioni fenotipiche della MCJ sporadica e familiare.

**Fattori psicobiologici di rischio o di protezione per disturbi del comportamento e vulnerabilità all'offerta di sostanze "ricreazionali" in età evolutiva***Responsabile scientifico*

Giovanni Laviola (Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema)

*Sintesi dell'attività svolta*

Una caratterizzazione dei comportamenti ludico/affiliativi e di risposta a stimoli nuovi in periodi ontogenetici di elevata plasticità delle strutture nervose ed endocrine, ha evidenziato:

- modifiche in funzione del sesso, dell'età e della familiarità fra i soggetti;
- alterazioni conseguenti una storia di svezzamento precoce o tardivo. Lo sviluppo di un modello di transizione adolescenziale ha evidenziato profili di elevata *novelty seeking* in roditori adolescenti e ha dissociato la sensibilizzazione all'induzione di sindromi di stereotipie dagli effetti ipercinetici conseguenti al trattamento ripetuto e intermittente con psicostimolanti. I dati suggeriscono una sensibilità differenziale età-dipendente agli effetti neuroendocrini e alle proprietà edoniche delle sostanze d'abuso. Nell'ambito di un processo di sviluppo di modelli animali di riferimento per patologie neuropsichiatriche dell'età evolutiva (sindromi autistiche e/o di ipercinesisi/deficit attentivo), è proseguita l'analisi dei fattori di rischio, legati al sesso e a variabili socio-ambientali, coinvolti negli effetti paradosso degli agenti psicoattivi di corrente uso clinico.

**Fisiopatologia delle cellule gliali cerebrali***Responsabile scientifico*

Giulio Levi (Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema)

*Sintesi dell'attività svolta*

Sintesi e attività di prostanoidi (PR) e isoprostani (IS). Sono continuati gli studi sulla produzione e sull'attività di PGJ<sub>2</sub>, un PR recentemente identificato quale ligando specifico del recettore nucleare PPAR- $\gamma$ , espresso in microglia e la cui attivazione inibisce funzioni potenzialmente dannose della microglia

attivata. Allo stesso modo, sono proseguite le ricerche per avvalorare il ruolo degli IS come indici di stress ossidativo e possibili mediatori del danno.

Ruolo di COX-2 e PR in fenomeni di neurotossicità e neuroprotezione. È stata dimostrata l'aumentata espressione di COX-2 e sintesi di PGE<sub>2</sub> in un modello di malattia da prione, suggerendo che la risposta infiammatoria possa svolgere un ruolo nella patogenesi di malattie neurodegenerative.

Regolazione dei livelli di AMP ciclico. Sono proseguiti gli studi sulla regolazione di AMP ciclico da parte della protein chinasi C, dimostrando che l'attivazione di tale enzima riduce la sintesi di AMP ciclico indotto da PGE<sub>2</sub> agendo sul recettore di tipo EP<sub>2</sub>.

### **Modelli sperimentali di disturbi dell'apprendimento e di sindromi di ritardo mentale durante lo sviluppo**

#### *Responsabile scientifico*

Gemma Calamandrei (Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema)

#### *Sintesi dell'attività svolta*

La caratterizzazione degli effetti neurocomportamentali delle lesioni colinergiche neonatali nel ratto, un modello sperimentale di disturbo del neurosviluppo, ha evidenziato effetti a lungo termine nelle prestazioni di discriminazione spaziale, alterazioni nello sviluppo della citoarchitettura corticale e nell'espressione di alcune proteine sinaptiche. In animali lesionati sono stati inoltre valutati i potenziali effetti neuroprotettivi della somministrazione precoce della neurotrofina Nerve Growth Factor (NGF).

L'attività di ricerca primatologica sui processi di apprendimento sociale nella scimmia uistiti ha riguardato il ruolo delle vocalizzazioni nella comunicazione tra membri di gruppi familiari nel contesto del comportamento alimentare. È proseguito lo studio della correlazione tra livelli di cortisolo plasmatico e salivare.

L'attività di ricerca biostatistica si è articolata nello sviluppo di metodi statistici per l'analisi delle sequenze comportamentali, nell'individuazione di criteri diagnostici nelle malattie neurodegenerative e nell'elaborazione statistica dei dati del Registro Nazionale della Malattia di Creutzfeldt-Jakob.

### **Ruolo fisiopatologico del Nerve Growth Factor (NGF) in fenomeni di stress/coping e nella regolazione di sensazioni nocicettive nell'adulto**

#### *Responsabile scientifico*

Enrico Alleva (Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema)

#### *Sintesi dell'attività svolta*

Sono proseguite le ricerche di genetica comportamentale utilizzando topi transgenici che esprimono TNF- $\alpha$  relativamente alla distribuzione di Nerve Growth Factor (NGF) e NPY (NeuroPeptide Y), correlati con elementi comportamentali riconducibili a fenomeni di apprendimento e di memoria. Altri esperimenti hanno riguardato la somministrazione intracerebroventricolare di BDNF (Brain Derived Neurotrophie Factor) in soggetti adulti, che ha causato cambiamenti nei livelli di risposta nocicettiva e in comportamenti esplorativi; il trattamento con BDNF non ha però influenzato le prestazioni di apprendimento e memoria nel test di labirinto acquatico di Morris. Nel corso del 2000 sono stati inoltre condotti alcuni studi riconducibili alla valutazione dei livelli di stress nel caso di soggetti mantenuti in condizioni di cattività. Infine, è stata prodotta una rassegna a carattere generale sulle prospettive metodologiche in studi ontogenetici ed è stato verificato l'effetto dello stress precoce (separazione materna) sui livelli di espressione di NGF nel periodo neonatale.

### **Ruolo delle proteine del citoscheletro nell'organizzazione di compartimenti neuronali specializzati e loro coinvolgimento in patologie neuromuscolari**

#### *Responsabile scientifico*

Tamara Petrucci (Laboratorio di Biologia Cellulare)

*Sintesi dell'attività svolta*

L'attività si è focalizzata sullo studio del complesso distrofina-distroglicano nel sistema nervoso mediante studi *in vitro* e *in vivo*. Attraverso studi *in vitro* e cellule trasfettate è stata caratterizzata l'interazione tra distroglicano e Grb2 e tra distroglicano e caveolina. In una linea cellulare P19, che deriva da un carcinoma embrionale di ratto, è stata studiata l'espressione di alcuni componenti del complesso distrofina-distroglicano durante il differenziamento neuronale indotto da acido retinoico. Inoltre, sono state evidenziate anomalie del distroglicano in alcuni tipi di carcinoma.

Sono proseguiti gli studi sul ruolo del complesso distrofina-distroglicano nella stabilizzazione dei recettori neuronali dell'acetilcolina utilizzando il ganglio cervicale superiore di topi normali o geneticamente *mdx* distrofici. In uno studio del ruolo funzionale di proteine citoscheletriche sono stati utilizzati anticorpi specifici per isoforme  $\alpha$  e  $\beta$  della spettina per la loro localizzazione durante l'oogenesi in *Xenopus*.

**Studio delle interazioni tra sistema nervoso centrale e sistema immunitario rilevanti per la patogenesi delle malattie infiammatorie e demielinizzanti***Responsabile scientifico*

Francesca Aloisi (Laboratorio di Fisiopatologia di Organo e di Sistema)

*Sintesi dell'attività svolta*

Nel corso del 2000 sono proseguiti gli studi su topi affetti da Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (EAE) – il modello animale più utilizzato per lo studio della patogenesi della sclerosi multipla – con l'obiettivo di comprendere meglio il ruolo svolto dalle cellule dendritiche nel mantenimento della risposta autoimmune diretta contro antigeni della mielina. È stato completato uno studio nel quale si è dimostrato, mediante tecniche di immunostochimica, che in topi SJL immunizzati con il peptide 139-151 della proteina proteolipidica le cellule dendritiche:

- sono reclutate molto precocemente nel midollo spinale;
- sono presenti negli infiltrati infiammatori in tutte le fasi della malattia (in particolar modo, acuta e recidivante);
- nel milieu intracerebrale ricco di citochine pro-infiammatorie acquisiscono un fenotipo maturo indicativo di una elevata capacità immunostimolatoria.

È stato inoltre dimostrato che in corso di EAE si ha un aumento sia dell'espressione di trascritti specifici che di immunoreattività (associata prevalentemente a cellule infiltranti e ad astrociti intraparenchimali) per la  $\alpha$ -chemioquina *macrophage inflammatory protein-3 alpha* (MIP-3b), implicata nel reclutamento di cellule dendritiche immature.

Nel corso del 2000 sono stati messi a punto altri modelli di EAE in topi di ceppo Biozzi (che sviluppano una malattia con andamento clinico tipicamente cronico e cronico-recidivante), metodiche per la purificazione e caratterizzazione di cellule dendritiche dal midollo osseo murino e saggi di migrazione per lo studio della risposta di cellule dendritiche a chemiochine prodotte da cellule cerebrali attivate. L'impegno profuso nell'allestimento di nuovi modelli sperimentali consentirà di estendere gli studi sulle basi molecolari del reclutamento intracerebrale di cellule dendritiche ed eventualmente di iniziare a programmare strategie sperimentali per bloccare l'insorgenza e/o la cronicizzazione dell'EAE.

**Studio delle proteine coinvolte nell'ontogenesi e nella neurodegenerazione di tipo Alzheimer***Responsabile scientifico*

Annamaria Confaloni (Laboratorio di Metabolismo e Biochimica Patologica)

*Sintesi dell'attività svolta*

Lo studio è stato indirizzato alla comprensione del ruolo funzionale della L1, una proteina chiave nei processi di interazione cellula-cellula e nella migrazione neuronale. Anche questa proteina, associata allo sviluppo del sistema nervoso, è coinvolta successivamente, nell'adulto, in patologie neurodegenerative.