

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

I Convegno Nazionale

**Sostanze naturali:
dalla ricerca di base all'applicazione clinica**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 23-25 marzo 2009

RIASSUNTI

A cura di
Andrea Geraci (a), Francesca Mondello (b) e Annarita Stringaro (c)

*(a) Dipartimento del Farmaco
(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate
(c) Dipartimento di Tecnologie e Salute*

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
09/C1

Istituto Superiore di Sanità

I Convegno Nazionale. Sostanze naturali: dalla ricerca di base all'applicazione clinica. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 23-25 marzo 2009. Riassunti.

A cura di Andrea Geraci, Francesca Mondello e Annarita Stringaro
2009, xi, 95 p. ISTISAN Congressi 09/C1

Nella continua ricerca scientifica di nuovi farmaci sicuri ed efficaci, recentemente vi è stata una riscoperta delle sostanze naturali come potenziale serbatoio di soluzioni terapeutiche innovative per la salute umana, con la prospettiva di integrare e a volte sostituire farmaci convenzionali. Questo Convegno rappresenta il primo incontro nazionale, in seguito alla costituzione del gruppo di studio intramurale "Terapie Innovative e Sostanze Naturali (TISNa)". L'obiettivo è quello di dar vigore all'attuale crescita scientifico-culturale e multidisciplinare nel campo della ricerca sulle sostanze naturali, promuovere la nascita di future collaborazioni anche con le altre istituzioni scientifiche del Paese, e soprattutto incentivare l'adozione di un metodo di ricerca più rigoroso per la valutazione degli effetti di queste sostanze. Il Convegno si articola in sei sessioni con le seguenti aree tematiche riguardanti le sostanze naturali: caratterizzazione chimica, attività biologiche (antimicrobica, antitumorale, immunomodulante e antinfiammatoria), applicazioni cliniche, profilo di sicurezza e aspetti regolatori.

Parole chiave: Prodotti naturali, Effetti farmacologici, Sostanze antinfiammatorie, Sostanze antitumorali, Sostanze antinfettive

Istituto Superiore di Sanità

I National Conference. Natural products: from basic research to clinical applications. Istituto Superiore di Sanità. Rome, March 23-25, 2009. Abstract book.

Edited by Andrea Geraci, Francesca Mondello and Annarita Stringaro
2009, xi, 95 p. ISTISAN Congressi 09/C1 (in Italian)

In the research of new, safe and efficacious drugs for human health, natural products have been recently rediscovered as a potential source of innovative therapeutics with the perspective of integrating and sometimes also replacing conventional drugs. This is the first national Conference sponsored by the Italian National Institute of Health (Istituto Superiore di Sanità; ISS) following the formation of the ISS intramural study group "Innovative Therapies and Natural Products (TISNa)". The purpose of the congress is strengthening the present scientific-cultural and multidisciplinary growth in the field of natural products' research, as well as promoting future aggregation and scientific co-operation with other countrywide scientific Institutions. Most importantly, the TISNa wishes to propel the use of stringent scientific methodologies in the assessment of old and new natural products. The conference is planned to convey six sessions dealing with chemical characterization, biological activity (antimicrobial, anti-neoplastic, immune-modulating and anti-inflammatory), clinical applications, safety profile and regulatory aspects of natural products.

Key words: Natural products, Pharmacologic effects, Anti-inflammatory agents, Anti-neoplastic drugs, Anti-infective agents

Responsabili scientifici: Antonio Cassone, Velio Macellari, Stefano Vella

Per informazioni su questo documento scrivere a: andrea.geraci@iss.it, francesca.mondello@iss.it, annarita.stringaro@iss.it

Si ringraziano Veronica Bizzotti, Alessia Caratelli, Daniela Casale, Valerio Occhiodoro, Marzia Palmieri per l'elevata qualità dell'assistenza segretariale e tecnica

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo istituto: www.iss.it

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2009 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Note per la consultazione	xi
Lettura magistrale	1
Sessione I Chimica delle sostanze naturali	3
Sessione II Attività immunomodulanti e antinfiammatorie delle sostanze naturali	11
Sessione III Sostanze naturali ed attività antitumorale <i>in vitro</i>	23
Sessione IV - Parte 1 Sostanze naturali con attività antimicrobica	35
Sessione IV - Parte 2 Sostanze naturali con attività antimicrobica	41
Sessione V Sostanze naturali: le applicazioni cliniche	51
Sessione VI Profilo di sicurezza e aspetti regolatori	65
Poster	73
Indice degli autori	93

PROGRAMMA

Lunedì 23 marzo

- 9.00 Registrazione dei partecipanti e test d'ingresso
- 9.45 Indirizzo di benvenuto
Enrico Garaci
Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità
- 10.00 Introduzione ai lavori
Antonio Cassone
Direttore del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate
- 10.15 Lettura magistrale
Sostanze naturali all'alba del nuovo millennio
Marcello Nicoletti
Università degli Studi Sapienza, Roma

Sessione I

CHIMICA DELLE SOSTANZE NATURALI

Moderatori: Elena Federici, Domenico Misiti

- 11.00 *Propedeuticità chimica alle proprietà biologiche e terapeutiche degli oli essenziali*
Giuseppe Salvatore
- 11.20 *Studio dell'attività biologica di metaboliti secondari mediante tecniche spettroscopiche e spettrometriche*
Nunziatina De Tommasi
- 11.40 *Sintesi di aplidinoni, composti ad attività antitumorale*
Francesco Bonadies, Gianfranco Cocco, Marcella Guiso, Rosario Nicoletti, Maria F. Sanasi
- 12.00 *Enzimi vegetali: un valido strumento per la sintesi di molecole biologicamente attive*
Bruno Botta, Roberta Torge, Giuliano Delle Monache, Alberto Boffi
- 12.20 *Studi di sostanze naturali con attività terapeutica da piante della medicina tradizionale*
Giovanna Palazzino

12.40 *Metodi di HPLC e HPTLC per la determinazione del "fingerprinting" della Lawsonia Inermis L.*
Francesca Romana Gallo

13.00 Discussione

13.30 Intervallo

Sessione II

ATTIVITÀ IMMUNOMODULANTI E ANTINFIAMMATORIE DELLE SOSTANZE NATURALI

Moderatori: **Luciano Adorini, Fabiana Superti**

14.30 *Molteplici ruoli del sistema vitamina D nella regolazione della risposta immunitaria*
Luciano Adorini

14.50 *Importanza dell'attività antinfiammatoria della lattoferrina nell'omeostasi sistemica del ferro*
Rosalba Paesano, Francesca Berlutti, Fabrizio Pantanella, Piera Valenti

15.10 *Effetto stimolatorio dell'olio essenziale di eucalipto sull'immunità innata cellulo-mediata*
Annalucia Serafino, Federica Andreola, Manuela Zonfrillo, Luana Mercuri, Memmo Federici, Guido Rasi, Paola Sinibaldi Vallebona, Enrico Garaci, Pasquale Pierimarchi

15.30 *Il CNF1: Una proteina batterica con attività analgesica*
Flaminia Pavone, Siro Luvisetto, Sara Marinelli, Elisabetta Straface, Alessia Fabbri, Loredana Falzano, Walter Malorni, Carla Fiorentini

15.40 *Sostanze naturali ad attività analgesica ed antinfiammatoria*
Stefano Pieretti, Amalia Di Giannuario, Mariantonella Colucci, Marica Mastriota

15.50 *Effetto inibitorio del flavonoide naturale quercetina sull'attivazione IgE-mediata di basofili umani in vitro*
Salvatore Chirumbolo, Antonio Vella, Riccardo Ortolani, Anita Conforti, Paolo Bellavite

16.00 *Attività immunomodulatoria della vitamina D3 in cellule dendritiche umane*
Maria Cristina Gauzzi, Cristina Purificato, Isabella Sanseverino, Filippo Belardelli, Sandra Gessani

- 16.10 *Attività antinfiammatoria e parassitocida della curcumina*
Maria Cristina Angelici, Andrea Matteucci, Fiorella Malchiodi-Albedi

Martedì 24 marzo

Sessione III

SOSTANZE NATURALI ED ATTIVITÀ ANTITUMORALE *IN VITRO*

Moderatori: **Giuseppe Arancia, Maurizio Paci**

- 9.00 *Il resveratrolo: una molecola naturale ad ampio spettro con attività antitumorale*
Mariapia Fuggetta, Giulia Lanzilli, Maria Tricarico, Andrea Cottarelli, Serena Guida, Alessia Caracci, Giampiero Ravagnan
- 9.20 *L'aminossidasi purificata dal siero bovino induce un effetto citotossico su cellule tumorali umane, in presenza di poliamine: un nuovo approccio nella terapia antineoplastica*
Enzo Agostinelli, Maria Condello, Agnese Molinari, Giampiero Tempera, Nikenza Viceconte, Giuseppe Arancia
- 9.40 *Composti organici naturali contenenti zolfo estratti dall'aglio: studi sul meccanismo d'azione per la prevenzione e la terapia del cancro*
Sonia Melino, Renato Sabelli, Egidio Iorio, Franca Podo, Maurizio Paci
- 10.00 *Farmacoresistenza delle cellule tumorali ed impiego di sostanze naturali per il suo superamento*
Agnese Molinari, Annarita Stringaro, Annarica Calcabrini, Laura Toccaceli, Marisa Colone, Stefania Meschini, Manuela Marra, Marco Diociaiuti, Cristiano Giordani, Francesca Mondello, Giuseppe Arancia
- 10.20 *Discussione*
- 10.50 *Intervallo*
- 11.10 *L'alcaloide vegetale voacamina induce morte autofagica in cellule tumorali umane farmacoresistenti*
Stefania Meschini, Maria Condello, Pasquale Lista, Elena Federici, Gabriele Civitelli, Giuseppe Arancia
- 11.20 *Attività citotossica di metaboliti vegetali*
Laura De Martino, Vincenzo De Feo
- 11.30 *Differenziamento di cellule di melanoma con inibizione dell'attività di P-MEK in seguito a trattamento con 5,7-dimetossicumarina*
Daniela Alesiani, Rosella Cicconi, Maurizio Mattei, Antonella Canini

- 11.40 *Composizione fitochimica e attività citotossica in vitro dell'olio essenziale di Salvia acetabulosa L.*
Monica R. Loizzo, Federica Menichini, Rosa Tundis, Marco Bonesi, Giancarlo A. Statti, Filomena Conforti, Francesco Menichini

Sessione IV - Parte 1

SOSTANZE NATURALI CON ATTIVITÀ ANTIMICROBICA

Moderatori: Annalisa Pantosti, Giovanni Fadda

- 12.30 *Attività antibatterica di alcuni estratti di piante nei confronti di Helicobacter pylori (HP)*
Natale Figura, Silvia Martini, Nicola Giordano, Annalisa Santucci
- 12.50 *Attività antibatterica di oli essenziali estratti da piante della macchia mediterranea sarda*
Paola Molicotti
- 13.10 *Peptidi antimicrobici: una naturale difesa dell'organismo ed una potenziale terapia*
Sonia Melino, Raffaele Petruzzelli, Francesca Mondello, Maurizio Paci
- 13.30 Intervallo

Sessione IV - Parte 2

SOSTANZE NATURALI CON ATTIVITÀ ANTIMICROBICA

Moderatori: Annalisa Pantosti, Giovanni Fadda

- 14.30 *Attività antivirale delle sostanze naturali*
Paola Checconi, Lucia Nencioni, Anna Teresa Palamara
- 14.50 *Oli essenziali: ruolo e prospettive d'uso nelle infezioni fungine*
Francesca Mondello, Antonietta Girolamo, Flavia De Bernardis, Antonio Cassone
- 15.10 *Meccanismo di azione e proprietà terapeutiche degli oli essenziali su ceppi di Candida albicans farmacosensibili e farmacoresistenti*
Marisa Colone, Francesca Mondello, Annarica Calcabrini, Laura Toccaceli, Letizia Angiolella, Antonietta Girolamo, Nicolina Mastrangelo, Giuseppe Arancia, Antonio Cassone, Annarita Stringaro

- 15.30 *Fattore anti-LPS da Parietaria judaica*
Angela Bonura, Daniela Giacomazza, Silvia Corinti, Gabriella Di Felice, Paolo Colombo
- 15.40 *Attività antimicotica dell'olio essenziale di Mentha suaveolens*
Letizia Angiolella, Elisabetta Vavala, Rino Ragno, Annarita Stringaro, Marisa Colone, Silvia Sivric, Gianni Sartorelli, Felicia Diodata D'Auria, Anna Teresa Palamara
- 15.50 *Climacostolo: nuovo antibiotico?*
Federico Buonanno, Maria Cristina Angelici, Claudio Ortenzi
- 16.00 *Attività della lattoferrina bovina sull'infezione da virus influenzale*
Agostina Pietrantoni, Eleonora Dofrelli, Antonella Tinari, Maria Grazia Ammendolia, Simona Puzelli, Concetta Fabiani, Isabella Donatelli, Fabiana Superti
- 16.10 Discussione e chiusura giornata

Mercoledì 25 marzo

Sessione V

SOSTANZE NATURALI: LE APPLICAZIONI CLINICHE

Moderatori: **Andrea Geraci, Fabio Facchinetti**

- 9.00 *Complessità in natura e salute umana*
Andrea Geraci
- 9.30 *Studio moderno delle piante officinali: le piante adattogene*
Mauro Serafini
- 9.50 *Trials clinici per le sostanze naturali*
Roberto Raschetti
- 10.10 *Problematiche farmacognostiche negli studi clinici sui prodotti a base di piante medicinali e loro derivati*
Gabriela Mazzanti
- 10.30 *La fitoterapia tradizionale cinese tra personalizzazione ed Evidence-Based Medicine*
Emilio Minelli

- 10.50 *La farmacopea ayurvedica come fonte di sostanze naturali per la pratica clinica*
Edoardo Di Legnio
- 11.10 Intervallo
- 11.30 *Terapia complementare oncologica con Viscum Album; dalla tradizione alla ricerca scientifica*
Walter Legnani
- 11.50 *Alimentazione e fitoterapia: un approccio naturale alle dislipidemie*
Roberto Miccinilli
- 12.10 *Acido folico e Myo-Inositolo per una prevenzione totale dei difetti del tubo neurale*
Vittorio Unfer, Pietro Cavalli
- 12.30 *Microdosi*
Marcella Saponaro
- 12.40 *Acquisizioni in campo oncologico sull'azione terapeutica di funghi epigei. Analisi epidemiologica e fenomenologica*
Maurizio Bagnato
- 12.50 *Rhodiola rosea L.: promettente supporto per il tabagismo. Dati preclinici*
Marina Perfumi, Laura Mattioli
- 13.00 *Ruolo di composti naturali come il coenzima Q10 nella terapia della neurotossicità associata al Parkinson*
Ashraf Virmani, Angela Koverech, Giovanni Laviola
- 13.10 Discussione
- 13.30 Intervallo

Mercoledì 25 marzo

Sessione VI

PROFILO DI SICUREZZA E ASPETTI REGOLATORI

Moderatori: Annarita Meneguz, Velio Macellari

- 14.30 *Reazioni avverse da prodotti di origine naturale: il sistema nazionale di sorveglianza*
Francesca Menniti-Ippolito

- 14.50 *Smart Drugs: aspetti analitici farmacotossicologici e legislativi*
Roberta Pacifici, Simona Pichini
- 15.10 *La sicurezza in fitoterapia clinica*
**Fabio Firenzuoli, Luigi Gori, Cristina Cortese,
Vittorio Mascherini, Eugenia Gallo**
- 15.30 *Integratori alimentari a base di piante ed estratti vegetali*
Elisabetta Sanzini
- 15.50 *Il processo valutativo alla base della classificazione e della sicurezza dei prodotti
contenenti sostanze naturali di origine vegetale*
Maria Francesca Cometa
- 16.10 *Discussione*
- 16.30 *Premiazione miglior poster e chiusura del Convegno*
Stefano Vella

NOTE PER LA CONSULTAZIONE

Il presente volume riporta i riassunti dei contributi presentati al I Convegno Nazionale "Sostanze naturali: dalla ricerca di base all'applicazione clinica". Alcuni di questi, che riguardano argomenti di particolare interesse, sono stati scelti per la presentazione orale.

Per comodità di consultazione gli abstract delle comunicazioni orali sono presentati nell'ordine previsto dal programma all'interno di ciascuna sessione, mentre i poster sono raccolti in fondo al volume in ordine alfabetico del primo autore.

Alla fine del lavoro è comunque incluso un indice di tutti gli autori di ogni singolo contributo.

Lettura magistrale

SOSTANZE NATURALI ALL'ALBA DEL NUOVO MILLENNIO

Marcello Nicoletti

Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi Sapienza, Roma

Le piante sono le nostre sorelle maggiori. Silenziose, premurose, ovunque presenti; da esse riceviamo nutrimento, medicine, cosmetici, ma anche insegnamenti fondamentali da tradurre in arte, bellezza, fantasia, e ci spianano da sempre la strada da seguire nell'evoluzione. I loro lenti movimenti ci trasmettono l'intuizione di una diversa nascosta realtà, alla quale attingere con intelligenza ma soprattutto con interesse, una dimensione che si è rivelata fondamentale per la nostra esistenza quanto la loro spontaneità nel dare. L'essere umano si è impegnato, acuendo la propria sensibilità, a distinguere le capacità del dare dei vegetali ed imparare da essi come convivere, aiutarsi e collegarsi prima nel modello cooperativo che chiamiamo agricoltura e poi con i vantaggi della tecnologia. Un cammino vincente che lo ha portato a privilegiare, scegliere, coltivare, portare con sé specie evolutivamente apparentemente svantaggiate e ad estrarre dalla loro matrice organica la forza costitutiva. Un'alleanza che ha mutato faccia alla terra e consegnato all'uomo e alle piante a lui alleate il dominio planetario. Nella storia della sacrale alleanza tra uomo e natura, la madre di tutte le scienze e conoscenze, un posto speciale va dato alle sostanze naturali. La loro natura di mediatori ecologici ne fa dei riferimenti ideali per qualsiasi sostanza farmaceutica e l'origine del trattamento terapeutico a partire dalle esperienze della medicina tradizionale convertite in validazioni scientifiche. La loro costruzione biosintetica è una lezione magistrale formativa per qualsiasi chimico organico. La loro interazione con i nostri recettori ha aperto la porta maestra per comprendere gli aspetti multipli della nostra fisiologia. Le applicazioni tecnologiche hanno prima permesso di ampliare ed adattare le potenzialità delle sostanze naturali con una produzione continua di nuovi farmaci e di prodotti a varia utilità. Recentemente, il quadro si è ampliato e complicato con la contaminazione dei settori, prima rigidamente considerati, e con l'attenzione sempre più spostata verso gli aspetti fisiologici. Viviamo un momento molto delicato del rapporto con la risorsa vegetale. Siamo attualmente vicini all'apice delle capacità di utilizzazione rese possibili dalla tecnologia, in bilico tra lo sfruttamento intensivo e la sostenibilità, tra la manipolazione di adattamento alle esigenze sociali ed il rispetto della comune appartenenza al progetto naturale, tra l'adesione generale ad una spinta propulsiva rinnovatrice e un progresso consapevole rallentato. Una dicotomia evidente che pesa su tutte le decisioni e ci coinvolge da quelle personali quotidiane a quelle planetarie sul futuro imminente. Se commetteremo degli errori in queste decisioni, questo sarà dovuto in prima parte alla rinuncia alla sensibilità reciproca che piante e uomo hanno finora manifestato. Ora più che mai, l'ambito scientifico ha il dovere e sente la responsabilità di approfondire i temi delle sostanze naturali, quale nucleo determinante dell'utilizzo delle risorse naturali.

Sessione I
Chimica delle sostanze naturali

Moderatori
Elena Federici, Domenico Misiti

PROPEDEUTICITÀ CHIMICA ALLE PROPRIETÀ BIOLOGICHE E TERAPEUTICHE DEGLI OLI ESSENZIALI

Giuseppe Salvatore

Accademia di Storia dell'Arte Sanitaria, Roma

Tra le preparazioni vegetali, gli oli essenziali rappresentano la forma più concentrata di sostanze naturali (tra 2 ml/kg e 150 ml/kg droga essiccata): hanno proprietà chimiche e chimico-fisiche definite, organolettiche che ricordano la pianta da cui derivano e biologiche di significativo valore scientifico. Erano merce pregiata di scambio tra i popoli; giungevano in occidente, nei laboratori alchemici e spezierie del tempo, da ogni parte del mondo, lungo interminabili carovaniere e rotte marine della "via delle essenze". Prevedibilmente, vi giungevano spesso in forma tagliata o alterata nella composizione naturale a cura dei mercanti; ma sempre raccontando una storia di usi antichi, riti e tradizioni esotiche e promesse di utilità, tra le più stravaganti, che richiamavano anche le sensazioni olfattive più gradevoli di quelle offerte dal degrado igienico e ambientale delle città di allora. Oggi trovano rinnovate applicazioni, nella produzione di: alimenti, bevande, integratori, prodotti farmaceutici, cosmetici, di igiene personale e domestica, fragranze, sostanze aromatiche isolate o riprodotte per sintesi chimica. Sono applicati in aromaterapia, previo aromagramma, sebbene il termine sia utilizzato, con significato improprio, in altri contesti. La chimica li descrive nel ruolo fisiologico e nelle trasformazioni dei metaboliti secondari nelle piante vive, nella composizione delle loro parti recise, fresche o essiccate, e in quella finale degli oli utilizzati tal quali o nei prodotti finiti. Sono commercializzati diterpenati, sesquiditerpenati, rettificati, privati parzialmente o totalmente di un particolare costituente, addizionati di antiossidanti e perfino sofisticati. Le droghe e gli oli relativi destinati alla ricerca o agli usi previsti, devono essere garantiti per la qualità e sicurezza, e quindi di composizione "accertata", anche per la presenza o meno di sostanze tossiche (per esempio, allilbenzeni, propenilbenzeni, allergizzanti e immunosoppressori) e conformi a specifiche norme. Pertanto, di riferimento sono le droghe ed essenze della Farmacopea Europea e della *Committee on Herbal Medicinal Products dell'European Medicines Agency*. Al riguardo, questa presentazione mostrerà esperienze e considerazioni chimico-analitiche, basate sulla Gas-cromatografia/spettrometria di massa e sulla *Solid Phase Micro-extraction*, svolte nell'ISS. Gli studi pubblicati sull'attività biologica degli oli essenziali chimicamente definiti, tra cui quelli dei presenti al convegno, evidenziano potenziali usi come bioconservanti, disinfettanti e possibili soluzioni ai fenomeni di farmaco-resistenza. È auspicabile più attenzione all'argomento: applicazioni in terapia umana, in zootecnia, nella prevenzione di malattie trasmesse da insetti o da patogeni in ambienti nosocomiali e in ambito di igiene ambientale sono già proponibili e trasferibili, per esempio, nei paesi a più basso reddito e indice di sviluppo umano.

STUDIO DELL'ATTIVITÀ BIOLOGICA DI METABOLITI SECONDARI MEDIANTE TECNICHE SPETTROSCOPICHE E SPETTROMETRICHE

Nunziatina De Tommasi

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi, Salerno

Le sostanze naturali costituiscono un'ampia fonte di materiale per effettuare screening di interazione nei confronti di numerosi target biologici. Tali molecole sono infatti caratterizzate da una elevata varietà strutturale ed, avendo essi subito una evoluzione naturale sotto pressione selettiva, possono essere definiti a priori "bioattivi". Piccole molecole naturali che legano domini proteici strutturalmente conservati ma geneticamente diversi sono da considerarsi come punti di partenza per sviluppare librerie di composti selezionate dal punto di vista evolutivistico e validate biologicamente. Pertanto se una molecola è riportata essere un *lead compound* per un target biologico, una libreria di analoghi strutturali relativamente piccola può essere sufficiente per esplorare l'attività biologica ed ottenere relazioni struttura-attività anche in previsione di successive strategie sintetiche. La valutazione dell'attività biologica di composti bioattivi viene generalmente condotta utilizzando saggi di tipo biochimico e/o enzimatico su colture cellulari o tessuti; tali approcci, pur fornendo informazioni relative all'effetto dei trattamenti con i composti in esame, non consentono di determinare il meccanismo molecolare d'azione di tali sostanze. Tuttavia, la conoscenza dei reali bersagli (tipicamente proteine) dei composti in esame costituisce un requisito fondamentale per studiarne e migliorarne l'efficacia e la specificità. In questo senso, recenti approcci sperimentali basati sull'utilizzo di tecniche spettroscopiche e spettrometriche hanno dimostrato le loro potenzialità. Queste tecniche, oltre ad essere essenziali per la completa caratterizzazione strutturale dei composti in esame, stanno trovando ampia applicazione nello studio della attività biologica. In particolare, esperimenti di proteomica chimica, condotti mediante tecniche di cromatografia di affinità associate ad analisi di spettrometria di massa, possono essere utilizzati per individuare all'interno di un sistema cellulare le proteine in grado di interagire con piccole molecole farmacologicamente attive. Informazioni strutturali e conformazionali relative ai complessi farmaco-proteina risultanti da tali interazioni, possono essere ottenute mediante l'uso di analisi di spettroscopia di Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR), spettroscopia di risonanza magnetica nucleare a trasferimento di saturazione (STD-NMR) e di spettrometria di massa; queste analisi permettono, inoltre, di misurare in modo diretto la stechiometria del complesso, di determinare i parametri termodinamici e cinetici dell'interazione e di individuare le regioni della proteina e della piccola molecola direttamente coinvolte dal legame. Infine, lo studio dell'espressione proteica in cellule o tessuti trattati con metaboliti bioattivi, condotto mediante analisi di tipo proteomica, fornisce informazioni circa l'effetto globale della molecola sul metabolismo cellulare, consentendo di comprendere le basi molecolari del suo meccanismo d'azione e della sua eventuale tossicità.

SINTESI DI APLIDINONI, COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE

Francesco Bonadies, Gianfranco Cocco, Marcella Guiso, Rosario Nicoletti, Maria F. Sanasi
Dipartimento di Chimica, Università degli Studi Sapienza, Roma

Gli Aplidinoni sono una classe di composti isolati dall'*Aplidium conicum*, un'ascidia del Mediterraneo. Essi sono caratterizzati da un anello diosso-tiazinico condensato con un anello benzochinonico. Quest'ultimo presenta, come sostituenti, un residuo terpenico e un metossile o un gruppo amminico, primario o secondario. La marcata attività citotossica mostrata verso alcune linee tumorali è stata attribuita alla capacità di indurre apoptosi mediante produzione di ROS. La struttura degli Aplidinoni, in particolare quella dell'Aplidinone A, è stata determinata per via spettroscopica e la regiochimica della condensazione tra l'anello benzochinonico e quello tiazinico è stata assegnata mediante calcoli CNMR effettuati su strutture modello. Per dimostrare definitivamente la regiochimica della condensazione tra i due anelli e procedere a studi sulla relazione tra la struttura chimica e l'attività biologica di questi composti, è stata effettuata la sintesi dei due regioisomeri modello, A1 e A2, il primo dei quali è risultato avere la stessa struttura base dell'Aplidinone A, e quella di diversi composti in cui è stata variata la lunghezza della catena idrocarbonica. Prove di attività hanno evidenziato che l'attività è influenzata dalla lunghezza della catena e che il regioisomero non naturale presenta un'attività più elevata. Si è anche effettuata la sintesi dei due composti modello dell'Aplidinone B, B1 e B2, nonché di altri suoi derivati da sottoporre a prove di attività biologica.

ENZIMI VEGETALI: UN VALIDO STRUMENTO PER LA SINTESI DI MOLECOLE BIOLOGICAMENTE ATTIVE

Bruno Botta (a), Roberta Torge (a), Giuliano Delle Monache (a), Alberto Boffi (b)

(a) *Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università degli Studi Sapienza, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli Studi Sapienza, Roma*

I flavonoidi prenilati rappresentano una sottoclasse di prodotti naturali all'interno della vasta famiglia dei flavonoidi, la cui attività biologica ricopre praticamente tutti i campi delle scienze farmacologiche. Studi condotti sulle relazioni struttura-attività (SAR) dei flavonoidi prenilati hanno rivelato che l'attività biologica di questi composti risiede soprattutto nella presenza di catene isoprenoidi di diversa lunghezza e natura. Le loro eccezionali proprietà sembrano essere dovute alla migliore interazione con le membrane biologiche e l'aumentata affinità per le proteine-bersaglio in riferimento agli omologhi non prenilati. Le ricerche sui derivati prenilati trovano il loro culmine negli studi sulle preniltransferasi (PTasi), enzimi che catalizzano il trasferimento di unità preniliche ad una grande varietà di accettori (*e.g.* polifenoli, catene isoprenoidi, proteine) per la regolazione e il targeting di molecole biologicamente attive. La recente scoperta di una famiglia di geni in grado di codificare la sintesi di PTasi solubili da specie di *Streptomyces* e la determinazione della struttura tridimensionale di uno di questi enzimi rappresentano un impatto rivoluzionario nella chimica dei composti prenilati aromatici. Essi preparano infatti la via allo sviluppo di nuove strategie per la sintesi di composti già noti di crescente interesse farmacologico, e gettano le basi per la creazione di *chemical libraries* di nuove specie prenilate da utilizzare negli screening biologici.

STUDI DI SOSTANZE NATURALI CON ATTIVITÀ TERAPEUTICA DA PIANTE DELLA MEDICINA TRADIZIONALE

Giovanna Palazzino

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'insieme delle conoscenze, pratiche, metodi e credenze che sono usate presso una data popolazione per curare o prevenire squilibri fisici, mentali e/o sociali che possono ledere il benessere di un singolo individuo costituisce la Medicina Tradizionale (MT). Ogni MT è basata sulle esperienze e le attente osservazioni tramandate di generazione in generazione dagli *healers* locali. Numerosi sono i farmaci che sono entrati nelle farmacopee internazionali dopo lo studio dei rimedi tradizionali a base vegetale. Così come sono numerose le sostanze isolate da queste stesse piante che hanno rappresentato validi modelli molecolari per lo sviluppo di nuovi farmaci o sono diventate molecole di partenza per la semisintesi di principi attivi farmaceutici o metaboliti secondari vegetali che hanno contribuito al chiarimento di alcuni processi biochimici cellulari. Un'ulteriore spinta allo studio delle piante usate nella Medicina Tradizionale in particolare dei paesi in via di sviluppo è stata data dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per una validazione scientifica del loro uso terapeutico tradizionale per giustificarne un'utilizzazione nella cura primaria immediata nei paesi di origine. Inoltre nuove linee guida sulla standardizzazione, preparazione e controllo di qualità sono state emanate a livello europeo per la registrazione dei "medicinali tradizionali vegetali" riconosciuti in quei preparati vegetali dimostrati sicuri ed efficaci dall'uso consolidato per 30 anni nella medicina popolare di un dato paese. Anche il National Cancer Institute americano ha messo in atto un programma di valutazione biologica di diverse materie prime vegetali della foresta tropicale su vari tipi di linee cellulari tumorali mettendo in evidenza come nuove sostanze derivate da piante, tipo alcaloidi, isoflavonoidi, lignani e prodotti macrociclici, siano di interesse contro il cancro e l'HIV. In questo contesto si inserisce la ricerca di sostanze naturali da piante utilizzate nella MT popolare di alcuni paesi del Sud America e dell'Africa Sudsahariana sia a scopi terapeutici come antimalarici e antitumorali sia a scopi di promozione del benessere dell'individuo.

METODI DI HPLC E HPTLC PER LA DETERMINAZIONE DEL "FINGERPRINTING" DELLA *LAWSONIA INERMIS* L.

Francesca Romana Gallo

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La *Lawsonia inermis*, comunemente conosciuta come Hennè, è una pianta originaria delle regioni dell'Africa centro-orientale, coltivata in diversi paesi (Egitto, Iran, Tunisia, India, Cina e in tempi più recenti anche in Florida) e da millenni usata per tingere capelli, unghie e per fare tatuaggi in varie parti del corpo. Tale pianta è inoltre utilizzata nella medicina tradizionale per diverse patologie (infiammazioni, micosi ed eruzioni della pelle, emicrania, calcolosi e malattie dell'apparato digerente). Le foglie essiccate e polverizzate, sono emulsionate con acqua calda per ottenere una pasta che, applicata sui capelli per 30-40 minuti, cambia il loro colore. L'azione colorante è dovuta al lawsone (2-idrossi-1,4-naftochinone), uno dei principali costituenti della *Lawsonia inermis*, il cui contenuto viene accuratamente controllato data la sua potenziale tossicità. Recentemente la tecnica del "*fingerprinting*" è diventata un valido metodo d'identificazione per le piante dove non è possibile effettuare l'isolamento e il riconoscimento dei vari principi attivi, vuoi per la composizione molto complessa delle stesse, vuoi per la difficoltà di ottenere delle buone separazioni cromatografiche con tempi e rese accettabili. L'OMS, infatti, con *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines* per definire la qualità della pianta (WHO/EDM/TRM/2000.1), ove altre tecniche da sole non sono sufficienti, prende in considerazione la possibilità di identificare una sostanza caratteristica o una miscela di sostanze tramite il "*fingerprinting*". Sulla base di tali presupposti, le nostre ricerche sono state finalizzate all'ottenimento del "*fingerprinting*" tramite due differenti tecniche cromatografiche, entrambe efficienti e rapide, l'HPLC e l'HPTLC densitometrica. In questo lavoro sono mostrate e confrontate le due tecniche, applicate all'analisi di differenti lotti di *Lawsonia inermis* provenienti da vari paesi del Medio Oriente.

Sessione II

**Attività immunomodulanti
e antinfiammatorie delle sostanze naturali**

Moderatori

Luciano Adorini, Fabiana Superti

MOLTEPLICI RUOLI DEL SISTEMA VITAMINA D NELLA REGOLAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

Luciano Adorini
Università degli Studi, Padova

La vitamina D è un pro-ormone liposolubile costituito da due forme principali: il colecalciferolo (vitamina D₃), derivante dal colesterolo e sintetizzato negli organismi animali, e l'ergocalciferolo (vitamina D₂), di provenienza vegetale. Nella cute i raggi ultravioletti favoriscono la conversione del 7-deidrocolesterolo in colecalciferolo, che viene idrossilato nel fegato in 25-idrossicolecalciferolo [25(OH)D] ed in seguito nel rene, dando origine a 1,25-diidrossicolecalciferolo [1,25(OH)₂D₃], la forma biologicamente attiva dell'ormone. 1,25(OH)₂D₃ regola molteplici geni, oltre 1000 - similmente ad un ormone-attivando o inattivando il DNA nucleare in vari tipi cellulari. 1,25(OH)₂D₃ si lega ad un recettore nucleare specifico (*vitamin D receptor*, VDR) che eterodimerizza con il recettore per retinoidi RXR. Questo complesso, dopo aver reclutato una serie di coattivatori e corepressori si lega ad una regione del DNA responsiva alla vitamina D (VDRE) adiacente al gene da attivare innescando il processo di trascrizione del DNA. 1,25(OH)₂D₃ controlla il metabolismo del calcio, indispensabile per sviluppo, formazione, accrescimento e stabilità dello scheletro e delle ossa. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che il sistema vitamina D potenzia la risposta immunitaria di tipo innato, ad esempio stimolando la produzione di catelicidina, un peptide con azione antimicrobica, e modula attraverso diversi meccanismi la risposta immune acquisita. 1,25(OH)₂D₃, prodotto da macrofagi, cellule dendritiche, linfociti T e B, contribuisce fisiologicamente, attraverso il VDR espresso in questi tipi cellulari, alla regolazione della risposta immunitaria. Molteplici evidenze indicano una alta prevalenza di insufficienza di vitamina D, definita da un livello sierico di 25(OH)D inferiore a 20 ng/ml, e questa insufficienza è stata correlata ad una aumentata incidenza di malattie autoimmuni, oltre che a patologie dell'osso e ad una maggiore incidenza di vari tipi di tumori. Le cellule dendritiche sembrano essere il bersaglio principale di 1,25(OH)₂D₃ a livello delle cellule del sistema immunitario. 1,25(OH)₂D₃ induce in cellule dendritiche proprietà tolerogeniche che favoriscono l'induzione di cellule T regolatorie, capaci di sopprimere la risposta immunitaria. Inoltre, le cellule T possono essere inibite direttamente da 1,25(OH)₂D₃. La modulazione della risposta immunitaria mediata da 1,25(OH)₂D₃ riduce il rischio di varie malattie autoimmuni, quali artrite reumatoide, diabete di tipo 1 e sclerosi multipla, e la efficacia di analoghi della vitamina D in queste patologie è documentata dalla inibizione della psoriasi, una malattia autoimmune della pelle in cui questi agenti sono il farmaco per uso topico più utilizzato.

IMPORTANZA DELL'ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA DELLA LATTOFERRINA NELL'OMEOSTASI SISTEMICA DEL FERRO

Rosalba Paesano (a), Francesca Berlutti (b), Fabrizio Pantanella (b), Piera Valenti (b)

(a) *Casa di Cura Fabia Mater, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università degli Studi Sapienza, Roma*

Il ferro, elemento essenziale per gli esseri viventi a causa della sua caratteristica di acquisire e cedere elettroni, può, se presente in eccesso, essere tossico a causa della sua capacità di promuovere la formazione di specie reattive dell'ossigeno e la moltiplicazione microbica. Questa doppia natura impone una sottile regolazione dell'omeostasi sistemica del ferro che, nell'uomo, è regolata dall'assorbimento intestinale e dal trasporto del ferro dalle cellule al circolo. In condizioni patologiche, l'inibizione del trasporto del ferro dalle cellule al circolo porta ad anemia da carenza di ferro associata ad un dannoso accumulo di ferro nei tessuti e nelle secrezioni, che favorisce le infezioni e le infiammazioni. La regolazione ed il mantenimento dell'omeostasi sistemica del ferro sono fattori chiave per la salute dell'uomo. Nei tessuti e nelle secrezioni, in situazioni fisiologiche, la concentrazione di ferro disponibile non deve superare 10^{-18} M ed è garantita dalla lattoferrina (Lf), una glicoproteina in grado di chelare due ioni ferrici per molecola. Lf è sintetizzata dalle ghiandole esocrine e dai neutrofili nei siti di infezione e d'infiammazione e differentemente dalla transferrina, tipica proteina di trasporto del ferro che rilascia questo ione già a pH 6.5, Lf è in grado di tenere legato lo ione ferrico fino a pH inferiori a 4, tipici dei siti d'infezione ed infiammazione. Alla Lf fu primariamente attribuita un'azione antimicrobica dipendente dalla sua capacità di legare, con alta affinità, il ferro necessario alla replicazione dei microorganismi. Successivamente, le furono attribuite numerose altre funzioni indipendenti dalla capacità di chelare il ferro, come, recentemente, quella di diminuire la sintesi delle citochine pro-infiammatorie, inclusa l'interleuchina 6 (IL-6). Infatti, in alcune situazioni patologiche, la quantità di ferro è così elevata da rimanere ancora in eccesso dopo la saturazione completa della lattoferrina. L'eccesso di ferro disponibile attiva un processo infiammatorio che richiama i neutrofili che, a loro volta, secernono la lattoferrina nel sito d'infezione/infiammazione, contribuendo alla diminuzione sia del ferro disponibile che della sintesi delle citochine pro-infiammatorie. Le nuove acquisizioni sui disordini dell'omeostasi sistemica del ferro, dipendenti dal sovraccarico di ferro nei tessuti e dalle citochine proinfiammatorie, unitamente ai nostri recenti risultati sull'attività antiinfiammatoria della lattoferrina ottenuti *in vitro* ed *in vivo*, ci hanno permesso di scoprire il ruolo chiave di questa proteina naturale, estratta dal latte bovino, nella regolazione dell'omeostasi sistemica del ferro attraverso la diminuzione dell'infiammazione, ed il conseguente ripristino dell'espressione della ferroportina e dell'epcidina, principali fattori dell'omeostasi sistemica del ferro.

EFFETTO STIMOLATORIO DELL'OLIO ESSENZIALE DI EUCALIPTO SULL'IMMUNITÀ INNATA CELLULO-MEDIATA

Annalucia Serafino (a), Federica Andreola (a), Manuela Zonfrillo (a), Luana Mercuri (a), Memmo Federici (c), Guido Rasi (a), Paola Sinibaldi Vallebona (b), Enrico Garaci (b), Pasquale Pierimarchi (a)

(a) *Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, ARTOV, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

(b) *INAF-IASF, Roma*

(c) *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biomediche, Università degli Studi Tor Vergata, Roma*

Introduzione. L'uso degli oli aromatici, già ampiamente diffuso nella moderna cosmetica come anche nella medicina popolare, si è recentemente esteso alla clinica per la terapia di patologie infiammatorie quali l'allergia e le malattie reumatiche. Riguardo all'olio essenziale di eucalipto (*EO*), sono stati descritti solo alcuni effetti biologici, quali le sue proprietà antisettiche nei confronti di vari agenti microbici ed il suo potenziale anti-infiammatorio sia *in vitro* che *in vivo*. Poco si sa circa l'influenza di questo olio essenziale sui componenti cellulari del sistema immune, ed in particolare sul sistema monocitico/macrofagico, uno dei principali effettori cellulari della risposta immune innata dell'organismo verso agenti allergenici ed infezioni patogene. Noi abbiamo esaminato gli effetti di *EO* estratto da *Eucalyptus globulus*, *in vitro*, sull'attività fagocitaria di macrofagi umani derivati dai monociti del sangue periferico (MDMs) ed *in vivo*, sui monociti/granulociti da sangue periferico di ratti in condizioni basali ed in situazioni di immuno-soppressione indotta da chemioterapici.

Metodi. L'analisi morfologica è stata effettuata mediante microscopia ottica ed elettronica. L'effetto di *EO* sull'attività fagocitaria è stata valutata: a) *in vitro* sui macrofagi umani, mediante somministrazione di microsferi di polistirene fluorescenti ed analisi al microscopio confocale; b) *in vivo*, dopo somministrazione di *EO* per *os*, sulla frazione monocitica/granulocitica da sangue periferico di ratti BDIX immuno-competenti od immuno-depressi con il chemoterapico 5-fluorouracile (5-FU), mediante analisi citofluorimetrica dell'*uptake* di *E. coli* fluorescenti. La produzione di citochine da parte di MDMs umani è stata determinata in citometria a flusso mediante il kit *BD Cytometric Bead Array human Th1/Th2 cytokine*.

Risultati. *EO* è in grado di attivare gli MDMs stimolando fortemente la loro capacità fagocitaria. La fagocitosi stimolata da *EO* è accompagnata da un basso rilascio di citochine infiammatorie e richiede l'integrità del network di tubulina, suggerendo che *EO* agisce probabilmente favorendo la fagocitosi mediata dal recettore del complemento piuttosto che quella mediata dal recettore delle immunoglobuline. L'implementazione della risposta immune cellulo-mediata è stata osservata anche *in vivo*, e coinvolge principalmente la frazione monocitica/granulocitica della componente cellulare del sangue periferico. Inoltre, il trattamento combinato 5-FU/*EO* è in grado di inibire la mielotossicità indotta dal 5-FU.

Conclusioni. I nostri dati dimostrano che l'estratto di *EO* è in grado di implementare la risposta immune cellulo-mediata, fornendo un supporto scientifico per un uso addizionale di tale estratto naturale oltre a quelli già noti di antisettico ed anti-infiammatorio.

IL CNF1: UNA PROTEINA BATTERICA CON ATTIVITÀ ANALGESICA

Flaminia Pavone (a), Siro Luvisetto (a), Sara Marinelli (a), Elisabetta Straface (b), Alessia Fabbri (b), Loredana Falzano (b), Walter Malorni (b), Carla Fiorentini (b)

(a) *Istituto di Neuroscienze, Psicobiologia e Psicofarmacologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

(b) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'impiego delle tossine proteiche di origine batterica ha recentemente acquisito una notevole rilevanza in clinica soprattutto grazie all'impiego di alcune di esse in ambito terapeutico, (ad esempio tossina botulinica). Il Fattore Citotossico Necrotizzante 1 (CNF1) è una tossina prodotta dall'*Escherichia coli* che agisce attivando proteine appartenenti alla famiglia delle Rho GTPasi (Rho, Rac e Cdc42). Queste proteine regolatorie, oscillando tra una forma non attiva citoplasmatica (forma legata al GDP) ed una forma attiva localizzata a livello della membrana plasmatica (forma legata al GTP), modulano l'assemblaggio e l'organizzazione dei microfilamenti di actina. In questo lavoro descriviamo per la prima volta la capacità del CNF1 di contrastare, nel topo, il dolore infiammatorio. La risposta analgesica dovuta a questa proteina richiede sia l'attivazione di una delle Rho GTPasi, la Rac GTPasi, con conseguente rimodellamento del citoscheletro di actina, che un'aumentata espressione dei recettori oppioidi μ , considerati i recettori più importanti nel controllare la percezione del dolore. Il ruolo cruciale di Rac è provato dalla mancanza d'attività analgesica nei topi trattati con CNF1C866S, forma ricombinante in cui l'attività enzimatica sulle Rho GTPasi è inibita tramite la sostituzione di una serina con una cisteina nella posizione 866. L'importanza dei recettori oppioidi μ è stata provata dall'incapacità del CNF1 d'indurre effetti analgesici in topi *knockout* per questi recettori. Inoltre, è stato anche osservato che l'effetto analgesico del CNF1 nel topo si ha sia se questa tossina viene somministrata a livello periferico che centrale. I risultati ottenuti da questo studio oltre a consentire la comprensione dei meccanismi intracellulari coinvolti nella modulazione del dolore, suggeriscono il CNF1 come un nuovo strumento per il controllo del dolore aprendo così la via verso nuove strategie terapeutiche.

SOSTANZE NATURALI AD ATTIVITÀ ANALGESICA ED ANTINFIAMMATORIA

Stefano Pieretti, Amalia Di Giannuario, Mariantonella Colucci, Marica Mastriota
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nonostante i recenti progressi nel trattamento delle sindromi algiche e delle patologie a base infiammatoria, la comparsa di effetti indesiderati qualvolta anche gravi dopo trattamento a lungo termine con oppioidi, antinfiammatori non steroidei (FANS), e corticosteroidi, incoraggia la ricerca biomedica alla caratterizzazione di nuove molecole con proprietà analgesiche/antinfiammatorie intrinseche e prive di effetti collaterali. Inoltre alcune patologie, come la bronchite cronica ostruttiva e il dolore neuropatico, sono trattate su base empirica utilizzando farmaci appartenenti a classi diverse. Considerando che una buona parte dei farmaci in commercio sono prodotti naturali, derivati semi-sintetici o composti di sintesi ottenuti da principi attivi naturali, la ricerca farmacologica non può prescindere dalla individuazione di molecole attive da questa fonte. Delle 250.000 specie vegetali stimate in natura, solo una piccola parte è stata sottoposta a indagine fitochimica e fra le molecole isolate, solo una piccola parte è stata caratterizzata farmacologicamente. Analogamente è il caso di principi attivi isolati da animali, soprattutto marini, in cui il numero delle specie studiate è ancora minore. Diverso è il caso di molecole ottenute da altre fonti, come i batteri, dove la facilità della coltura *in vitro* rende più agevole il loro isolamento e caratterizzazione farmacologica. Numerose specie vegetali e animali sono state utilizzate, fin da tempi remoti, nella terapia del dolore e nel trattamento degli stati infiammatori. Tra queste ricordiamo *Papaver somniferum* (morfina e derivati), *Cannabis sativa* (cannabinoidi e derivati) diverse specie di *Capsicum* (capsaicina e derivati), *Salix* (salicilati) e *Conus* (ziconotide e derivati). Oltre a questi, effetti antinocicettivi e antinfiammatori sono stati riportati per altri alcaloidi, terpeni, flavonoidi e tossine isolate da diverse specie animali, vegetali e batteriche alcuni dei quali sottoposti a studi clinici che sembrano indicare un loro possibile sviluppo come nuovi analgesici e antinfiammatori. Nostri precedenti studi hanno evidenziato le proprietà antinfiammatorie, antiaggreganti, ansiolitiche e anticonvulsivanti di alcuni composti di origine vegetale, suggerendo un loro impiego in patologie del sistema nervoso centrale e cardiovascolare.

EFFETTO INIBITORIO DEL FLAVONOIDE NATURALE QUERCETINA SULL'ATTIVAZIONE IgE-MEDIATA DI BASOFILI UMANI *IN VITRO*

Salvatore Chirumbolo (a), Antonio Vella (b), Riccardo Ortolani (b), Anita Conforti (c), Paolo Bellavite (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Morfologico-Biomediche, Università degli Studi, Verona*

(b) *Dipartimento di Patologia, Università degli Studi, Verona*

(c) *Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Università degli Studi, Verona*

Introduzione. La quercetina è un flavonoide naturale (tetraossiflavonolo) molto comune che può essere isolato da vegetali quali ippocastano, biancospino, camomilla, iperico e ginkgo biloba. Alimenti ricchi di quercetina sono: uva rossa e vino rosso, cipolla rossa, tè verde, mirtilli, mele. Numerose sono le evidenze circa la funzione anti-allergica - oltre che anti-ossidante - dei flavonoidi ed alcune concernono la loro azione sui basofili; tuttavia sono ancora scarsi i dati circa l'effetto di tali composti in senso anti-infiammatorio e farmacologico. In merito alla quercetina, le poche evidenze di laboratorio si riferiscono all'inibizione di questo flavonolo sul rilascio di istamina. I basofili sono implicati nelle reazioni allergiche e sono iniziatori dell'infiammazione allergica cronica, oltre che attori nei meccanismi anafilattici sia IgE che IgG mediati. Per queste ragioni abbiamo studiato l'effetto della quercetina sull'attivazione dei basofili, misurata come espressione di molecole indotta da agonisti.

Metodi. Leucociti umani da *pool* di minimo 4 *buffy coat* isolati da sangue venoso in K2-EDTA di donatori e risospesi in tampone HEPES, sono stati trattati a 37°C per 10 min con dosi di quercetina da 10 µg/ml a 10 ng/ml ed attivati con 4 µg/ml di anti-IgE per ulteriori 30 min a 37°C. Successivamente i basofili sono stati catturati in citometria a flusso con gating CD123^{bright}/HLADR^{non express} e ne è stata studiata l'attivazione misurando le variazioni dei valori medi di intensità di fluorescenza (MFI) dei marcatori CD63 e CD203c e la percentuale di CD63^{express} rispetto ai controlli.

Risultati. La quercetina inibisce del 95% (95,04% ±0,63 SD) e dell'85% (85,47±3,80 SD) l'espressione rispettivamente del CD63 e del CD203c già a 1 µg/ml. L'inibizione appare tuttavia più marcata per il CD63 MFI. Alla dose più bassa di 10 ng/ml l'inibizione dell'espressione del CD63 e del CD203c è del 26,41% e del 14,91%, rispettivamente. La curva dose-risposta della % di cellule con CD63^{expresso} conferma i dati del CD63 MFI.

Conclusioni. La quercetina inibisce l'attivazione dei basofili a dosi molto basse inferiori a quelle della letteratura secondo cui inibisce il rilascio di istamina. Dato che il contenuto in quercetina nei vegetali citati è dell'ordine del centinaio di µg/g di peso secco il lavoro suggerisce che un possibile ruolo anti-allergico sui granulociti basofili di alcune sostanze naturali potrebbe essere dovuto al loro contenuto in quercetina e mediato dall'attività regolatoria di questo flavonoide sui basofili.

Lavoro fatto nell'ambito di un accordo di collaborazione scientifica tra Università di Verona e Boiron Laboratoires.

ATTIVITÀ IMMUNOMODULATORIA DELLA VITAMINA D3 IN CELLULE DENDRITICHE UMANE

Maria Cristina Gauzzi, Cristina Purificato, Isabella Sanseverino, Filippo Belardelli, Sandra Gessani

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

1,25(OH)₂D₃, la forma biologicamente attiva della vitamina D3, è universalmente conosciuta per il suo ruolo centrale nel metabolismo del calcio e nell'omeostasi del tessuto osseo. Oltre a questa funzione "classica", la vitamina D3 è però dotata di altre importanti attività, come la capacità di regolare la proliferazione e il differenziamento di diversi tipi cellulari normali e tumorali, e una potente attività immunomodulatoria. Le cellule dendritiche (DC) sono cellule presentanti l'antigene "professionali", che svolgono un ruolo fondamentale nell'induzione e nella modulazione della risposta mediata dalle cellule T, indirizzandola verso l'immunità o la tolleranza immunologica. Le DC del *lineage* mieloide sono ormai riconosciute come uno tra i più importanti bersagli cellulari dell'1,25(OH)₂D₃ nel sistema immunitario. Le DC mieloidi esprimono il recettore VDR, e diversi studi hanno dimostrato che 1,25(OH)₂D₃ ed i suoi analoghi modificano profondamente sia il differenziamento che l'attivazione delle DC, indirizzandole verso l'induzione di tolleranza. L'obiettivo principale del nostro lavoro è la caratterizzazione dei meccanismi molecolari alla base dell'attività immunomodulatoria della vitamina D3 in differenti modelli di DC umane. In particolare, il nostro interesse è attualmente focalizzato sulla regolazione, da parte di 1,25(OH)₂D₃, del differenziamento delle DC, e della loro maturazione in risposta a ligandi dei TLR. A tale scopo, ci siamo concentrati su due fattori trascrizionali che svolgono un ruolo chiave nello sviluppo, differenziamento e attivazione delle DC: IRF4 e STAT3. Abbiamo osservato che l'inibizione del differenziamento delle DC mieloidi da parte di 1,25(OH)₂D₃ è associato ad una marcata inibizione, sia a livello di proteina che di mRNA, dell'espressione di IRF4, che si è rivelato dunque un nuovo gene bersaglio di 1,25(OH)₂D₃. Per quanto riguarda STAT3 abbiamo invece osservato che la presenza di 1,25(OH)₂D₃, pur non alterandone il livello di espressione, ne altera le modifiche post-trascrizionali osservate in risposta a citochine o ligandi dei TLR. Esperimenti di manipolazione genetica delle DC al fine di silenziare questi due fattori trascrizionali sono attualmente in corso per definire il loro ruolo nel differenziamento e attivazione delle DC, e nella risposta alla vitamina D3.

ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA E PARASSITICIDA DELLA CURCUMINA

Maria Cristina Angelici (a), Andrea Matteucci (b), Fiorella Malchiodi-Albedi (b)
(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La curcumina è un componente principale del curry, ed è quindi normalmente utilizzata come spezia. Viene estratta dalla pianta erbacea *Curcuma longa* ed è un diferuloilmetano la cui formula chimica è $C_{21}H_{20}O_6$. Essa costituisce un rimedio tradizionale in campo medico in India e Cina ed oggi ha un uso commerciale anche in occidente come additivo per la conservazione e la colorazione (E100) dei cibi. I meccanismi d'azione della curcumina più descritti sono quelli di tipo antinfiammatorio inibitorio di COX-2 e 5-LOX, delle citochine infiammatorie, e delle chinasi (PKA, PKC, CaM chinasi II). In particolare è descritta un'azione diretta sul fattore di trascrizione NF-kB con il blocco della produzione del TNF- α e AP-1. È stato dimostrato che la curcumina blocca sia la produzione che l'azione del TNF. È provata la sua capacità di controllo della proliferazione e trasformazione cellulare, di regolare l'induzione dell'apoptosi cellulare e la sua attività antivirale. La sua efficacia come principio attivo preventivo e curativo nel campo oncologico delle malattie neurodegenerative e delle malattie infettive, è, infatti, consolidata da moltissime pubblicazioni scientifiche di alto livello. Diverse pubblicazioni ne documentano la capacità parassitocida al pari di quella battericida contro diversi parassiti, Protozoi (*Plasmodium*, *Leishmania*, *Giardia*, *Eimeria*) e Nematodi (*Angiostrongylus cantonensis*). Per la curcumina, sono stati condotti studi *ad hoc* anche per provarne la non tossicità e teratogenicità sull'uomo e sull'animale, con vari dosaggi, definendo in tal modo anche il dosaggio minimo efficiente. È stata definita sostanza "Generalmente Riconosciuta Sicura" in quanto non teratogena e priva di effetti secondari, almeno all'interno dei dosaggi consentiti (26 trials clinici già avviati). È stata anche dimostrata una attività sinergica della curcumina con alcuni farmaci. Qui viene riportata una sperimentazione *in vitro* della potenzialità di questa sostanza di origine naturale contro *Toxoplasma gondii* dimostrando che la sua capacità antinfiammatoria è indirettamente capace di controllare la formazione delle cisti costringendo il parassita a non incistarsi e quindi ad essere aggredibile con la terapia convenzionale. Il modello, tutto da sperimentare, potrebbe portare a disegnare una terapia con curcumina in associazione con spiramicina (sinergia), nei casi di prima infezione in gravidanza e quindi a rischio di trasmissione al feto. La fattibilità di questo disegno è tutta da provare con il modello animale *in vivo* ma è incoraggiata dal fatto che questo principio naturale è già in uso nel commercio come integratore ed ha già passato già tutti i controlli per l'antiteratogenicità.

Sessione III
Sostanze naturali
ed attività antitumorale *in vitro*

Moderatori
Giuseppe Arancia, Maurizio Paci

IL RESVERATROLO: UNA MOLECOLA NATURALE AD AMPIO SPETTRO CON ATTIVITÀ ANTITUMORALE

Mariapia Fuggetta (a), Giulia Lanzilli (a), Maria Tricarico (a), Andrea Cottarelli (a), Serena Guida (a), Alessia Caracci (a), Giampiero Ravagnan (b)

(a) *Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi Cà Foscari, Venezia*

Il resveratrolo (3, 4', 5-tri-idrossi-stilbene, RES) è un composto polifenolico appartenente alla famiglia degli stilbeni, si trova in 72 specie di piante spermatofite, principalmente nella vite, in alcune bacche, in semi oleosi (arachide) ed in notevole quantità nel *Polygonum cuspidatum*, un'erba comunemente usata nella medicina asiatica. Incluso tra le fitoalessine, una classe di antibiotici vegetali, RES è una molecola segnale, capace di interagire con le strutture biologiche, attivando una serie di processi di riparo e meccanismi difensivi in risposta ad infezioni fungine e a stress come irradiazione UV. Esso raggiunge elevati livelli nelle bucce delle uve ed è quindi presente nei vini rossi e nei succhi d'uva in concentrazioni di mg/L. Numerosi dati sperimentali indicano che RES è un potente antiossidante, esso previene l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e protegge dai radicali liberi. Studi preliminari ipotizzano che RES protegga il cervello da stress ossidativi coinvolti in alcune malattie neurodegenerative. RES è in grado di inibire la produzione di eicosanoidi, quali le prostaglandine, i trombossani e i leucotrieni, composti che intervengono nelle reazioni infiammatorie e nell'aggregazione delle piastrine. Promuove la produzione di ossido nitrico, riduce il livello dei trigliceridi nel sangue e del colesterolo, agisce sull'agente ipertensivo intrinseco endotelina-1. Nel suo insieme costituisce una sostanza di rilievo nella riduzione dei rischi cardiovascolari. RES ha inoltre proprietà antivirali, neuroprotettive, anti-invecchiamento ed agisce come un fitoestrogeno. In generale RES blocca l'attivazione dell'NF-KB, fattore fortemente associato ai meccanismi dell'infiammazione e dell'oncogenesi. È stato inoltre dimostrato che RES ha effetti antiangiogenetici regolando la proliferazione e la chemiotassi a livello delle cellule endoteliali. RES mostra proprietà immunomodulanti ed in particolare, come dimostrato nel nostro laboratorio, RES ha nell'uomo un effetto dose-dipendente, stimolante o depressivo sulle risposte immunologiche cellulo-mediate naturali e antigene indotte. RES possiede attività chemopreventive ed antitumorali e sembra inibire l'insorgenza, la promozione e la progressione di alcuni tipi di cancro. Il nostro gruppo studia da anni gli effetti antitumorali, *in vitro* e *in vivo*, di RES su cellulari tumorali umane e murine di diversa istologia. La sua capacità antiproliferativa è principalmente correlata alla sua capacità di indurre apoptosi e variazioni del ciclo cellulare. I meccanismi molecolari attraverso i quali RES esercita i vari effetti biologici sono stati solo in parte identificati. Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato l'effetto inibitorio di RES sull'attività telomerasica che costituisce un importante indicatore dell'attività proliferativa di una cellula tumorale.

L'AMINOSSIDASI PURIFICATA DAL SIERO BOVINO INDUCE UN EFFETTO CITOTOSSICO SU CELLULE TUMORALI UMANE, IN PRESENZA DI POLIAMINE: UN NUOVO APPROCCIO NELLA TERAPIA ANTINEOPLASTICA

Enzo Agostinelli (a), Maria Condello (b), Agnese Molinari (b), Giampiero Tempera (a), Nikenza Viceconte (a), Giuseppe Arancia (b)

(a) Dipartimento di Scienze Biochimiche A. Rossi Fanelli, Università degli Studi Sapienza, Roma

(b) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Lo studio suggerisce una nuova terapia antitumorale, basata sull'effetto citotossico indotto su cellule tumorali umane in coltura di adenocarcinoma del colon (LoVo) e di melanoma (M14), sia sulla linea farmacosensibile sia su quella farmacoresistente (MDR), dai prodotti di ossidazione enzimatica della spermina, formati nella reazione di deaminazione ossidativa catalizzata dall'aminossidasi (BSAO), purificata dal siero bovino. I prodotti della reazione sono l' H_2O_2 , l'aldeide(i), che inducono citotossicità, e l' NH_3 . Lo studio di sopravvivenza cellulare è stato condotto in condizioni di normotermia ed a $42^\circ C$, in presenza di diverse concentrazioni di spermina ed a vari tempi d'incubazione. I risultati ottenuti a $37^\circ C$ hanno mostrato che i fenotipi MDR sono più sensibili all' H_2O_2 ed alle aldeidi rispetto a quelle *wild type*. Inoltre l'effetto protettivo, misurato in termini di incremento della percentuale di sopravvivenza cellulare, osservato in presenza di catalasi, suggerisce che l' H_2O_2 è il principale agente citotossico inducendo circa l'80% della morte cellulare. La restante citotossicità è attribuita alla aldeide(i). La completa protezione delle cellule è stata osservata in presenza di entrambi gli enzimi catalasi ed aldeide deidrogenasi. Studi di microscopia elettronica a scansione (SEM) e trasmissione (TEM) hanno mostrato alterazioni morfologiche ed ultrastrutturali delle cellule, dopo il suddetto trattamento. Questi studi hanno dimostrato che l' H_2O_2 e le aldeidi inducono un danno più marcato sulle cellule MDR, rispetto a quelle sensibili. Il TEM ha evidenziato cambiamenti ultrastrutturali a livello mitocondriale. Il danno cellulare maggiormente rilevato nelle cellule MDR viene attribuito alla presenza dei ROS. A $42^\circ C$ è stato osservato un incremento di citotossicità, rispetto ai $37^\circ C$, più marcato sul fenotipo MDR rispetto alle cellule *wild-type*. Ratti, ai quali sono stati preventivamente implantate cellule di melanoma (B16-F0), dopo 10 giorni la formazione del tumore raggiungeva un peso di 0,02 grammi. L'enzima libero e la BSAO in forma di microparticelle, derivatizzata con il PEG, venivano inoculati intraperitonealmente. Veniva quindi osservata una regressione del tumore del 40% negli animali trattati con il solo enzima libero, e superiore al 70% negli animali trattati con l'enzima immobilizzato. L'enzima libero induceva necrosi mentre quello immobilizzato apoptosi. L'associazione H_2O_2 ed aldeide(i) con l'ipertermia, a differenza della chemioterapia, potrebbe indurre un *killing* selettivo verso la massa tumorale ed essere considerata come nuova strategia terapeutica. Le

microparticelle di BSA-PEG risultano essere un supporto biocompatibile per veicolare la BSAO attraverso la membrana cellulare con prospettive in terapia antitumorale, soprattutto nei pazienti portatori di neoplasie MDR.

COMPOSTI ORGANICI NATURALI CONTENENTI ZOLFO ESTRATTI DALL'AGLIO: STUDI SUL MECCANISMO D'AZIONE PER LA PREVENZIONE E LA TERAPIA DEL CANCRO

Sonia Melino (a), Renato Sabelli (a), Egidio Iorio (b), Franca Podo (b), Maurizio Paci (a)
(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università degli Studi Tor Vergata, Roma*
(b) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Molti composti organici naturali contenenti zolfo (OSCs) inibiscono la proliferazione delle cellule tumorali *in vitro* mediante induzione della morte cellulare programmata. Sebbene i meccanismi biochimici alla base degli effetti antiproliferativi ed oncogenici degli OSCs presenti nell'aglio non sono stati ancora pienamente compresi, sembra probabile che la *clearance* degli allil-solfuri nella cellula possa avere un ruolo determinante. Infatti, è stato ipotizzato che una ridotta e/o incorretta funzionalità degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli OSCs possa essere responsabile di un aumento di composti contenenti selenio e zolfo-solfanico nella cellula, portando la cellula a processi degenerativi ed all'apoptosi. Non tutte le cellule sono ugualmente suscettibili agli effetti deleteri degli OSCs presenti nell'aglio ed, in particolare, le cellule normali sembrano essere meno suscettibili a tali composti rispetto a quelle tumorali. Ciò potrebbe far pensare che l'incotrollata proliferazione delle cellule neoplastiche possa essere anche correlata ad una deficienza di composti OSCs nella cellula. Inoltre, è da notare che l'espressione di solfotrasferasi, come la rodanese, è ridotta nelle cellule tumorali colon-rettali. Studi epidemiologici hanno rivelato che l'incremento di consumo di aglio diminuirebbe il rischio di cancro allo stomaco e al colon, suggerendo l'uso di OSCs naturali nella chemio-prevenzione tumorale. L'induzione dell'apoptosi da parte di OSCs naturali pone quindi una rilevante questione riguardo al loro ruolo nella cellula ed al ruolo degli enzimi coinvolti nel loro metabolismo nel processo di cancerogenesi. Nei nostri studi *in vitro* ed in cellule tumorali abbiamo analizzato gli effetti del 2-propenil-tiosolfato (2-PTS) sia sul sistema antiossidante che di detossificazione della cellula. Tali studi suggeriscono un coinvolgimento del GSH e del sistema di rodanese-tioredoxina-tioredoxina riduttasi nella citotossicità degli OSCs, mettendo, inoltre, in luce una probabile correlazione tra l'induzione dell'apoptosi e il danno agli enzimi mitocondriali coinvolti nel riparo dei *cluster* Fe-S e nel sistema di detossificazione cellulare.

FARMACORESISTENZA DELLE CELLULE TUMORALI ED IMPIEGO DI SOSTANZE NATURALI PER IL SUO SUPERAMENTO

Agnese Molinari (a), Annarita Stringaro (a), Annarica Calcabrini (a), Laura Toccaceli (a), Marisa Colone (a), Stefania Meschini (a), Manuela Marra (a), Marco Diociaiuti (a), Cristiano Giordani (a), Francesca Mondello (b), Giuseppe Arancia (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La capacità delle cellule tumorali di attivare efficaci meccanismi di difesa nei confronti degli agenti citotossici, sia chimici che fisici, costituisce un serio ostacolo al successo della chemio e della radioterapia. Questo ha spinto sempre più studiosi che operano nel campo dell'oncologia a ricercare nuove sostanze che da sole o in combinazione con la chemioterapia tradizionale siano in grado di superare il fenomeno della farmacoresistenza e di fornire un miglioramento dell'indice terapeutico. In molte linee cellulari, la farmacoresistenza è spesso associata ad un ridotto accumulo intracellulare dei farmaci antitumorali dovuto ad un aumentato efflusso contro un gradiente di concentrazione. Tale fenomeno è dovuto alla sovraespressione della P-glicoproteina (P-gp), una pompa di efflusso energia-dipendente, che diminuisce l'accumulo dei farmaci e quindi la loro citotossicità. Diversi composti in grado di modulare l'attività della P-gp riescono a superare la farmacoresistenza *in vitro*: tra questi i più frequentemente menzionati sono il verapamil, un bloccante del calcio, e la ciclosporina A. Tuttavia l'utilizzo clinico di tali chemosensibilizzanti rimane discutibile in ragione della loro elevata tossicità; pertanto risulta necessaria l'identificazione di composti più attivi ma meno tossici così come la valutazione di regimi terapeutici alternativi. In questa relazione riportiamo l'esperienza di uno studio *in vitro* condotto allo scopo di valutare la potenziale attività antitumorale del *Tea Tree Oil* (TTO), olio essenziale distillato dalla *Melaleuca alternifolia*, di cui sono ben note le proprietà antibatterica ed antivirale. Sono state utilizzate una linea cellulare di melanoma umano, M14 WT, e una sua variante, M14 ADR, che mostra resistenza crociata a doxorubicina, vincristina e melfalan, mediata dal trasportatore di farmaci P-gp. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il TTO e il terpinen-4-olo sono in grado di interferire con la crescita cellulare delle cellule di melanoma resistente stimolando la morte cellulare programmata. In tal modo l'azione protettiva della P-gp nei confronti degli stimoli apoptotici viene contrastata. Poiché il TTO e il terpinen-4-olo interagiscono preferenzialmente con i fosfolipidi (DPPC) delle membrane cellulari, si può ipotizzare che l'attività anti-apoptica della P-gp (ATP-indipendente) possa venire esplicitata dalle molecole localizzate nel mare fluido di DPPC, mentre quella di trasporto (ATP-dipendente) venga soprattutto effettuata dalle molecole di P-gp localizzate nei *rafts*. A supporto di tale ipotesi vengono i risultati che dimostrano che l'attività di trasporto della P-gp non viene alterata dal TTO o dal terpinen-4-olo. Questi risultati suggeriscono una possibile applicazione del *Tea Tree Oil* come agente innovativo antitumorale.

L'ALCALOIDE VEGETALE VOACAMINA INDUCE MORTE AUTOFAGICA IN CELLULE TUMORALI UMANE FARMACORESISTENTI

Stefania Meschini (a), Maria Condello (a), Pasquale Lista (a,c), Elena Federici (b), Gabriele Civitelli (a), Giuseppe Arancia (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata, Rionero in Vulture, Potenza*

Le cellule tumorali esposte ad agenti citotossici sviluppano frequentemente, sia *in vitro* che *in vivo*, il fenotipo resistente (MDR). Numerosi prodotti naturali sono attualmente studiati per la loro possibile attività chemiosensibilizzante e/o antitumorale allo scopo di ottimizzare la terapia e ridurre gli effetti dannosi dei farmaci convenzionali. La Voacamina (VOA) è un alcaloide bisindolico vegetale, isolato dalla pianta infestante brasiliana *Peschiera fuchsiaeifolia*, che presenta attività antimicrobica ed antimalarica contro ceppi di *Plasmodium falciparum* cloroquina-resistenti. Abbiamo precedentemente dimostrato l'effetto chemiosensibilizzante della voacamina in cellule tumorali umane farmacoresistenti, trattate in combinazione con la doxorubicina (DOX). Linee cellulari linfoblastoidi (CEM-R), di carcinoma del colon (LoVo-R) e di osteosarcoma umano (U-2 OS-R), esprimono elevati livelli di P-glicoproteina (Pgp), trattate con concentrazioni subcitotossiche di VOA, presentavano un aumento della concentrazione ed una diversa distribuzione intracellulare della DOX. È stato dimostrato che la VOA è in grado di inibire in modo competitivo l'azione della P-gp, favorendo l'effetto citotossico della DOX. È stato inoltre evidenziato che tale effetto non era dovuto all'induzione di apoptosi ma piuttosto ad un processo autofagico. L'autofagia è un processo catabolico che consente alla cellula di degradare proteine ed organelli danneggiati e di riutilizzare componenti necessari per lo svolgimento di importanti funzioni vitali. Sebbene l'autofagia sia un processo protettivo che consente alla cellula di sopravvivere in condizioni avverse, quali carenza di nutrienti o esposizione ad agenti citotossici, recenti studi hanno evidenziato l'insorgenza, in linee cellulari tumorali, di un tipo di autofagia letale che porta la cellula a morte. In condizioni di trattamento con la sola VOA che causava la morte di circa il 50% delle cellule di osteosarcoma farmacoresistenti, non erano visibili segni di apoptosi, né mediante osservazioni di microscopia elettronica, né mediante analisi citofluorimetrica (test dell'Annessina V-FITC) e valutazione del taglio di PARP in *western blotting*. Le cellule U-2 OS-R, invece, andavano regolarmente in apoptosi quando trattate con induttori classici, quali staurosporina o DOX. Osservazioni al microscopio elettronico di sezioni ultrasottili e l'analisi quantitativa dell'incorporazione della monodansilcadaverina effettuata in citofluorimetria, hanno evidenziato l'induzione di morte autofagica. Questi risultati sono stati inoltre confermati dall'utilizzo di inibitori che agiscono nelle varie fasi della formazione dei vacuoli autofagici. In conclusione, l'estratto vegetale VOA, oltre ad avere un potente effetto chemiosensibilizzante, è in grado di indurre morte autofagica alternativa all'apoptosi in cellule tumorali farmacoresistenti. La conferma di tali effetti mediante studi *in vivo*, potrebbero suggerire l'impiego dell'alcaloide vegetale quale valida alternativa ai classici farmaci anti-tumorali.

ATTIVITÀ CITOTOSSICA DI METABOLITI VEGETALI

Laura De Martino, Vincenzo De Feo

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi, Salerno

È stata valutata l'attività proapoptotica di alcuni oli essenziali da 12 specie della flora mediterranea su diverse linee cellulari tumorali: FRO, MDA MB 231, SW620 e DLD1. I saggi effettuati rivelano che l'olio di basilico ha il più marcato effetto antitumorale verso le cellule FRO, sia alla dose più bassa che a quella più alta. Gli oli di timo, carvi e salvia sono attivi, ad entrambe le dosi, sulle MDA MB 231. Gli oli di timo e carvi sono i più attivi anche verso le DLD1. Infine, le cellule SW620 sono molto sensibili agli oli di salvia e di verbena. Sono stati, inoltre, saggiati i principali componenti dei 12 oli testati, alcuni dei quali hanno mostrato buona attività antiproliferativa. È in corso lo studio del meccanismo d'azione. Dall'estratto cloroformico delle radici di *Ailanthus altissima Swingle* è stato isolato un alcaloide a nucleo indolico, l'1-metossi-cantin-6-one, che ha mostrato una buona efficacia antiproliferativa e proapoptotica su diverse linee cellulari tumorali. L'1-metossi-cantin-6-one è stato saggiato su cellule Jurkat: si è rilevata depolarizzazione della membrana mitocondriale, fuoriuscita dal mitocondrio di citocromo c e Smac/DIABLO, attivazione della caspasi 3. Il composto è stato poi testato in associazione con TRAIL ricombinante, utilizzando concentrazioni sub-ottimali di entrambi, provocando un'apoptosi del 45%. Il saggio con il TMRE ha rilevato netta depolarizzazione della membrana mitocondriale, quando l'alcaloide e il TRAIL vengono utilizzati insieme, alle loro concentrazioni sub-ottimali. Il metossi-cantin-6-one è stato poi saggiato su altre linee cellulari tumorali, le HuH7 e le NPA, mostrando una comparsa di elementi apoptotici superiori al 50%. La sinergia con il TRAIL è stata riscontrata anche sulle altre linee cellulari, a dosi sub-ottimali. Questi risultati indicano che l'alcaloide può rappresentare un buon candidato, per studi *in vivo*, di monoterapie o terapie antineoplastiche combinate. È stato valutato l'effetto proapoptotico dell'olio essenziale di verbena e del citrale, suo principale componente, su linfociti raccolti da sangue di donatori sani e di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica. Tali sostanze sono in grado di indurre apoptosi nei linfociti sia dei donatori sani che dei pazienti: la percentuale di elementi apoptotici è significativamente maggiore nei pazienti. La delezione 17p13 riduce la percentuale di apoptosi indotta da tali sostanze. Sono state testate le attività antiproliferativa e proapoptotica del decotto acquoso di corteccia di *Uncaria tomentosa*, su tre linee cellulari tumorali: HeLa, MCF7, SAOS. L'attività proapoptotica è stata più marcata nei confronti delle HeLa; la frazione butanolica del decotto ha mostrato un'apoptosi dose-dipendente su queste ultime, con probabile coinvolgimento della caspasi 3.

DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE DI MELANOMA CON INIBIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI P-MEK IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON 5,7-DIMETOSSICUMARINA

Daniela Alesiani (a), Rosella Cicconi (b), Maurizio Mattei (a,b), Antonella Canini (a)

(a) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi Tor Vergata, Roma*

(b) *Centro di Servizi Interdipartimentale, Stazione per la Tecnologia Animale (STA),
Università degli Studi Tor Vergata, Roma*

Nel presente lavoro abbiamo analizzato l'attività antiproliferativa della 5,7 dimetossicumarina, un metabolita secondario prodotto nelle piante, su linee di melanoma murine (B16) e umane (A375). Sia in B16 che in A375, il composto riduce in modo significativo la proliferazione cellulare bloccando le cellule in fase G₀/G₁. In studi molecolari abbiamo evidenziato una ridotta fosforilazione di Erk 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*), un membro Ras/Raf/Mek/Erk della via di segnale delle *Mitogen-Activated Protein Chinasi* (MAPK). Questa via regola la sopravvivenza cellulare, i processi di proliferazione e di differenziamento, nel 70% dei melanomi essa è costitutivamente attivata a seguito di mutazioni. Basandosi su questa premessa la via MAPkinasi è considerata il target molecolare di nuove terapie di ricerca sul cancro. Pertanto in questo lavoro viene esaminata l'attività enzimatica di Mek e, per la prima volta, abbiamo dimostrato che la 5,7 dimetossicumarina inibisce la sua attività promuovendo una significativa riduzione della fosforilazione di Erk e della proliferazione cellulare. Inoltre conseguentemente al blocco del ciclo cellulare, si verifica un processo di differenziamento con cambiamenti morfologici, sviluppo di strutture simili a dendriti dalle superfici cellulari, sintesi di melanina e accumulo di protoporfirina IX (PpIX). Con riferimento al processo di melanogenesi abbiamo analizzato l'espressione della proteina CREB (p-CREB, *cAMP-response element-binding protein*) e del fattore di trascrizione associato alla microftalmia (MITF) oltre all'attività tirosinasi. MITF è coinvolto nel differenziamento, nei meccanismi di proliferazione e sopravvivenza di melanociti; inoltre esso attiva la trascrizione del gene che codifica per la tirosinasi, l'enzima chiave del processo di sintesi di melanina. L'attività trascrizionale di quest'ultimo è regolata attraverso la fosforilazione di CREB che a sua volta regola la trascrizione del gene MITF. I risultati dimostrano che l'attività tirosinasi aumenta nelle cellule B16 in seguito a trattamento con 5,7 dimetossicumarina con conseguente aumento dell'espressione p-CREB e MITF. Nessun incremento dell'attività tirosinasi viene è stato rilevato in A375.

COMPOSIZIONE FITOCHIMICA E ATTIVITÀ CITOTOSSICA *IN VITRO* DELL'OLIO ESSENZIALE DI *SALVIA ACETABULOSA* L.

Monica R. Loizzo, Federica Menichini, Rosa Tundis, Marco Bonesi, Giancarlo A. Statti, Filomena Conforti, Francesco Menichini

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi della Calabria, Rende, Cosenza

Il mondo vegetale rappresenta un'effettiva risorsa di principi attivi ad attività antitumorale e ciò è dimostrato dall'evidenza che oltre il 60% delle sostanze utilizzate in terapia proviene da fonti naturali. Il genere *Salvia* (Lamiaceae) comprende circa 700 specie che sono caratterizzate da elevata diversità sia nella produzione di metaboliti secondari sia negli effetti farmacologici riscontrati per questi prodotti. Scopo del presente lavoro è stata la valutazione della composizione fitochimica e dell'attività citotossica dell'olio essenziale di *Salvia acetabulosa* L., raccolta sul territorio libanese. Le parti aeree della *S. acetabulosa* sono state sottoposte ad idrodistillazione con una resa dell'1,7%. L'analisi GC e GC-MS ha portato all'identificazione di diciannove composti pari al 93,5% del totale. α -pinene (52,3%), 1,8-cineolo (27,7%) e canfora (6,7%) sono i composti maggiormente rappresentativi dell'olio. Lo screening biologico *in vitro* è stato valutato mediante SRB assay (3) sulle seguenti linee cellulari tumorali: COR-L23, Caco-2, C32, ACHN, A375, A549, Huh-7D12, MCF-7 e LNCaP. L'olio essenziale di *S. acetabulosa* ha evidenziato una potente azione citotossica comparando i dati ottenuti con il prodotto commerciale vinblastina, correntemente impiegata nella pratica terapeutica. In particolare, è risultata sensibile la linea cellulare COR-L23 con un valore di IC_{50} di $6,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Interessanti risultati sono stati ottenuti anche sulla linea cellulare di melanoma amelanotico (IC_{50} di $6,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) e di adenocarcinoma renale (IC_{50} di $6,8 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Sessione IV - Parte 1
Sostanze naturali
con attività antimicrobica

Moderatori

Annalisa Pantosti, Giovanni Fadda

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI ALCUNI ESTRATTI DI PIANTE NEI CONFRONTI DI *HELICOBACTER PYLORI* (HP)

Natale Figura (a), Silvia Martini (b), Nicola Giordano (a), Annalisa Santucci (c)
(a) Dipartimento di Medicina Interna, Università degli Studi, Siena
(b) Dipartimento di Chimica e Scienze Biosistemiche, Università degli Studi, Siena
(c) Dipartimento di Biologia Molecolare, Università degli Studi, Siena

Lo sviluppo di antibiotico-resistenze da parte di *Helicobacter pylori* (HP) e la loro scarsa disponibilità di farmaci nei paesi a basso tenore tecnologico ci hanno spinto ad esaminare l'attività antibatterica di alcune sostanze naturali nei confronti di ceppi di HP a diversa espressione di virulenza (ceppo K10, CagA+ e ceppo G21, CagA⁻).

Materiali e metodi. Farina di Soia (FS), pomodoro, uva ed estratto di foglie di rovo ed i loro composti venivano dissolti in DMSO e diluiti in brodo *Brucella*-SF in un volume di 100 μ l. 3×10^6 batteri venivano aggiunti a ciascuna diluizione. Dopo incubazione per una notte in condizioni microaerobiche a 37°C, 3 μ l di ciascuna diluizione sono stati depositati su piastre ed incubate per 3 giorni. La più minima concentrazione in brodo la cui subcoltura su agar mostrava la completa assenza di crescita veniva considerata come la Minima Concentrazione Battericida (MCB) ed era espressa in mg/ml.

Risultati. FS presentava un'MCB di <0,5 per entrambi i ceppi; l'estratto lipofilo di pomodoro un'MCB di 0,1 per il ceppo G21 quasi nessuna attività per il ceppo K10. L'estratto idrofilo di pomodoro un'MCB di 3 e 4. L'estratto di succo d'uva dei due *cultivar* esaminati, colorino e sangiovese, mostrava differenti valori di MCB, 1.720 e 0,658, rispettivamente, nei confronti del ceppo G21, mentre i valori di MCB verso il ceppo K10 erano simili (2.440 e 2.260). L'MCB di estratto di foglie di rovo era di 5,0 per entrambi i ceppi. Per quanto riguarda i composti standard esaminati, i valori di MCB erano i seguenti: resveratrolo, 0,047; naringenina, 0,079; calchone naringenina, 0,034 per ambo i ceppi; composti di soia (genisteina, daidzeina, coumestrol, biochanina A, formononetina) <0,050 per il ceppo G21; 0,122, 0,100, 0,089, 0,239, 0,046, rispettivamente, nei confronti del ceppo K10. In totale, il ceppo K10 era il meno sensibile. Tra tutti i composti esaminati, solo l'epicatechina era più attiva verso il ceppo K10, mentre resveratrolo, naringenina e calchone naringenina non hanno mostrato un comportamento selettivo.

Conclusioni. La buona attività antiossidante e antibatterica dei composti esaminati li rende idonei alla prevenzione dei fenomeni di mutagenesi della mucosa gastrica e al trattamento dell'infezione da HP, in aggiunta agli antibiotici. L'osservata minore sensibilità del ceppo più virulento, K10, potrebbe contribuire a spiegare la ragione per la quale l'infezione da parte di ceppi CagA+ di HP sia più intimamente associata allo sviluppo di un carcinoma gastrico, rispetto a quanto lo sia l'infezione da ceppi CagA⁻.

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA DI OLI ESSENZIALI ESTRATTI DA PIANTE DELLA MACCHIA MEDITERRANEA SARDA

Paola Molicotti
Università degli Studi, Sassari

Il ricorso alle cure con elementi naturali provenienti dal regno vegetale accompagna da sempre la storia dell'uomo. La fitoterapia è la disciplina medica che utilizza a scopo curativo piante medicinali e loro derivati. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce pianta medicinale ogni vegetale che contiene sostanze che possono essere utilizzate a fini terapeutici o preventivi. La macchia mediterranea sarda è ricca di piante molto aromatiche dalle essenze odorose e profumate. Alcune piante hanno un uso alimentare nel condimento di cibi o nella produzione di liquori altre sono tipicamente ornamentali. Molte di esse sono da sempre considerate medicamentose e la tradizione popolare sarda tramanda le loro proprietà di generazione in generazione. La nostra attenzione si è focalizzata in particolare su alcune di queste piante: *Mirtus communis* L., *Lantana camara*, *Helicrysum italicum*, *Stachys glutinosa*, *Rosmarinus officinalis* ed *Inula helenium* raccolte in zone diverse del Nord Sardegna. L'olio essenziale è stato estratto con idrodistillazione con *Clavenger* e successivamente analizzato con Gas Cromatografia di massa per determinare la composizione chimica. L'olio così estratto è stato utilizzato per analizzare l'attività antimicrobica e antifungina nei confronti di ceppi ATCC Gram-positivi che Gram-negativi, clinici e ambientali. La tecnica utilizzata è l'aromatogramma. È stata inoltre valutata l'attività tossica di questi oli, a diverse diluizioni, su cellule Hep2 (cellule epiteliali di carcinoma umano della laringe) e Caco-2 (cellule del carcinoma del colon). I risultati ottenuti sono incoraggianti e d'interessanti tanto da spingerci a effettuare ulteriori analisi dei dati ed al contempo ampliare lo studio del vasto assortimento di piante che la nostra isola ci offre con grande generosità.

PEPTIDI ANTIMICROBICI: UNA NATURALE DIFESA DELL'ORGANISMO ED UNA POTENZIALE TERAPIA

Sonia Melino (a), Raffaele Petruzzelli (b), Francesca Mondello (c), Maurizio Paci (a)
(a) *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università degli Studi Tor Vergata, Roma*
(b) *Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi G. D'Annunzio, Chieti*
(c) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il problema della resistenza ai convenzionali antibiotici e la necessità di produrne nuovi, hanno stimolato l'interesse per lo sviluppo di peptidi antimicrobici naturali utilizzabili come composti terapeutici. I fluidi fisiologici umani contengono peptidi con un'elevata attività antimicrobica ad ampio spettro e costituiscono un valido sistema di difesa innato dell'organismo umano. Tra i peptidi appartenenti a tale sistema di immunità innata vi sono le Istatine, peptidi basici ricchi di istidine, presenti nella saliva e prodotte dalle ghiandole sub-mandibolari e dalle parotidi. Le Istatine oltre ad un'attività antibatterica posseggono un'elevata attività antifungina, in particolare, l'Istatina 5 (His5) è il peptide tra le istatine che presenta la maggiore attività fungicida e fungistatica a concentrazioni prossime a quella fisiologica nella saliva. His5, contrariamente ad altri peptidi antimicrobici naturali, non esplica la sua attività antimicrobica mediante la formazione di pori a livello della membrana plasmatica ed a tutt'oggi, sebbene si abbiano molte informazioni sul processo *multi-step* con cui svolge la sua attività candidicida, il meccanismo d'azione antimicrobico non è ancora del tutto compreso. Studi strutturali e funzionali su His5, e su suoi analoghi, hanno messo in luce nuove proprietà di questo peptide correlate alla sua capacità di legare ioni metallici. Tali proprietà potrebbero non solo aiutare a comprendere meglio la sua attività antimicrobica, ma anche ampliare la possibilità di impiego di questa famiglia di metallo-peptidi naturali come agenti terapeutici.

Sessione IV - Parte 2
Sostanze naturali
con attività antimicrobica

Moderatori

Annalisa Pantosti, Giovanni Fadda

ATTIVITÀ ANTIVIRALE DELLE SOSTANZE NATURALI

Paola Checconi, Lucia Nencioni, Anna Teresa Palamara
Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica G. Sanarelli, Università degli Studi Sapienza, Roma

Tra le diverse attività biologiche attribuite alle sostanze naturali, una particolare importanza è rivestita dalle proprietà antimicrobiche ed, in particolare, antivirali. Molte di esse, infatti, mostrano la capacità di inibire virus diversi per struttura e strategie replicative. Nonostante gli specifici meccanismi di azione restino ancora da chiarire, appare interessante che, in molti casi, il bersaglio dell'azione antivirale non sia limitato a strutture virali ma si estenda a vie metaboliche della cellula ospite, utilizzate dal virus per la propria replicazione. In questo contesto, notevole interesse destano i polifenoli, una vasta famiglia di composti organici, ampiamente distribuita nel regno vegetale. Tra questi, alcuni flavonoidi inibiscono la replicazione di HIV interferendo con la trascrittasi inversa, o le proteasi virali. Le catechine, contenute nel tè verde, in particolare l'Epigallocatechina Gallato (EGCG), mostrano attività antivirale nei confronti di più virus: HIV, virus dell'influenza, adenovirus, virus di Epstein Barr. Più recentemente è stato dimostrato che le teaflavine, contenute nel tè nero, hanno un'azione anti-HIV, anche più potente di quella delle catechine. Tutte queste sostanze, sono in grado di interagire con proteine virali, di superficie o nucleocapsidiche, ma non è escluso che la loro attività antivirale sia correlata anche alla capacità di interferire con funzioni cellulari. Ad esempio, l'effetto anti-HIV dei flavonoidi potrebbe essere dovuta alla down-regolazione dell'espressione di corecettori cellulari come CCR2b, CCR3 e CCR5. L'attività anti-influenzale della già citata EGCG potrebbe essere legata anche ad un blocco dell'acidificazione dei compartimenti intracellulari, necessaria all'*uncoating* del virus. Ancora, l'attività anti-influenzale, di un estratto di *Geranium sanguineum*, ricco in polifenoli, potrebbe essere legata alle sue proprietà antiossidanti e di *radical scavenger*. Studi condotti nei nostri laboratori hanno dimostrato che il resveratrolo, un polifenolo presente in numerosi frutti, dalle note proprietà antiossidanti, inibisce *in vitro* ed *in vivo* la replicazione del virus influenzale. In questo caso, l'effetto non sembra dovuto alle proprietà antiossidanti del prodotto, quanto piuttosto all'inibizione della protein chinasi C e di alcune vie da essa dipendenti, quali p38MAPK e JNK. Tali vie chinasiche, attivate specificamente dal virus, sono implicate nelle regolazione del traffico nucleo-citoplasmatico della nucleoproteina virale, così come nell'innescio della risposta infiammatoria. La "duplicità di azione" (virus/cellula) di alcune sostanze naturali potrebbe quindi offrire numerosi vantaggi per strategie antivirali innovative: efficacia ad ampio spettro, ridotta probabilità di insorgenza di ceppi virali resistenti, contemporanea attività antivirale-antinfiammatoria. Ricerche future potranno essere volte a mettere in luce questi effetti ed a chiarirne i meccanismi molecolari.

OLI ESSENZIALI: RUOLO E PROSPETTIVE D'USO NELLE INFEZIONI FUNGINE

Francesca Mondello, Antonietta Girolamo, Flavia De Bernardis, Antonio Cassone
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Un rimarchevole interesse si è verificato nell'ultimo ventennio per l'uso terapeutico di sostanze naturali in alcune patologie infettive, incluse quelle fungine, di particolare rilievo nell'ospite immunocompromesso. Tutto ciò soprattutto per contrastare gli effetti tossici delle terapie convenzionali, il galoppante fenomeno dell'antibiotico-resistenza e la stessa scarsità di nuovi chemioterapici. Gli Oli Essenziali (OE) sono complesse misture di sostanze vegetali volatili di cui la letteratura scientifica ha da tempo evidenziato i vantaggi in termini di ampio spettro di attività biologiche, di biodisponibilità e di esigua tossicità. Recentemente, un grande numero di OE e di loro costituenti sono stati ben caratterizzati *in vitro* per la loro attività nei confronti di lieviti, di dermatofiti e di altri funghi filamentosi. Tuttavia anche i dati microbiologico-clinici promettenti sono spesso insufficienti, aneddotici e non basati sull'uso di metodologie validate e di modelli sperimentali con buona predittività per l'uso clinico. Inoltre spesso gli OE utilizzati nella ricerca non rispondono ai requisiti di buona qualità, in quanto si tratta di misture poco definite di vari composti. Alla luce di ciò, basandosi esclusivamente sull'uso di buoni modelli preclinici ed efficienti saggi di qualità, abbiamo condotto studi su *Candida albicans*, il maggiore patogeno fungino umano, di cui abbiamo dimostrato l'estrema sensibilità al *Tea Tree Oil* (TTO) e al terpinene-4-olo, suo principale componente attivo, sia *in vitro* che in un modello sperimentale di infezione mucosale. Sia il TTO che il terpinene hanno mostrato di avere entrambi proprietà fungicida e capacità di eliminazione di ceppi di *C. albicans*, sensibili e resistenti *in vitro* ad azolici ed echinocandine con la stessa efficienza, dalla vagina delle ratte con candidosi sperimentale. Sono anche iniziati alcuni studi del meccanismo d'azione di questi composti, e dimostrato che TTO altera la permeabilità delle cellule di *C. albicans*, causando cambiamenti strutturali e funzionali delle membrane fungine. Se future ricerche confermeranno questi dati, ed escluderanno eventuali effetti avversi, TTO e terpinene potrebbero essere oggetto di studi clinici miranti a stabilire un loro ruolo effettivo terapeutico contro la candidosi vulvovaginale ricorrente refrattaria ai comuni antimicotici. In conclusione, lo studio di TTO e di altri OE, insieme alla ricerca dei singoli componenti attivi, potrà allargare lo spettro dei possibili interventi terapeutici in modo da avere armi sempre più efficaci per combattere le recidive e prevenire i fenomeni di chemio-resistenza antifungina.

MECCANISMO DI AZIONE E PROPRIETÀ TERAPEUTICHE DEGLI OLI ESSENZIALI SU CEPPI DI *CANDIDA ALBICANS* FARMACOSENSIBILI E FARMACORESISTENTI

Marisa Colone (a), Francesca Mondello (b), Annarica Calcabrini (a), Laura Toccaceli (a), Letizia Angiolella (c), Antonietta Girolamo (b), Nicolina Mastrangelo (a), Giuseppe Arancia (a), Antonio Cassone (b), Annarita Stringaro (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica G. Sanarelli, Università degli Studi Sapienza, Roma*

Le malattie infettive sono causate da microrganismi che interagiscono in modo complesso con l'ospite. La scoperta degli antibiotici ed il loro impiego sono stati molto efficaci nel trattamento delle infezioni batteriche e fungine, ma il loro uso indiscriminato ha purtroppo causato lo sviluppo di ceppi patogeni resistenti. La resistenza clinica è stata definita come la persistenza o la progressione di un'infezione nonostante la terapia antimicrobica appropriata. La resistenza *in vitro* di un isolato clinico può essere descritta come primaria o secondaria. La resistenza secondaria si sviluppa in risposta all'esposizione ad agenti antimicrobici impiegati in terapia. Spesso è stata riscontrata una correlazione di suscettibilità tra il grado di resistenza rivelato *in vitro* rispetto a quello riscontrato *in vivo*. Oltre che per le infezioni batteriche, incremento di resistenza è stato riportato anche nelle infezioni micotiche, in particolare quelle causate da *Candida albicans*, un fungo diploide patogeno per l'uomo, verso il fluconazolo, uno dei farmaci più efficaci e tollerati. Per questi motivi numerosi ricercatori stanno valutando la reale fattibilità di impiego di nuove strategie terapeutiche non farmacologiche. Tra queste emerge sempre più l'interesse scientifico nei confronti delle proprietà terapeutiche delle sostanze di origine naturale, in particolar modo degli oli essenziali. Questi ed i loro componenti ottenuti dalla distillazione di alcune parti vegetali hanno dimostrato di possedere diverse attività come quella antimicrobica ed anti-infiammatoria. Per questo motivo è apparsa evidente la necessità di sviluppare dei modelli *in vitro* e di applicare le indagini biochimiche ed ultrastrutturali per ottenere indicazioni utili sul meccanismo di azione e quindi sulla loro reale attività farmacologica. Il nostro gruppo ha concentrato la propria attenzione sullo studio del meccanismo di azione di un olio essenziale, distillato dalle foglie di *Melaleuca alternifolia*, noto come *Tea Tree Oil* (TTO). Gli studi sono stati condotti su ceppi di *C. albicans*, isolati da pazienti HIV⁺, utilizzando metodi di Citofluorimetria a Flusso (FACS), Microscopia Confocale a Scansione Laser (LSCM) e Microscopia Elettronica Trasmissione (TEM). I nostri dati sperimentali, sia pur preliminari, dimostrano che il TTO è in grado di causare rapidamente una modificazione della permeabilità di membrana alla quale segue un rallentamento della crescita associato ad alcune alterazioni morfologiche della cromatina. Si tratta di osservazioni originali ed inaspettate che meritano ulteriori indagini ed approfondimenti che sono in corso nei nostri laboratori.

FATTORE ANTI-LPS DA *PARIETARIA JUDAICA*

Angela Bonura (a), Daniela Giacomazza (c), Silvia Corinti (b), Gabriella Di Felice (b), Paolo Colombo (a)

(a) *Istituto di Biomedicina ed Immunologia Molecolare Alberto Monroy, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Palermo*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Istituto di Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Palermo*

La progressiva e rapida comparsa di microorganismi resistenti agli antibiotici attualmente in uso ha stimolato la ricerca di nuove molecole dotate di migliore efficacia terapeutica e, possibilmente, con un meccanismo d'azione diverso da quelli degli antibiotici oggi in commercio. Tra le molecole che sono state indicate come potenziali antibiotici innovativi vi sono i così detti Peptidi AntiMicrobici (AMP) dell'immunità innata. Si tratta solitamente di piccoli peptidi di dimensione compresa tra 10 e 50 amino acidi con caratteristiche generali comuni come la presenza di particolari residui e, più in generale, una carica netta positiva (pertanto definiti anche peptidi cationici). Negli ultimi anni, è stata associata a questa attività antibiotica diretta, anche una potente capacità immunomodulatoria per la quale tali peptidi sono in grado di contribuire al contrasto delle infezioni microbiche mediante meccanismi che sono indipendenti dall'uccisione diretta dei microorganismi e che hanno a che vedere con l'interazione con componenti delle membrane batteriche (ad esempio il LipoPoliSaccaride, LPS) neutralizzando il potente effetto infiammatorio indotto sulle cellule dell'ospite. In questa comunicazione descriviamo l'isolamento di una nuova molecola di origine vegetale con caratteristiche strutturali tipiche delle proteine cationiche. Le sue caratteristiche biologiche sono state studiate mediante l'utilizzo di un peptide sintetico derivato dalla sequenza originale. Tale peptide presenta la capacità di legare fortemente LPS da *Escherichia coli*. Saggi condotti su eritrociti e linee cellulari umane hanno dimostrato l'assenza di tossicità anche ad elevate concentrazioni. Sono state inoltre studiate le caratteristiche immunologiche di tale peptide mediante saggi di proliferazione di PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) umani e produzione di citochine pro-infiammatorie. Mediante test di inibizione è stata dimostrata la sua capacità di inibire il rilascio di IFN- γ sia da PBMC umani che da splenociti murini, suggerendo un ruolo importante per la realizzazione di nuovi farmaci di origine naturale per la cura dello shock settico.

ATTIVITÀ ANTIMICOTICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MENTHA SUAVEOLENS*

Letizia Angiolella (a), Elisabetta Vavala (a), Rino Ragno (b), Annarita Stringaro (c), Marisa Colone (c), Silvia Sivric (b), Gianni Sartorelli (b), Felicia Diodata D'Auria (a), Anna Teresa Palamara (a)

(a) Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica G. Sanarelli, Università degli Studi Sapienza, Roma,

(b) Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi Sapienza, Roma,

(c) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

In questi ultimi anni assistiamo ad un crescente interesse per lo studio di sostanze naturali estratte dalle piante, tra questi diversi oli essenziali vengono utilizzati sempre più spesso per risolvere problemi di diversa natura. Lo studio di molecole naturali ha acquisito un forte interesse a causa dello sviluppo sempre più diffuso di microrganismi resistenti ai farmaci utilizzati nelle terapie antinfettive. Tra i diversi microrganismi in grado di produrre ceppi farmaco-resistenti i funghi rappresentano un problema piuttosto rilevante per la difficoltà a reperire nuovi farmaci antimicotici. Sulla base di queste evidenze e nel tentativo di trovare nuovi oli essenziali da poter utilizzare come antimicotici, è stato utilizzato l'olio essenziale di *Mentha suaveolens* sia su cellule lievito come *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* che su diversi funghi filamentosi come *Trichophyton mentagrophytes*, e *Microsporum canis*. Per prima cosa è stata valutata la MIC e la MFC su tutte le specie fungine, in particolare per *C. albicans* sono stati eseguiti saggi di *time-killing*, l'inibizione della formazione del tubo germinativo, un importante fattore di virulenza. Inoltre, è stato valutato l'effetto dell'olio essenziale di *Mentha suaveolens* sulla formazione del biofilm sia con saggi *in vitro* che in microscopia elettronica. Lo studio condotto sulle diverse specie fungine ha messo in evidenza una forte attività fungistatica riportando dei valori di MIC molto bassi intorno allo 0,03% nei ceppi di *Cryptococcus neoformans*. Mentre l'attività antimicotica saggiata su ceppi di *C. albicans* di diversa provenienza e con differente sensibilità ai comuni farmaci antimicotici hanno evidenziato una buona risposta fungicida, una buona risposta ai tempi di *time-killing* ed una inibizione completa del tubo germinativo e della formazione di biofilm anche a concentrazioni estremamente basse. I risultati fin qui ottenuti incoraggiano ulteriori studi per la diffusione e l'utilizzo di queste sostanze in campo medico.

CLIMACOSTOLO: NUOVO ANTIBIOTICO?

Federico Buonanno (a), Maria Cristina Angelici (b), Claudio Orteni (a)

(a) *Dipartimento di Scienze dell'Educazione e della Formazione, Università degli Studi, Macerata*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il climacostolo è una tossina incolore contenuta negli estrusomi del protozoo ciliato eterotrico d'acqua dolce *Climacostomum virens*, che la utilizza come arma chimica contro predatori uni e pluricellulari. Quando nel 1999 la sostanza fu isolata da questo organismo, come estratto etanologico grezzo, risultò chiaro che essa esercitava una potente funzione tossica in particolare contro il ciliato predatore *Dileptus margaritifer*. Nello stesso anno fu quindi caratterizzata strutturalmente per essere successivamente sintetizzata chimicamente. Sulla base della sua struttura chimica il climacostolo viene classificato come un lipide resorcinolico (alchilresorcinolo o 5-alchilresorcinolo) la cui formula molecolare è stata definita sulla base di spettroscopia di massa ad alta risoluzione come $C_{15}H_{22}O_2$. Fino ad oggi, altri lipidi resorcinolici sono stati identificati ed estratti da piante, alghe e funghi, ma in un solo organismo appartenente al regno animale, una spugna marina del genere *Haliclona*. In effetti, da *Proteaceae*, *Anacardiaceae*, *Ginkgoaceae* e diverse specie di *Graminaceae* sono stati estratti più di 100 alchilresorcinoli risultati capaci di ridurre fortemente l'attività mutagenica indotta in colture di linfociti umani. I primi contributi scientifici sull'attività antitumorale di composti resorcinolici estratti da *Ginkgo biloba* risalgono al 1989 ed il contributo più recente, del 2008, descrive in dettaglio l'effetto di questi estratti sulla crescita di cellule di vari tipi di tumori umani. Sulla base di osservazioni preliminari è stato riportato che il climacostolo induce cambiamenti morfologici nei mitocondri delle cellule epatiche di ratto ed inibisce la catena respiratoria a livello del complesso I. Recenti studi hanno anche dimostrato che la tossina è capace di inibire la crescita di cellule tumorali umane inducendone l'apoptosi. Inoltre, è stata osservata un'attività tossica del climacostolo nei confronti di organismi complessi quali crostacei copepodi del genere *Cyclops* e del 5-n-pentadecenilresorcinolo, estratto da *Anacardium occidentale*, contro nematodi del genere *Dirofilaria*. In virtù di questi precedenti studi e delle proprietà terapeutiche unite ad una bassa tossicità descritte per altri lipidi resorcinolici, che sono già utilizzati nel trattamento di tumori ed infezioni nei mammiferi, abbiamo voluto sperimentare l'effetto della tossina di *C. virens* su colture *in vitro* del protozoo parassita *Toxoplasma gondii* per saggiarne, in prima istanza, la capacità parassiticida indirizzata, in particolare, nei confronti della crescita del parassita nella coltura stessa. Primi interessanti risultati ci inducono a proseguire questi studi anche in considerazione del fatto che il climacostolo è oggi disponibile come prodotto di sintesi e quindi facilmente ottenibile.

ATTIVITÀ DELLA LATTOFERRINA BOVINA SULL'INFEZIONE DA VIRUS INFLUENZALE

Agostina Pietrantonì (a), Eleonora Dofrelli (a), Antonella Tinari (a), Maria Grazia Ammendolia (a), Simona Puzelli (b), Concetta Fabiani (b), Isabella Donatelli (b), Fabiana Superti (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'influenza è una malattia respiratoria acuta che costituisce un rilevante problema di sanità pubblica a causa della sua ubiquità, contagiosità e per la variabilità antigenica del virus che ne è responsabile. La vaccinazione costituisce la principale misura di prevenzione dell'infezione ma la sua efficacia varia tra il 50% e l'80% a causa delle rapide mutazioni del virus. La terapia antivirale specifica per l'influenza non è in grado di bloccare completamente l'infezione e può avere effetti collaterali di tipo neurologico o indurre lo sviluppo di ceppi virali mutanti resistenti. Vi è quindi la necessità di individuare nuovi farmaci antivirali che siano in grado di bloccare l'infezione senza causare reazioni avverse. È noto che i bambini allattati al seno contraggono infezioni respiratorie in misura significativamente minore rispetto ai bambini allattati con latte artificiale. È stato dimostrato che l'attività protettiva del latte umano, per lungo tempo attribuita esclusivamente alla presenza di IgA secretorie, è mediata anche da altri componenti proteici, quali ad esempio la lattoferrina. La lattoferrina è una glicoproteina di circa 80 kDa appartenente alla famiglia delle transferrine dotata di attività immunomodulatoria e antimicrobica. Sebbene l'effetto antivirale della lattoferrina sia noto da numerosi anni, il meccanismo d'azione non è stato ancora completamente delucidato. In questa ricerca abbiamo analizzato l'effetto della lattoferrina bovina sull'infezione da virus influenzale di tipo A *in vitro*. I risultati ottenuti hanno mostrato che, nel nostro sistema sperimentale, l'infezione virale induce la morte cellulare per apoptosi e che il trattamento con lattoferrina è in grado di prevenire tale processo. In particolare i nostri studi hanno dimostrato che il trattamento con lattoferrina inibisce l'attivazione della caspasi 3 da parte del virus bloccando il trasporto della ribonucleoproteina virale dal nucleo al citoplasma. Il risultato finale è una significativa riduzione della morfogenesi virale. I nostri risultati, dimostrando che la lattoferrina può svolgere la sua azione antimicrobica agendo direttamente sulla cellula infetta, aggiungono nuove informazioni sul meccanismo della sua attività antivirale.

Sessione V

**Sostanze naturali:
le applicazioni cliniche**

Moderatori

Andrea Geraci, Fabio Facchinetti

COMPLESSITÀ IN NATURA E SALUTE UMANA

Andrea Geraci

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'entità umana è costituita da cellule che formano tessuti, organi, apparati. Siamo fatti, tra l'altro, di sinapsi, ormoni, linfociti. Siamo una rete di informazioni veicolate da citochine, da messaggeri. Secondo alcune recenti ricerche si potrebbe ipotizzare un ruolo centrale del linfocita T nel network neuro-endocrino-immunitario: il timo "manda" e "riceve" informazione nell'ambito dei sistemi nervoso, ghiandolare e immunitario. Siamo una rete complessa che sta in equilibrio attraverso retroazioni (*feedback*) positive e negative. Il benessere della persona dipende da numerosi fattori così come sottolinea l'Organizzazione Mondiale della Sanità: la salute è il risultato del benessere fisico, psichico e sociale. I motivi della perdita della salute vanno così ricercati negli agenti microbici, nelle cause fisiche, in una alterata attività del sistema immunitario, ma anche nell'ambito delle relazioni umane come l'eccessivo stress, un licenziamento, i problemi di coppia ecc., per non parlare degli errati stili di vita come sedentarietà, iperalimentazione, fumo, abuso di alcool e droga o la scarsa attenzione rivolta ai ritmi vitali (sonno-veglia, fame-sazietà ecc.). Sostanze naturali come il fitocomplesso, il latte, i sali minerali possono riequilibrare il sistema complesso umano attraverso un'azione modulata, "dolce". I sistemi medici strutturati, cioè quei sistemi terapeutici con proprie basi teoriche ed epistemologiche, sono approcci oggi considerati integrati (o integrabili) con la medicina scientifica occidentale. Bisognerebbe estrapolare le numerose conoscenze che si avvalgono anche di millenni di utilizzo pratico. Tali esperienze dovrebbero, senza essere stravolte nel loro nucleo epistemologico, essere inserite nella metodologia della *evidence-based medicine* e sottoposte alla valutazione dell'efficacia e della sicurezza: questo sforzo per ridurre il *gap* è dimostrato dal numero crescente di lavori scientifici pubblicati. Medicina tradizionale cinese, tibetana, ayurvedica o le più occidentali medicina omeopatica e antroposofica così come le medicine tradizionali del resto del mondo, Europa compresa, presentano tutte una grande potenzialità per l'acquisizione di conoscenze e non soltanto di carattere scientifico. Nella maggior parte delle "altre" medicine, la persona è vista in senso olistico nella sua complessità, nel senso che siamo tutti simili ma soprattutto unici, sottoposti all'influenza di numerosi fattori endogeni ed esogeni. C'è realmente un "Mondo" da studiare: dalle piante medicinali, all'influenza di particolari stili di vita e approcci alla vita. *Curcuma longa*, *Astragalus membranaceus*, *Ginkgo biloba*, *Viscum album*, sono piante oggi meno sconosciute e yoga, meridiani, agopuntura, diluizioni infinitesimali, mantra tibetani, approccio spirituale al malato sono diventati termini familiari anche presso la cultura di tipo occidentale.

STUDIO MODERNO DELLE PIANTE OFFICINALI: LE PIANTE ADATTOGENE

Mauro Serafini

Dipartimento di Biologia Vegetale, Università degli Studi Sapienza, Roma

Per lungo tempo sono state indicate con il termine "Panacea" (dal greco *pan* tutto e *axos* rimedio, ossia rimedio per tutti i mali), le droghe che avevano un effetto generalizzato. Nella mitologia greca Panacea era la figlia di Esculapio e Epione, in grado di curare da ogni male qualsiasi essere vivente. Dallo studio delle medicine orientali e da studi farmacologici negli ultimi trent'anni, si sono evidenziati una serie di rimedi vegetali, definiti adattogeni, con un impiego non destinato ad un singolo organo bersaglio o ad una singola patologia. Il termine adattogeno fu coniato la prima volta nel 1947 da N.B. Lazarev, un farmacologo, che così descrisse gli effetti inattesi del dibazol (2-benzilbenzimidazol) un dilatatore arterioso sviluppato in Francia. Questa molecola aumentava le difese dell'organismo contro lo stress in studi sperimentali. Brekhman nel 1988 diede la prima definizione di criteri con i quali definire una pianta adattogena: Adattogeno è un principio attivo o droga in grado di aumentare le resistenze aspecifiche e le difese dell'organismo nei confronti di fattori di stress. Questo ha comportato un cambiamento notevole nell'approccio allo studio delle piante officinali. Infatti si è dovuto iniziare uno studio dell'azione delle piante medicinali a livello biochimico e biologico-molecolare, cercando di capire se gli effetti farmacologici ed il modo di azione a livello biochimico degli adattogeni possono essere spiegati da regole generali. Verranno illustrati i passi sperimentali seguiti dalle ultime ricerche nel campo.

PROBLEMATICHE FARMACOGNOSTICHE NEGLI STUDI CLINICI SUI PRODOTTI A BASE DI PIANTE MEDICINALI E LORO DERIVATI

Gabriela Mazzanti

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia, Università degli Studi Sapienza, Roma

I preparati naturali, in particolare quelli ottenuti da piante medicinali, hanno rappresentato storicamente la principale risorsa terapeutica. In seguito all'isolamento dei principi attivi e alla loro sintesi chimica l'uso dei preparati totali, almeno nei paesi industrializzati, è stato in gran parte abbandonato in favore del farmaco monomolecolare, ma negli ultimi decenni ha recuperato un notevole interesse. I prodotti a base di piante medicinali sono stati impiegati per secoli soprattutto sulla base delle indicazioni fornite dalla medicina tradizionale, rivelatesi spesso prive di fondamento scientifico. Nel terzo millennio un uso empirico non è accettabile ma è possibile solo un impiego basato sull'evidenza scientifica, ovvero validato da studi clinici che dimostrino l'efficacia del prodotto. La valutazione dell'efficacia dei preparati a base di piante medicinali è oggi oggetto di numerosi studi, che tuttavia, in proporzione al numero di prodotti impiegati, sono ancora scarsi. Tali studi inoltre soffrono spesso di problemi metodologici, legati al disegno sperimentale ma spesso connessi al particolare tipo di prodotto oggetto dell'indagine. Un preparato a base di piante medicinali ha infatti, a differenza di un medicinale monomolecolare, una composizione per sua natura complessa, contenendo non una ma decine di molecole. Tale composizione è inoltre anche variabile, in funzione di una serie di fattori che riguardano la droga di partenza (l'età della pianta, l'habitat, il momento della raccolta, il metodo di essiccamento, ecc.) ma soprattutto il suo metodo di preparazione (polverizzazione, estrazione con solventi diversi e/o con tecniche diverse, metodi di arricchimento degli estratti, ecc.). La variabilità della composizione di un prodotto implica una variabilità della sua attività biologica e quindi pone il problema della bioequivalenza. Tale problema può essere superato, almeno in parte, mediante la standardizzazione, che definisce tutti gli *step* che portano dalla materia prima (la pianta medicinale) al prodotto finito. Standardizzare un prodotto vegetale è un procedimento molto complesso e laborioso ma rappresenta una condizione indispensabile per un approccio scientifico al suo studio e al suo impiego. Nella sperimentazione clinica sui prodotti a base di piante medicinali e loro derivati è fondamentale utilizzare preparati con composizione quali-quantitativa costante o, quantomeno paragonabile: diversamente i risultati ottenuti nei vari studi saranno difficilmente confrontabili tra loro e validi esclusivamente per lo specifico prodotto esaminato.

LA FITOTERAPIA TRADIZIONALE CINESE TRA PERSONALIZZAZIONE ED EVIDENCE-BASED MEDICINE

Emilio Minelli

Centro Collaborante OMS per la Medicina Tradizionale, Università degli Studi, Milano

La fitoterapia tradizionale cinese costituisce una parte integrante del *corpus* dottrinale della Medicina Tradizionale Cinese, di cui condivide i principi e i sistemi classificativi classici: lo yin/yang, i cinque movimenti, i cinque sapori, le quattro destinazioni, i meridiani destinatari. Nelle Materie Mediche tradizionali, dunque, le piante medicinali vengono classificate in base a codici descrittivi delle qualità di ogni pianta (sapore, natura, luogo di azione nell'organismo, azioni energetiche). Ciò non ha impedito lo sviluppo, in tempi più recenti, di una robusta documentazione, basata su moderni codici analitico/quantitativi, dei loro numerosi componenti. Ancora oggi le antiche formule della fitoterapia tradizionale vengono prescritte secondo una metodologia, che vede l'associazione di più piante in una stessa formulazione per ottenere differenti effetti terapeutici, spesso complementari. Nelle prescrizioni tradizionali possiamo così trovare associati l'Imperatore, la pianta diretta al trattamento della causa principale della malattia, il Ministro, che sviluppa una azione sinergica di potenziamento, l'Assistente, che corregge l'azione del farmaco Imperatore, mitigandone, per esempio, gli effetti collaterali, l'Ambasciatore, con funzione di armonizzazione dei differenti rimedi e di indirizzo della azione dei farmaci principali al luogo sede del disturbo. Questa modalità prescrittiva dei farmaci è, peraltro, funzionale alla idea secondo cui il trattamento di una determinata malattia deve, da un lato, prevedere il trattamento della malattia ma, dall'altro, deve consentire l'adattamento della cura alle variabili specifiche di ogni paziente. Così, per esempio, secondo la visione tradizionale, nel trattare la menopausa dovremo sia tenere conto del quadro nosografico comune sia delle variabili che fanno sì che ogni donna tende ad avere la sua menopausa e che, all'interno dell'universo femminile, si possono individuare alcune categorie di donne con sintomi più omogeneamente raccolti in alcuni quadri specifici rispetto ad altre. Avremo così menopausa caratterizzate da sintomi dovuti a deficit prevalente del Rene yin, altre collegate a deficit del Rene yang, altre ancora collegate a deficit dello yin di Rene e Fegato, ecc. Senza dubbio, queste modalità prescrittive hanno reso più difficile lo sviluppo di studi clinici per lo studio della efficacia dei vari composti, tuttavia è certo che questa tendenza alla personalizzazione della cura dovrebbe essere considerata una risorsa da preservare accanto alla necessaria implementazione della ricerca classica. Da come questa ricerca, molto sviluppata in Cina e sensibile ormai anche ad aspetti quali la genomica, la chemomica, ecc., saprà coniugare la necessità di standardizzazione alle antiche istanze di personalizzazione dipenderà, in gran parte, l'aspetto che la fitoterapia tradizionale cinese avrà nel futuro.

LA FARMACOPEA AYURVEDICA COME FONTE DI SOSTANZE NATURALI PER LA PRATICA CLINICA

Edoardo Di Leginio
Maharishi Vedic University, Terni

La Medicina Ayurvedica è il più antico sistema di medicina conosciuto ed è considerata la matrice da cui sono derivate tutte le medicine successive. L'Ayurveda Maharishi è una revisione moderna dell'Ayurveda tradizionale alla luce delle conoscenze della nostra era scientifica. Le malattie viste dall'ottica dell'Ayurveda assumono una dimensione olistica e ci suggeriscono nuove prospettive di trattamento e terapia. Le prime codificazioni scritte dell'Ayurveda risalgono a più di 2.000 anni fa. Esse descrivono un sistema di medicina fondato su una propria cosmologia nell'ambito della quale viene descritta la fisiologia umana normale, la malattia e le cause che la generano. L'Assunto fondamentale su cui si basa l'Ayurveda è che tutta la realtà non sia altro che espressione della coscienza. Alla base della malattia c'è un errore fondamentale chiamato errore dell'intelletto che genera nelle sue varie espressioni ogni malattia. Come la coscienza genera la realtà così anche genera le malattie e gli strumenti per curarle. È la conoscenza delle dinamiche autoreferenti della coscienza che porta alla individuazione di sostanze vegetali, minerali e animali utili per curare. Quindi le piante medicinali, le resine, gli olii, i minerali non sarebbero altro che concretizzazioni della coscienza del medico che "vede" la realtà e attraverso le sostanze curative che usa, ricomponi il mosaico del malato che aveva perso di integrità reale a causa della malattia. Partendo da questi principi si è sviluppata una ricerca empirico-fenomenologica di sostanze medicinali e una applicazione pratica di queste che si sono protratte nei secoli ed hanno selezionato attraverso un meccanismo che potremmo dire darwiniano dei preparati molto efficaci e praticamente privi di effetti collaterali. Le sostanze individuate nei secoli sono moltissime e provenivano sia dall'India che dall'esterno. Un contributo particolare è stato dato dalle conoscenze mediche arabe portate con l'invasione dell'India da parte degli islamici intorno all'anno 1.000. Ma l'accezione più pura della farmacopea ayurvedica è considerata quella dei testi originali che consideravano solo sostanze di origine vegetale e qualche minerale e sostanza di origine animale. Nei preparati ayurvedici quasi mai si utilizzano piante singole ma più spesso complessi di piante e sostanze composte anche da alcune decine di principi. I laboriosi processi a cui sono sottoposti molto spesso generano medicinali i cui effetti sono molto di più che la somma prevedibile delle varie sostanze usate. Lo studio di questi preparati con metodiche analitiche di origine occidentale è molto attraente perché pone di fronte a dati di fatto, generati dall'esperienza, che molto spesso costituiscono una sfida ma anche una fonte di "novità" nell'ambito del complesso campo di ricerca di nuovi principi per la terapia.

TERAPIA COMPLEMENTARE ONCOLOGICA CON *VISCUM ALBUM*; DALLA TRADIZIONE ALLA RICERCA SCIENTIFICA

Walter Legnani
Società Italiana di Medicina Antroposofica, Milano

L'introduzione del *Viscum album* come terapia antineoplastica risale agli anni 1920-24 in base all'indicazione di Rudolf Steiner. La ricerca di laboratorio ha reso noti sempre di più i componenti attivi del farmaco: viscotossine, lectine, polisaccaridi e altri. Sono stati dimostrati i seguenti effetti: attività sul sistema immunitario (Linfociti T e B, linfociti NK, monociti, macrofagi, cellule dendritiche, granulociti, citochine); effetti antitumorali diretti in modelli animali; potenziale azione citotossica/antiproliferativa; fattori favorevoli all'apoptosi; stabilizzazione del DNA; inibizione dell'angiogenesi; assenza di stimolo alla crescita in linee cellulari di linfoma NH e leucemia linfatica. Nella visione steineriana il tumore è un processo che coinvolge tutte le parti costitutive della persona (gli aspetti fisici e funzionali ma anche quelli psichici e spirituali), espressione di una disarmonia tra esse. Il *Viscum album* è in grado di agire sul piano fisico e metabolico, ma anche sull'uomo superiore. Gli effetti nell'uso terapeutico *in vivo* possono essere:

- miglioramento delle condizioni cliniche generali;
- rallentamento della crescita tumorale;
- attenuazione del dolore neoplastico;
- migliore qualità di vita (favoriti l'appetito, il sonno, il benessere generale);
- miglioramento del tono dell'umore, azione antidepressiva;
- stimolo delle difese immunitarie e quindi riduzione delle infezioni;
- migliore tollerabilità della chemioterapia e radioterapia qualora proposte come modalità terapeutica.

L'azione del *Viscum album* può essere definita come un apporto di calore e di luce. Il primo aspetto viene percepito maggiormente sotto l'aspetto fisico (aumento della temperatura corporea). La luce rappresenta invece un aspetto prevalentemente psichico-spirituale, da cogliere in un approccio al paziente aperto a nuove modalità di osservazione, a una nuova semeiotica. Qual è dunque il ruolo di questo preparato nella terapia oncologica oggi? Definiamo questo ruolo come "complementare", non "alternativo" alle terapie ufficiali, queste ultime in verità a volte eccessive e inappropriate rispetto a una seria valutazione costi-benefici. La letteratura sul *Viscum album* conta ormai centinaia di lavori. Prevalgono lavori retrospettivi di coorte anche su vaste casistiche, indicativi di significativi vantaggi sulla qualità della vita e in qualche caso anche sulla sopravvivenza (cfr. recenti lavori del 2007 su carcinoma del colon-retto e pancreas). Non mancano e sono tuttora in corso in Europa e anche in Italia lavori prospettici randomizzati su diverse patologie, a testimonianza della volontà di arricchire la conoscenza di questo preparato in base a una corretta metodologia scientifica.

ALIMENTAZIONE E FITOTERAPIA: UN APPROCCIO NATURALE ALLE DISLIPIDEMIE

Roberto Miccinilli
Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

L'ipercolesterolemia e l'ipertrigliceridemia sono indubbiamente le due forme più frequenti di dismetabolismo che oggi si presentano al medico di famiglia e allo specialista. Certamente, almeno in grandissima parte, legate ad una scorretta alimentazione, alla vita sempre più sedentaria, allo stress, risultano essere tra i fattori di rischio predominanti nella eziopatogenesi delle patologie cardiovascolari più drammatiche, come l'ictus cerebrale e l'infarto miocardico. Il protocollo classico di trattamento delle dislipidemie ha finora dato una importanza relativa alla modifica delle abitudini alimentari, al recupero del peso forma e ai benefici di una equilibrata attività motoria, limitandosi spesso al solo uso di farmaci anti-dislipidemici, in particolare alle statine di sintesi, spesso prescritte al paziente senza una specifica, necessaria indicazione e che talvolta sono state causa di effetti collaterali spiacevoli, soprattutto per trattamenti di lunga durata. L'approccio naturale alle dislipidemie dà, invece, un ruolo predominante all'aspetto nutrizionale, con l'applicazione di protocolli alimentari che spesso sono, da soli, sufficienti a risolvere il problema, senza la necessità di medicalizzare il paziente, anzi responsabilizzandolo. Solo dopo un eventuale insuccesso di questi primi presidi terapeutici, si può intervenire con l'aggiunta di prodotti fitoterapici, dai più semplici fino a quelli più specifici, partendo dai prebiotici, dai fitocomplessi ad azione colagogo-coleretica, fino ai policosanoli della canna da zucchero e al *Monascus ruber*, vera e propria statina naturale derivante dalla fermentazione del riso rosso, che presenta un meccanismo d'azione e una efficacia terapeutica praticamente sovrapponibile a quello delle statine sintetiche. I risultati fin qui ottenuti sono molto stimolanti per ulteriori approfondimenti.

ACIDO FOLICO E MYO-INOSITOLO PER UNA PREVENZIONE TOTALE DEI DIFETTI DEL TUBO NEURALE

Vittorio Unfer (a), Pietro Cavalli (b)

(a) *Università degli Studi Sapienza, Roma*

(b) *Servizio di Genetica, Ospedale di Cremona, Cremona*

I Difetti del Tubo Neurale (*Neural Tube Defects* - NTDs) avvengono quando si verifica un fallimento della chiusura del tubo neurale embrionale durante la terza e quarta settimana di gestazione. La loro incidenza è compresa tra lo 0,5 e il 2 per 1.000 gravidanze. L'Acido Folico (FA) si è dimostrato altamente efficace nel prevenire i difetti del tubo neurale. Studi clinici randomizzati condotti in Inghilterra e in Ungheria hanno dimostrato che la somministrazione precoce in gravidanza di acido folico è in grado di prevenire circa il 70% dei difetti del tubo neurale ricorrenti ed ha un significativo effetto preventivo sulla prima comparsa dei NTDs. Molti autori concordano che una grande parte, probabilmente il 30%, dei NTDs può non rispondere alla terapia con Acido Folico. In questi casi Acido Folico Resistenti vi è una sempre maggiore evidenza che suggerisce che un'altra molecola, chiamata inositolo, può essere necessaria per la chiusura del tubo neurale. Le evidenze comprendono:

- la carenza di Inositolo è l'unica carenza "vitaminica" che determina NTDs nel topo;
- concentrazioni significativamente più basse di Inositolo, rispetto alla gravidanza normale, sono presenti nel sangue delle madri il cui feto è affetto da NTDs;
- la supplementazione di Inositolo in topine gravide riduce significativamente la frequenza di NTDs;
- in un *case report*, una donna ha assunto 0,5 g di Inositolo al giorno nel corso del primo trimestre della sua terza gravidanza, dopo che le due precedenti gravidanze erano state interrotte a causa di NTDs (nonostante la paziente avesse comunque assunto Acido Folico in entrambi). La terza gravidanza è esitata positivamente, ed è nato un neonato sano. Successivamente altre quattro donne a rischio di avere una gravidanza affetta da NTDs (con una anamnesi positiva per pregressa gravidanza affetta da NTDs) hanno ricevuto 0,5 g di Inositolo e tutti i neonati sono nati sani;
- sarebbe auspicabile che in tutte le gravidanze venissero somministrati 400 mcg di Acido Folico e 100 mg di myo-inositolo al fine di prevenire quella che ancora oggi rappresenta la malformazione più frequente nella specie umana.

MICRODOSI

Marcella Saponaro
Università degli Studi Tor Vergata, Roma

È possibile utilizzare un farmaco in dosi minime ottenendo lo stesso effetto terapeutico voluto? La ricerca del Dottor Eugenio Martinez dimostra che questo è possibile, confortato anche dall'esperienza oramai ventennale di migliaia di medici in vari paesi dell'America Latina. Questa ricerca apre uno scenario interessante nel campo medico e nel concetto stesso di dosaggio farmacologico. Le microdosi sono diluizioni ponderali di rimedi terapeutici (farmaci, tinture madri di pianta fresca, oli essenziali), che riducono anche di 1.000 volte le dosi abituali utilizzate. Essi ottengono i medesimi effetti terapeutici ma sono privi degli effetti secondari abituali; inoltre non producono alcuna dipendenza. La preparazione è molto semplice, di basso costo e non richiede strumenti particolari. È a tutti gli effetti una preparazione galenica, che i farmacisti possono preparare su ricetta medica. Non sono omeopatici (siamo al di sopra dello 0 di Avogadro), sia per la presenza del principio attivo, sia per la mancanza del criterio diagnostico del simile, sia per il veicolo diverso. La tecnica di Martinez, con i suoi ottimi risultati a livello clinico, mostra che esiste una dose minima efficace, capace di ottenere la stimolazione dei recettori specifici, oltre alla quale è inutile, se non addirittura dannosa. Per questi rimedi si suppone valido il meccanismo d'azione della Via Breve, che utilizza l'asse neuromonale e che attraversa il nucleo paraventricolare ipotalamico per arrivare agli organi bersaglio. L'applicazione delle Microdosi potrebbe portare un contributo notevole alla riduzione delle numerose malattie iatrogene, ad una migliore gestione delle cure a lunga durata o nelle situazioni socialmente difficili (pensiamo all'impegno sanitario nei Paesi del Terzo Mondo). Oltre a una riduzione delle spese sanitarie, si può avere anche una migliore gestione degli effetti di dipendenza farmacologica. Nel campo fitoterapico si può prevenire l'esaurimento e l'uso massivo di varie specie ma soprattutto si apre lo scenario di un uso orale sempre più allargato degli oli essenziali (finora visto con molta prudenza). In America Latina i risultati clinici sono così rilevanti che oramai migliaia di medici le utilizzano nelle varie strutture pubbliche, con diverse applicazioni (antidolorifici, antibiotici, psicofarmaci, antinfiammatori, ecc.). Per la prima volta, grazie al libro "Microdosi", se ne parla ampiamente anche qui in Italia!

ACQUISIZIONI IN CAMPO ONCOLOGICO SULL'AZIONE TERAPEUTICA DI FUNGHI EPIGEI. ANALISI EPIDEMIOLOGICA E FENOMENOLOGICA

Maurizio Bagnato
Azienda Sanitaria Locale RMC, Roma

I funghi superiori sono stati utilizzati dal genere umano da millenni, inizialmente in ambienti rurali ed a fini di integrazione nutrizionale, successivamente, con il migliorare delle condizioni di vita e di alimentazione, sono entrati nelle diete perlopiù per meriti culinari. Usi medicinali sono noti fin dall'antichità, sia in occidente che, soprattutto, in oriente ed in particolare sulle malattie cronico-degenerative. Nella pratica medica tradizionale asiatica ma anche nella medicina moderna nei paesi come Cina, Giappone e Corea ed altri ancora, si usano i funghi nel trattamento delle più importanti malattie. Gli antichi e tradizionali usi medici sono in via di conferma dalla ricerca clinica ed i Metaboliti Biologicamente Attivi (*Biologically Active Metabolites* - BAM) dei funghi Basidiomiceti sono oggetto di una intensa ricerca scientifica a livello mondiale. Secondo la letteratura oltre 270 funghi medicinali sono riportati nella Medicina Tradizionale Cinese per i loro effetti preventivi e/o curativi. Se la Cina è stata la culla storica sull'uso dei funghi medicinali, in Giappone vi sono state le maggiori evidenze scientifiche ed epidemiologiche soprattutto in campo oncologico ad iniziare dai funghi *Flammulina velutipes* e *Agaricus blazei murrill*. Tornando all'occidente, è da citare l'uso popolare nella cura dei tumori nei paesi dell'est europeo dell'*Inonotus obliquus* più noto come Chaga. L'uso dei funghi con potenzialità terapeutiche, in seno alla comunità scientifica internazionale, ha suscitato enorme interesse per due ordini di motivi: primo, proprio perché i funghi hanno dimostrato la loro efficacia verso numerose malattie cronico degenerative; secondo, i BAM isolati e purificati, ottenuti dalle diverse parti del fungo e con diverse metodologie, quali (polifenoli, polisaccaridi, proteine legate a polisaccaridi-proteoglicani-, sesquiterpeni, terpenoidi), richiedono procedure analitiche comuni e poco costose, elevando i funghi come i migliori e più vantaggiosi candidati a farmaci. Tra le altre attività dimostrate, quella antitumorale può essere di tipo citotossico diretto, stimolante l'apoptosi cellulare e le cellule N.K., anti mitogenica, inibitoria della neo angiogenesi e della cisteina proteasi ecc ecc. I BAM confermati più frequentemente sono i beta D glucani, i proteoglicani, gli steroli ed i triterpenoidi. L'applicazione nella terapia oncologica è stata studiata su circa 50 specie tra le quali: *Coriolus versicolor*, *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* e *Albatrellus spp*, *Omphalotus illuden*, *Clitocybe nebulari*, *Ganoderma lucidum*, *Pholiota spumosa*, *Agaricus blazei murrill*, *Phellinus linteus*, *Schizophyllum commune*, *Poria cocos*. Per ultimo il *Pleurotus ostreatus* dove si è recentemente dimostrata attività antitumorale su animali da esperimento e che, per i BAM presenti, per il complesso delle sue azioni, e la facile reperibilità anche fresco (è il fungo maggiormente coltivato), potrebbe dimostrarsi uno dei presidi di prevenzione e cura nella sanità pubblica e per le malattie cronico degenerative tra i più importanti nei prossimi anni.

RHODIOLA ROSEA L.: PROMETTENTE SUPPORTO PER IL TABAGISMO. DATI PRECLINICI

Marina Perfumi, Laura Mattioli
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi, Camerino, Macerata

Il tabagismo è oggi considerato a livello mondiale uno dei maggiori problemi di salute e rappresenta, probabilmente, una delle principali e più diffuse forme di dipendenza da sostanze di abuso. La nicotina, principale responsabile degli effetti comportamentali del fumo, esercita i suoi effetti gratificanti attraverso l'attivazione dei recettori nicotinici centrali, i quali determinano poi l'attivazione di molteplici sistemi neuronali (dopaminergico, serotoninergico, noradrenergico) ampiamente coinvolti nei processi di *reward*. Sia nell'uomo che nell'animale la sospensione del consumo di nicotina induce una sindrome di astinenza, caratterizzata principalmente da ansia, depressione, stress, aumento del peso corporeo, fattori determinanti nel processo di ricaduta e mantenimento del vizio. L'identificazione di trattamenti in grado di eliminare o, comunque, di ridurre il consumo di tabacco, rappresenta ancora oggi un'importante sfida per la medicina. I pochi farmaci di cui oggi disponiamo e i differenti approcci terapeutici basati sul *nicotine replacement* sono accompagnati da notevoli effetti collaterali e talvolta da scarsa efficacia. Di qui la necessità di individuare nuove strategie. *Rhodiola rosea* L., *Crassulacea* perenne diffusa nelle regioni nordiche dell'Asia e dell'Europa, è largamente impiegata dalla medicina tradizionale nel trattamento di depressione, ansia, stress ed affaticamento fisico. Molti degli effetti centrali della rodiola, sembrano essere attribuiti alla capacità della droga di modulare i livelli e le attività di monoammine biogene (catecolamine, serotonina, dopamina), del fattore di rilascio corticotropo (principale mediatore dello stress) e dei peptidi oppioidi. Con il presente studio si è voluto valutare, *in vivo*, se il trattamento con un estratto idroalcolico di radice di *R. rosea* L. (RHO; EPO S.r.l., Milano) potesse sia prevenire lo sviluppo della dipendenza da nicotina che contrastare l'insorgenza dell'astinenza. Pertanto topi maschi CD1 (b.w. 30-35 g) hanno ricevuto s.c. somministrazioni ripetute di nicotina (2 mg/kg), 4 volte al giorno per 8 giorni consecutivi. Contemporaneamente al trattamento con nicotina, gli animali hanno ricevuto giornalmente per via orale RHO alle dosi di 10, 15, 20 mg/kg. Un ulteriore gruppo di animali, resi dipendenti da nicotina, ha ricevuto RHO (20 mg/kg) solamente durante l'instaurarsi della sindrome. La sindrome di astinenza è stata valutata 20 h dopo l'ultima somministrazione di nicotina, attraverso l'analisi dei principali segni somatici (*jumping, rearing, body tremor, chewing, genital licking, scratching*), dell'attività locomotoria e dell'ansia (*light/dark test*). I dati ottenuti hanno evidenziato come il trattamento con RHO, in maniera dose dipendente, sia in grado di prevenire l'instaurarsi della dipendenza e di contrastare l'insorgenza della sindrome d'astinenza da nicotina.

RUOLO DI COMPOSTI NATURALI COME IL COENZIMA Q10 NELLA TERAPIA DELLA NEUROTOSSICITÀ ASSOCIATA AL PARKINSON

Ashraf Virmani (a), Angela Koverech (b), Giovanni Laviola (b)

(a) *Scientific & Medical Affairs, Sigma-Tau, Rome, Italy and European Mind & Metabolism Association (EMMA), London, United Kingdom*

(b) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il Coenzima Q10 (CoQ10) è un componente dei processi antiossidanti che proteggono la membrana cellulare dal danno ossidativo e riduce l'apoptosi. CoQ10 è presente naturalmente nei cibi di natura vegetale, quali spinaci, fagioli, semi di soia e oli vegetali. L'attività catalitica di CoQ10 nel trasferimento degli elettroni e la traslocazione dei protoni a livello mitocondriale contribuisce in modo essenziale alla sintesi di ATP e all'attività bioenergetica della cellula. Si ritiene che nella eziopatogenesi della sindrome di Parkinson (PD) siano coinvolti carenze a livello biochimico e una ridotta produzione di energia in associazione con un'aumentata produzione di radicali liberi. Tra i fattori di rischio si includono l'età, l'ereditarietà, fattori ormonali e l'esposizione a tossici ambientali. A livello molecolare sono coinvolte nella patogenesi una serie di disfunzioni a livello mitocondriale e nei lipidi di membrana. Noi abbiamo esaminato il ruolo possibile antiossidante e nella catena respiratoria del cofattore, CoQ10, valutandone la capacità di protezione nei riguardi della neurotossicità associata alla inibizione del complesso mitocondriale II. I risultati indicano un ruolo di protezione da parte dell'acetyl-L-carnitina dalla neurotossicità conseguente all'esposizione a MPP+ (MPTP, 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine) o al rotenone valutata in diversi modelli, cellule PC12 (NGF-differentiated) o in colture primarie corticali. Ulteriori studi su cellule IMR32 hanno evidenziato una riduzione importante da parte di CoQ10 (5 μ M) nei riguardi della tossicità indotta dalla inibizione di succinate dehydrogenase (SDH) complex II da parte di 3-nitropropionic acid (3-NPA). Questi risultati suggeriscono che il potenziamento del metabolismo energetico mitocondriale da parte di CoQ10 può prevenire la neurotossicità associata a processi di disfunzione mitocondriale.

Sessione VI

Profilo di sicurezza e aspetti regolatori

Moderatori

Annarita Meneguz, Velio Macellari

REAZIONI AVVERSE DA PRODOTTI DI ORIGINE NATURALE: IL SISTEMA NAZIONALE DI SORVEGLIANZA

Francesca Menniti-Ippolito

Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione. Le preparazioni a base di piante officinali hanno proprietà farmacologiche e non sono esenti da rischi. È importante valutare la loro sicurezza, a fronte di scarsa evidenza di efficacia. Infatti, il profilo beneficio/rischio per la maggior parte di questi prodotti non è generalmente definito. La consapevolezza dei possibili rischi associati ai prodotti della "medicina naturale" hanno portato alla implementazione di un sistema di sorveglianza delle loro reazioni avverse. Gli obiettivi della sorveglianza sono: migliorare la conoscenza sulle reazioni avverse a prodotti a base di piante officinali o "naturali"; sensibilizzare gli operatori sanitari sull'utilizzo di prodotti naturali da parte dei loro pazienti e gli utilizzatori ad un corretto utilizzo di tali preparati.

Metodi. Il sistema raccoglie le segnalazioni spontanee associate a qualsiasi tipo di prodotto "naturale" (piante medicinali, integratori alimentari, prodotti omeopatici, minerali, prodotti derivati da animali, ecc.). Le reazioni avverse possono essere segnalate, tramite una scheda appositamente predisposta (scaricabile dal sito www.epicentro.iss.it), all'Istituto Superiore di Sanità.

Risultati. Da aprile 2002 ad agosto 2008 sono pervenute 315 segnalazioni. Le segnalazioni hanno riguardato prevalentemente eventi gravi: nel 34% dei *report* è stata indicata una ospedalizzazione, nel 6% l'evento aveva messo in pericolo la vita del paziente e sono stati riportati 3 decessi. Le segnalazioni riportavano principalmente patologie gastrointestinali, della cute e del tessuto sottocutaneo, disturbi psichiatrici, patologie del sistema nervoso e patologie del fegato. Nel 34% dei *report* è stato riportato l'uso concomitante di farmaci convenzionali. Hanno segnalato medici ospedalieri (40%), farmacisti (23%), medici di medicina generale (17%), specialisti (8%), erboristi (2%). In generale, le segnalazioni hanno evidenziato: problemi di adulterazione o contaminazione dei prodotti utilizzati; rischi associati a l'uso tradizionale di alcune piante; problemi con l'uso di prodotti di importazione; rischi di interazione con farmaci convenzionali.

Conclusioni. In seguito alla individuazione di particolari segnali di rischio sono stati presi provvedimenti regolatori di sospensione della commercializzazione di alcuni prodotti. Ci sono senz'altro carenze nella regolamentazione dei prodotti che sono per lo più commercializzati come integratori alimentari, anche quando vengono utilizzati a scopo terapeutico. In generale il sistema ha permesso di mettere in evidenza reazioni gravi, segnali nuovi e conferma di segnali già noti. Occorre aumentare la consapevolezza degli operatori sanitari e dei cittadini sui possibili rischi associati all'utilizzo di prodotti, che in quanto naturali sono considerati sicuri, e sulla necessità di limitare l'automedicazione e di rivolgersi a personale sanitario informato sui possibili benefici e sui rischi dei prodotti della medicina naturale.

SMART-DRUGS: ASPETTI ANALITICI FARMACOTOSSICOLOGICI E LEGISLATIVI

Roberta Pacifici, Simona Pichini

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Con il termine *smart-drugs*, il cui nome significa letteralmente "droghe furbe", si intendono tutta una serie di composti sia di origine naturale (vegetale) che sintetica che contengono vitamine, principi attivi di estratti vegetali, tra cui i più diffusi sono l'efedrina, la caffeina, la taurina ma anche sostanze con caratteristiche allucinogene. Le *smart-drugs* promettono di aumentare le potenzialità cerebrali, la capacità di apprendimento e memoria nonché di migliorare le *performance* fisiche di chi le assume ed anche di fornire effetti psichedelici di "visioni sensoriali ed allucinogene" particolari, percezioni, sensazioni, emozioni e processi mentali in genere. Attualmente esiste una grande confusione legata alla terminologia delle *smart-drugs*: si parla infatti contestualmente di droghe vegetali, droghe etniche, droghe etnobotaniche, droghe naturali, biodroghe, ecc. Per taluni il termine *smart-drugs* indica tutta una serie di bevande energetiche o pastiglie stimolanti (che tentano di simulare l'effetto dell'ecstasy) che assicurano effetti eccitanti pur rimanendo nella legalità (caffèina, ginseng, ecc.): vengono proposte e consumate soprattutto in ambienti giovanili (discoteche, *rave party* ecc.). Per altri le *smart-drugs* si confondono molto più con le droghe naturali o droghe etniche, confinando il loro consumo ad ambienti più alternativi rispetto alla discoteca. In realtà, sembrerebbe che l'espressione prenda origine dal fatto che le *smart-drugs* sono le "droghe furbe" perché non perseguite o perseguibili dalla legge, in quanto non presenti come tali o come principi attivi in esse contenuti nelle tabelle legislative delle corrispondenti leggi che proibiscono l'uso di sostanze stupefacenti e psicotrope. L'*E-commerce* permette inoltre di reperire una vasta gamma di prodotti: non solo *smart-drugs* di origine vegetale a prezzi concorrenziali rispetto a quelli degli *smart-shops*, ma anche prodotti di sintesi quali le fenilettilamine, le benzilpiperazine o i derivati della triptamina. Il Reparto Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping dell'Istituto Superiore di Sanità ha eseguito a partire dall'anno 2003, su ordine del Ministero della Salute più di 500 analisi chimiche quali-quantitative e valutazioni farmacotossicologiche su reperti provenienti da sequesti dei NAS e delle Procure di varie province italiane. A tal proposito, ci si è occupati della messa a punto di metodologie di analisi dei principi attivi contenuti nelle preparazioni vendute come *smart-drugs*; dello studio della proprietà farmacologiche ed effetti secondari conseguenti all'assunzione di *smart-drugs* ed infine degli studi degli effetti sul SNC ai fini dell'inquadramento nelle tabelle secondo il DPR 309 del 1990.

LA SICUREZZA IN FITOTERAPIA CLINICA

Fabio Firenzuoli, Luigi Gori, Cristina Cortese, Vittorio Mascherini, Eugenia Gallo
*Centro di Riferimento per la Fitoterapia, Regione Toscana, UO Medicina Naturale,
Ospedale S. Giuseppe, Empoli, Firenze*

La fitoterapia clinica si occupa del paziente, con tutte le sue problematiche e nei suoi vari aspetti, prima ancora che della pianta medicinale o del prodotto. Fondamentale è per noi ascoltare il paziente, con i suoi quesiti clinici, i suoi problemi e la sua storia: conoscere le sue abitudini alimentari oltre che farmacologiche entra a far parte necessariamente dell'anamnesi, al pari della visita medica. La maggior parte dei nostri pazienti arriva quando già si è rivolto a pratiche popolari o erbe o preparazioni che appartengono alla tradizione, by-passati i professionisti del settore. Scarsa è la percezione del rischio relativamente a tali prodotti, anche nella popolazione a maggior rischio come le donne in gravidanza, sia tra gli stessi operatori e professionisti sanitari. Gli eventi avversi nell'uso delle piante medicinali sono molteplici quando non si rispettino le regole per una prescrizione corretta e appropriata. Uno degli aspetti oggi più insidiosi è quello delle interazioni tra erbe, alimenti e farmaci, con possibile aumento di tossicità o riduzione di efficacia dei farmaci stessi. La sicurezza del paziente viene poi a mancare del tutto con il fenomeno dell'automedicazione non controllata, per il ricorso a erbe spontanee raccolte dallo stesso paziente, a preparazioni non adeguate o non controllate, alla associazione di numerose piante, o alla loro assunzione in base a criteri che appartengono alla tradizione popolare priva di ogni verifica scientifica. Emblematico è l'esempio Camedrio (*Teucrium chamaedrys*), noto anche come Erba querciola e della Celidonia (*Chelidonium majus*), piante epatotossiche, alla quale invece la medicina popolare attribuisce virtù epatoprotettrici. Le epatiti da prodotti naturali sono anche tra le più frequenti reazioni segnalate attraverso il sistema di Fitovigilanza dell'Istituto Superiore di Sanità. Dal 2002 al 2008: 29 casi di epatiti (3 casi fulminanti, di questi 2 mortali ed uno esitato in trapianto di fegato, 6 casi di epatite persistente, in 18 casi l'episodio, anche grave, si è risolto), e tra queste anche da Camedrio e Celidonia. La Fitoterapia in quanto tale presenta invece abitualmente buoni margini di sicurezza, purchè siano rispettate le norme e regole previste: a) prescrizione di fitoterapici presenti nelle specialità medicinali registrate, per i quali la garanzia di qualità, sicurezza ed efficacia è stabilita dalla AIC ministeriale; b) prescrizione di medicinali galenici magistrali, per i quali sicurezza e qualità sono garantiti dal farmacista (Farmacopea, Norme di Buona Preparazione). In quest'ultimo caso è indispensabile che il medico prescrittore abbia adeguate conoscenze di botanica farmaceutica, tecnologia estrattiva, farmaco-tossicologia delle sostanze vegetali e galenica, oltre che di esperienza in fitoterapia clinica, per un intervento appropriato sul paziente in base alle evidenze scientifiche disponibili. Il fenomeno della sicurezza in automedicazione può essere ben governato dal farmacista attraverso fitoterapici presenti in OTC/SOP, galenici officinali e medicinali vegetali tradizionali.

INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI PIANTE ED ESTRATTI VEGETALI

Elisabetta Sanzini

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Si intendono per integratori alimentari (o complementi alimentari o supplementi alimentari) i prodotti destinati ad integrare la dieta normale e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico. Questa categoria di prodotti è regolamentata dal Decreto Legislativo n. 169 del 21 maggio 2004 che recepisce la direttiva comunitaria 2002/46/CE. Si presentano come formulazioni sia monocomposte sia pluricomposte, in forme preosate, intendendo con questo termine le forme di commercializzazione quali capsule, pastiglie, compresse, pillole, gomme da masticare e simili, polveri in bustina, liquidi contenuti in fiale ecc. Accanto agli integratori più tradizionali (a base di vitamine e minerali, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibra ecc.), rientrano in questa normativa anche i prodotti a base di piante e derivati aventi finalità salutistiche. Fermo restando che gli ingredienti "erboristici" impiegabili negli integratori alimentari devono:

- presentare una composizione compatibile con una azione salutistica e non terapeutica;
- fornire le necessarie garanzie in termini di sicurezza in base a criteri di purezza, ai loro effetti, alla concentrazione dei principi attivi e alle eventuali associazioni.

La produzione ed il confezionamento degli integratori alimentari deve essere effettuata solo in stabilimenti autorizzati dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali. Al momento della prima commercializzazione l'impresa interessata deve trasmettere al Ministero un modello di etichetta utilizzata per tale prodotto. Il Ministero, ove ne ravvisi l'esigenza, può richiedere una documentazione a supporto della sicurezza d'uso del prodotto o degli effetti ad esso attribuiti. Gli integratori alimentari ritenuti idonei vengono quindi inclusi in un elenco che il Ministero pubblica ed aggiorna periodicamente. Tali prodotti sono sottoposti a controlli da parte delle autorità competenti del SSN a livello di produzione, di conservazione e di commercializzazione e da parte dell'ISS per quanto riguarda la parte scientifica e analitica.

IL PROCESSO VALUTATIVO ALLA BASE DELLA CLASSIFICAZIONE E DELLA SICUREZZA DEI PRODOTTI CONTENENTI SOSTANZE NATURALI DI ORIGINE VEGETALE

Maria Francesca Cometa

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La corretta collocazione sul mercato di prodotti a base vegetale ha sofferto per molto tempo della carenza di riferimenti normativi ad essi specificatamente indirizzati. Allo stato attuale è possibile infatti l'inclusione degli stessi in differenti categorie merceologiche in funzione della destinazione d'uso, rientrando nel campo di applicazione delle normative dei medicinali, dei dispositivi medici, degli integratori alimentari e dei cosmetici. In considerazione del potenziale impatto sulla salute pubblica, tali prodotti sono inoltre frequentemente oggetto di prelievo, controllo e valutazione da parte delle Autorità Sanitarie. L'Istituto Superiore di Sanità assicura il supporto tecnico-scientifico all'attività svolta dalle Autorità Competenti (Ministero della salute e GGFF) per gli aspetti di controllo e valutativi di questa tipologia particolare di prodotti, rivestendo un ruolo chiave per la loro classificazione e sicurezza. Gli aspetti di studio alla base del percorso della classificazione e della sicurezza di prodotti contenenti preparazioni a base vegetale, rivestono spesso dei connotati di criticità. In questa presentazione saranno presi in considerazione quelli più frequentemente affrontati in corso di valutazione. I requisiti indicati in ambito legislativo per le suddette categorie merceologiche frequentemente riservano delle sovrapposizioni, inducendo ad una ambiguità interpretativa per la corretta collocazione all'interno del mercato. Di conseguenza è oggetto di valutazione l'identificazione di quei meccanismi "critici" ossia quelli compatibili con le definizioni di medicinale/integratore/dispositivo medico/cosmetico. Gli aspetti legati alla qualità e sicurezza, strettamente connessi alla valutazione del rischio seguono percorsi analoghi ma richiedono adempimenti di differente grado di rigidità da parte del produttore, in funzione della classificazione merceologica proposta (produzione di dossier di registrazione per i medicinali, "notifica" per le altre tipologie di prodotti). I nuovi orientamenti delineati dalle Direttive comunitarie nell'ambito degli integratori alimentari e cosmetici obbligano che il percorso produttivo sia effettuato in conformità ai sistemi di qualità, garantendo il monitoraggio attraverso un piano di autocontrollo degli aspetti legati alla tossicità "estrinseca" (es. problemi di contaminazione e/o adulterazione). Sono invece oggetto di discussione tutti gli aspetti relativi alle proprietà biologiche/farmacologiche e tossicologiche "intrinseche" del prodotto contenente sostanze vegetali e che rappresentano il discriminante per la corretta collocazione sul mercato o per il ritiro da esso. Il panorama delle criticità nel processo valutativo è molto più ampio di quello accennato e gli strumenti tecnici a disposizione del valutatore (es. liste positive e negative di specie vegetali/sostanze naturali ammesse o non ammesse nelle categorie rispettive di appartenenza), a volte sono insufficienti inducendo ad un approccio valutativo molto complesso e basato *case-by-case*.

Poster

IL LEGAME DELLA LATTOFERRINA BOVINA A SPECIFICHE PROTEINE STRUTTURALI VIRALI INIBISCE L'INFEZIONE DEL VIRUS DELL'*HERPES SIMPLEX* DI TIPO 1

Maria Grazia Ammendolia, Magda Marchetti, Fabiana Superti
Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La lattoferrina è una glicoproteina monomerica sintetizzata dai neutrofilo e dalle cellule della mucosa epiteliale, che può essere ritrovata in molte altre secrezioni esocrine come latte, lacrime, saliva, bile e succo pancreatico. Questa proteina svolge un ruolo importante nei meccanismi di difesa dell'ospite verso diversi patogeni, sia direttamente che attraverso la regolazione della risposta infiammatoria. L'attività antivirale della lattoferrina è stata ampiamente documentata per diversi virus; nel caso dei virus erpetici, nostri studi precedenti hanno dimostrato che la lattoferrina compete con il virus per il legame ai glicosaminoglicani della cellula, inibendo le fasi precoci dell'infezione. Nella presente ricerca abbiamo ulteriormente analizzato il meccanismo dell'attività antierpetica della lattoferrina *in vitro*. I risultati ottenuti hanno dimostrato che questa proteina è in grado di prevenire non solo l'adsorbimento virale alle cellule ospiti ma anche l'internalizzazione del virus e la sua diffusione da cellula a cellula. In particolare i nostri studi hanno dimostrato che l'attività antierpetica della lattoferrina si esplica attraverso la sua interazione specifica con alcune proteine strutturali virali. I risultati di questo studio, dimostrando per la prima volta che la lattoferrina è in grado di agire anche sulle fasi tardive dell'infezione da virus dell'*herpes simplex* e quindi di prevenire le infezioni causate dal virus associato alle cellule, confermano questa proteina come un candidato eccellente per il trattamento delle infezioni erpetiche.

L'INFORMAZIONE SULLE SOSTANZE NATURALI IN RETE: STRATEGIE DI RICERCA, RISORSE ELETTRONICHE, STRUMENTI DI CONDIVISIONE

Rosaria Rosanna Cammarano, Maurella Della Seta
*Settore Documentazione, Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca ed Attività
Editoriali, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Le risorse informative per la ricerca scientifica disponibili in rete sono ormai innumerevoli, e sempre più si avverte l'esigenza di sviluppare strumenti e interfacce che siano di aiuto e orientamento alla navigazione dell'utente nel grande mare dell'informazione. Attualmente siamo in una fase di evoluzione della rete verso il web semantico o web 3.0, potenzialmente in grado di unificare le tecnologie per collegare i concetti in un *web of knowledge* universale, che faciliterà, attraverso lo sviluppo di metadati che specifichino il contesto semantico, la comunicazione tra i ricercatori delle diverse discipline scientifiche. Nell'attesa di questo ambiente in cui sarà possibile effettuare ricerche molto più sofisticate delle attuali, rimangono sempre validi gli strumenti realizzati e utilizzati finora, come le banche dati che indicizzano la letteratura pubblicata sulle riviste (tradizionali o ad accesso libero), o in altri tipi di pubblicazioni, i siti Internet, la documentazione a testo completo disponibile in formato elettronico. A questa già nutrita schiera di risorse e dati si aggiungono oggi gli strumenti informativi tipici del web 2.0, che, affiancandosi al web tradizionale, è stato definito come "architettura della partecipazione", in quanto implica un ruolo attivo di condivisione e collaborazione da parte dell'utente nella produzione e diffusione dell'informazione in rete. Gli strumenti tecnologici propri di questo ambiente - *blog, podcast, wiki* e *RSS feed* - possono offrire interessanti applicazioni in ambito scientifico e medico, anche nel campo delle sostanze naturali. Scopo del presente lavoro è quello di offrire una panoramica aggiornata delle potenzialità informative attualmente disponibili in Internet in tale ambito, con particolare riguardo a:

- banche dati come PubMed, che dispongono di interfacce *user-friendly* costantemente aggiornate e in grado di consentire anche all'utente non specializzato di sviluppare strategie di ricerca efficaci ed esaurienti;
- banche dati a pagamento, come i Chemical abstracts, in grado di reperire documentazione proveniente da più fonti, tra cui brevetti, atti di convegni e rapporti tecnici, attraverso raffinati programmi di ricerca;
- periodici ad accesso aperto, che si stanno sempre più affermando come un canale importante per la pubblicazione di lavori scientifici, anche in considerazione del potenziale indice di citazioni e di conseguenza dell'*impact factor*;
- strumenti propri del web 2.0, che, tramite l'interazione diretta da parte del ricercatore, possono offrire spunti interessanti per la discussione e la condivisione di idee, risultati, progetti di ricerca.

TRATTAMENTO FITOTERAPICO DELLA LITIASI RENALE: LE PIANTE SPACCAPIETRE NELL'APPROCCIO CLINICO INTEGRATIVO

Paolo Campagna

Università degli Studi della Tuscia, Viterbo

Finalmente nel XIX sec. si pone fine alle torture urologiche dei secoli precedenti e si passa a terapie mediche e chirurgiche più attuali: dal grande chirurgo di Pavia Antonio Scarpa (1752-1832) a Martino Anzi, sacerdote e botanico (Bormio 1812-1883), molte le prove di descrizione dei rimedi maggiori per la ritenzione urinaria e il "mal di pietra". L'Urologia moderna, nata circa un secolo fa, grazie all'introduzione dell'endoscopia e della radiologia, è stata fondamentale permettendo non solo uno studio più accurato della vescica e dell'apparato urinario, ma anche la diagnosi delle sue affezioni. In Italia si stima che il numero di individui affetti da calcolosi delle vie urinarie sia pari a circa un milione. La Nefrolitiasi calcica (NLCa) primitiva è la forma più frequente, rappresentando ben oltre il 50% dei casi. Una "storica" *Consensus Conference* sulla nefrolitiasi ha ribadito l'importanza della prevenzione medica, da attuare tramite l'impiego di terapie specifiche dirette a correggere i "fattori di rischio" quali le *modificazioni urinarie* o di *stile di vita*. Oltre la terapia idropinica oggi si propongono farmaci di sintesi che riducono l'escrezione renale dei sali litogeni incrementando la concentrazione degli inibitori urinari o trattamenti antilitiasici come la litotrixxia con onde d'urto (ESWL). In effetti, però, nessun rimedio sembra più valido dei fitoterapici nel tentativo di riduzione di volume o disgregazione ed eliminazione dei calcoli dell'apparato urinario, almeno di quelli a bassa collocazione e di piccola dimensione, oltre che dei frammenti residuati dopo gli stessi trattamenti, nonostante per molti dei fitocomplessi non si sia giunti ancora alla piena conoscenza della dettagliata composizione chimica, del meccanismo d'azione e della farmacocinetica. Vengono passati in rassegna vecchi e nuovi rimedi vegetali, dalla *Parietaria* alla *Ceterach officinarum*, dall'*Ononide* alla *Rubia tinctorum*, per finire con due piante esotiche veramente interessanti, supportate da studi controllati, come la *Crataeva nurvala* ed il *Phyllanthus niruri*. Nel fitocomplesso della prima la presenza di *lupeolo* induce una diminuzione significativa dell'ossalato di calcio nel rene, nonché una riduzione dei livelli perossidativi ed un aumento dello "stato antiossidante"; per il *Phyllanthus*, in particolare, attenzione è stata posta alla calcolosi caliceale inferiore, per la quale ha migliorato l'efficacia del trattamento *ESWL* con percentuali di *stone-free* nettamente superiori ai dati presenti in letteratura. Alla luce di esperienze cliniche personali e di evidenze di letteratura, viene proposto uno schema terapeutico integrativo che comprende farmaci di sintesi e vegetali, con un commento sulle possibili sinergie ed interazioni.

IL CONTROLLO QUALITÀ DEI PRODOTTI NATURALI UTILIZZATI NEI MEDICINALI OMEOPATICI CON RIFERIMENTO ALLE INDICAZIONI DELLE PRINCIPALI FARMACOPEE

Adriana Carluccio

Membro della Farmacopea Omeopatica degli Stati Uniti d'America, Commissione Standard e Qualità, Milano

I medicinali omeopatici utilizzano molte sostanze naturali, di varia origine: vegetale, minerale, animale, biologica in generale. Gran parte di queste materie prime sono descritte nelle monografie di diverse Farmacopee Ufficiali. Questa relazione prende in considerazione la Farmacopea Europea (EF), la Farmacopea Ufficiale Omeopatica tedesca (HAB), la Farmacopea Francese (FF), la Farmacopea Omeopatica degli Stati Uniti d'America (HPUS). Ne esamina le peculiarità e si addentra nella analisi dei metodi di produzione, dei metodi di controllo e della struttura delle monografie. Si effettua anche un raffronto tra monografie di uno stesso principio attivo, ad esempio: *Cardiospermum*, *Acidum benzoicum*, *Aurum cloratum*, ecc. Le due farmacopee più importanti in Europa, francese e tedesca, hanno una impostazione metodologica diversa. La FF preferisce descrivere metodiche generali, che ogni azienda può far proprie ed adattare alle sue peculiarità produttive; la HAB invece propende per descrizioni molto più dettagliate e vincolanti. Fondamentalmente, la FF ha uno scopo di codifica (metodiche ampie permettono alla maggioranza dei prodotti sul mercato di soddisfare i parametri stabiliti), mentre la HAB ha come scopo la verifica, cioè le norme dettagliate permettono un controllo sulla qualità dei prodotti più stringente e quindi una selezione del mercato. La EF finora non è riuscita a omogenare le due farmacopee, francese e tedesca, e tende a inserire in una stessa monografia entrambe le descrizioni francese e tedesca. La HPUS invece è più pragmatica, si finalizza ai punti essenziali per la produzione e il controllo e quando opportuno, effettua una sintesi dei metodi europei. La HPUS è una linea guida molto utile per le aziende produttrici. Differenza rimarchevole tra le farmacopee europee e la HPUS è dovuta al fatto che ogni monografia americana riporta anche dati relativi alla dose minima ritenuta di libero impiego. Quindi per ogni ingrediente omeopatico la HPUS indica anche il grado di diluizione che può essere utilizzato in un medicinale che sia vendibile senza ricetta medica. Questo dato è mancante nelle farmacopee europee e pone alle aziende europee diverse problematiche di ordine normativo e tossicologico. Attualmente la HPUS sta sviluppando un programma dettagliato di inserimento di nuove monografie e sta rivolgendo il proprio interesse verso la Farmacopea Indiana. Si presentano inoltre alcune soluzioni tecnologiche avanzate per la manipolazione di prodotti naturali.

ATTIVITÀ ANTIVIRALE *IN VITRO* NEI CONFRONTI DELL'HERPES 1 E 2 DA PARTE DELL'ESTRATTO METABOLICO DI *COMBRETUM MICRANTHUM*

Giuseppe Ferrea (a), Andrea Canessa (a), Francesca Sampietro (a), Mario Cruciali (a), Giovanni Romussi (b), Dante Bassetti (a)

(a) *I^a Clinica Malattie Infettive, Università degli Studi, Genova*

(b) *Istituto di Analisi e Tecnologie Alimentari, Università degli Studi, Genova*

Gli autori hanno dimostrato l'attività antivirale *in vitro* dell'estratto metabolico delle foglie di *Combretum micranthum* contro *herpes virus* 1 e 2. L'attività è presente nell'estratto disciolto 7 giorni prima del test, ma non in quello preparato di fresco, indicando così la presenza di precursori inattivi che subiscono una trasformazione spontanea in composti attivi. L'ossidazione alcalina dell'estratto metanolico promuove questa rapida trasformazione. I precursori sono stati identificati come tannini catechinici condensati che, in ambiente alcalino, vanno incontro ad rottura rapida, un riarrangiamento molecolare ad acido catechinico e ad autoossidazione. L'autoossidazione alcalina prodotta dall'estratto metanolico del *Combretum micranthum* e quello dell'acido catechinico sintetico mostra simili curve di assorbimento all'I.R ed U.V. così come una simile attività anti *Herpes 1 e 2*. EC50 dei prodotti di ossidazione dell'acido catechinico nei confronti della replicazione dell'Herpes 1 e 2 era 2 µg/mL e 4 µg/mL rispettivamente, quando le colture cellulari erano trattate con i composti durante l'infezione virale.

TERPINEN-4-OLO COME PRINCIPIO ATTIVO DI FORMULAZIONI VETERINARIE PER LA PREVENZIONE DELLE MASTITI

Anna Maria Ferrini (a), Veruscka Mannoni (a), Fabiana Superti (b), Maria Grazia Ammendolia (b), Sergio Fuselli (c), Roberta Morlino (c), Paolo Aureli (a), Simonetta Amatiste (d), Giuseppina Giacinti (d), Andreana Tammaro (d), Remo Rosati (d), Giorgio Varisco (e), Brunello Oliva (f), Eugenio Pontieri (f), Christine Montel (g), Isabelle Verdier-Metz (g), Philip Pradel (g)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(d) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma

(e) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e della Emilia Romagna, Brescia

(f) Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi, L'Aquila

(g) INRA, Unité Recherches Fromagères, Aurillac, France

Nonostante gli intensi studi e la messa in atto di rigorose misure di prevenzione, la mastite è ancora oggi la patologia più diffusa e temuta negli allevamenti per la produzione di latte. La mastite è definita come la risposta infiammatoria della ghiandola mammaria alla presenza di infezioni microbiche e/o a traumi. Ha ripercussioni sulla qualità e quantità del latte prodotto, sul benessere animale e sulla salute del consumatore. Le perdite economiche provocate dalle mastiti sono fondamentalmente correlate a: a) assente o ridotta produzione; b) scadimento qualitativo del latte; c) costo del trattamento o delle perdite degli animali; d) distruzione del latte durante la terapia e durante tutto il tempo di sospensione del trattamento. Il trattamento di elezione è basato sull'impiego di antibiotici da utilizzare come terapia oppure, nel periodo di asciutta, come terapia/profilassi. L'utilizzo di antibiotici nel comparto zootecnico, oltre a generare tutta la problematica relativa alla presenza di residui di antibiotici nei prodotti alimentari, contribuisce significativamente anche alla pressione di selezione per l'emergenza di ceppi batterici antibiotico resistenti. La ricerca di nuovi agenti antimastitici, ma di natura non antibiotica, potrebbe rappresentare un contributo considerevole nella gestione del rischio dell'antibiotico resistenza. A tale riguardo, sembrano essere particolarmente promettenti gli oli essenziali (o loro componenti) con proprietà antimicrobiche. Il presente lavoro ha indagato la possibilità e la validità di applicazione del terpinen-4-olo (da *Melaleuca alternifolia* e.o.) come principio attivo di preparazioni per il *post-dipping* (trattamento di disinfezione post-mungitura) ed il *dry off* (trattamento nella messa in asciutta). Tali preparazioni, appositamente formulate (European Patent application n. 084254317), sono state utilizzate per il trattamento sperimentale di bovine da latte condotto presso diversi allevamenti. Sono stati inoltre studiati i seguenti aspetti: attività antibatterica su ceppi mastitogenici di campo (n. 230) (principalmente *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli*); meccanismo d'azione del terpinen-4-ol sui principali agenti

della mastite tramite microscopia elettronica, frequenza mutazionale e induzione del danno di membrana; qualità microbiologica e caratteristiche sensoriali di campioni di latte raccolto dagli animali trattati e relativa quantificazione del residuo di terpinen-4-ol. Tutti i risultati concorrono ad avvalorare il terpinen-4-ol come candidato eccellente per la disinfezione delle mammelle ai fini della prevenzione delle mastiti batteriche.

Il lavoro ha ricevuto finanziamenti da TRUEFOOD - "Traditional United Europe Food" è un progetto integrato finanziato dalla Commissione Europea nel 6° Programma Quadro per Ricerca e Sviluppo Tecnologico - Contratto n. FOOD-CT-2006-016264"

GINKGO BILOBA L PROBLEMATICHE TOSSICOLOGICHE RELATIVE ALLA COAGULAZIONE E ALL'AGGREGABILITÀ PIASTRINICA: CONTROLLO CLINICO E DI LABORATORIO SU 42 PAZIENTI CONSECUTIVI

Luigi Gori, Vittorio Mascherini, Cristina Cortese, Danilo Massai, Fabio Firenzuoli
Centro di Medicina Naturale, Ospedale S. Giuseppe, Azienda USL 11, Empoli, Firenze

Il Ginkgo biloba L., è un fossile vivente ed unica specie ancora sopravvissuta della famiglia delle Ginkgoaceae. L'estratto tratto dalle foglie di questo albero è uno dei più venduti nel mondo occidentale con un fatturato annuo di circa 1 miliardo di dollari, per tali motivi data la possibile attività antiaggregante piastrinica e anticoagulativa dimostrata in laboratorio, dovuta soprattutto alla riduzione dell'attività del PAF (*platelet activating factor*), attività emoregolativa sui globuli rossi sia di tipo antiossidante (riduzione dell'emolisi e lipoperossidazione, riduzione del consumo di glutazione e formazione di metaemoglobina) che pro-ossidante (aumento della fragilità di membrana, alterazione della morfologia cellulare, induzione del consumo di glutazione e formazione di emetaemoglobina - ad alte dosi). Sono stati sollevati legittimamente dubbi sulla sicurezza dell'estratto non solo in considerazione del largo uso che ne viene fatto come prodotto di libera vendita, ma anche per le possibili interferenze con altri farmaci, dal momento che una delle principali indicazioni terapeutiche è nella prevenzione delle patologie degenerative cerebrovascolari, inoltre coadiuvante nel trattamento dell'insufficienza vascolare periferica e trattamento degli acufeni. In passato sono stati riportati in letteratura scientifica alcuni casi di possibili emorragie collegate all'assunzione dell'estratto per cui sono stati sollevati dubbi sulla sicurezza del *Ginkgo biloba* in relazione ai possibili effetti collaterali sulla coagulazione soprattutto in seguito ad uso prolungato. Come protocollo nel nostro Centro di Medicina Naturale in pazienti sopra i 40 anni e che dovranno utilizzare un estratto ad un dosaggio ≥ 240 mg al giorno per più di 3 mesi, viene eseguito prima dell'inizio e dopo 4 settimane dall'inizio della somministrazione un controllo dell'emocromo, della coagulazione e dell'aggregabilità piastrinica per valutare possibili alterazioni dello stato coagulativo pre-esistenti o conseguenti alla somministrazione. Nel nostro dipartimento abbiamo controllato 65 pazienti consecutivi che non assumevano contemporaneamente altri farmaci che potevano alterare lo stato coagulativo. In 12 pazienti non è stato possibile eseguire un controllo corretto per vari motivi, una paziente di 72 anni è stata esclusa perché presentava un'alterazione spontanea dell'aggregabilità piastrinica. In tutti gli altri 42 pazienti non è stata riscontrata nessuna alterazione né dei parametri coagulativi né dell'aggregabilità piastrinica. Per cui riteniamo anche sulla base dei dati della corrente letteratura scientifica che l'estratto di *Ginkgo biloba* titolato al 24% in ginkgoflavonoidi e al 6% in lattoni terpenici alla dose di 240 mg al giorno non alteri né la coagulazione né l'aggregabilità piastrinica dei pazienti. Tuttavia consigliamo a scopo precauzionale in pazienti che devono iniziare un trattamento prolungato con estratti di *Ginkgo biloba* di eseguire comunque controlli dello *status* coagulativo almeno prima di iniziare il trattamento.

EFFETTI ANTIPROLIFERATIVI DEL METILSPIRANO IN LINEE CELLULARI TUMORALI

Giulia Lanzilli (a), Andrea Cottarelli (a), Maria Tricarico (a), Antonella De Mico (b),
Mariapia Fuggetta (a)

(a) *Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche,
Roma*

(b) *Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

I derivati diossaspirochetalici sono presenti in varie sostanze naturali di origine vegetale ed animale. Fanno parte di molecole macrolidiche spiraniche con interessanti attività biologiche; tra queste macromolecole si classificano, le avermectine, i feromoni e vari derivati di origine marina, tra cui le spongistatine, estratte dalle spugne, di cui è nota l'attività antineoplastica. L'importante bioattività di queste macromolecole ha suscitato notevole interesse dal punto di vista sia sintetico sia farmacologico. Il nostro gruppo ha realizzato un procedimento innovativo per la preparazione di subunità diossaspiraniche partendo da reagenti facilmente reperibili e diversamente funzionalizzabili (Patent WO/2007 132486). I composti spiranici ottenuti sono stati valutati per la loro attività antitumorale in termini di inibizione della crescita, della mortalità cellulare, dell'induzione di apoptosi e del ciclo cellulare su diverse linee tumorali. Tra i composti testati il metilspirano (1,7-diossapiro (5.5)-10-metil-undecen-3-en-5-oxa-2-olo) è risultato quello con la migliore attività biologica. Per lo studio dell'attività antiproliferativa del metilspirano sono state utilizzate due linee tumorali di melanoma: M14 umana e B16 murina. Le cellule sono state coltivate *in vitro* con concentrazioni crescenti di metilspirano ed analizzate a diversi tempi (24, 48, 72 ore). Sono state valutate la crescita cellulare *in vitro* effettuata mediante conta cellulare in *trypan blue* e la presenza di cellule vitali, apoptotiche e necrotiche. I campioni trattati sono stati analizzati mediante citometria a flusso per lo studio del ciclo cellulare e per la presenza del picco ipodiploide indice di cellule apoptotiche. I risultati dimostrano che a concentrazioni molto basse (12,5-125 picogrammi) il metilspirano non induce sostanziali cambiamenti rispetto ai controlli, mentre a concentrazioni più alte (12,5-50 microgrammi) determina una significativa inibizione della proliferazione cellulare tempo- e dose-dipendente ed un aumento dell'apoptosi valutabile a tempi precoci dall'inizio del trattamento. Sul ciclo cellulare si evidenzia un blocco, concentrazione- e tempo-dipendente, in corrispondenza del passaggio dalla fase G1 alla fase S. Inoltre il metilspirano testato su cellule umane normali non tumorali (linfociti) alle concentrazioni efficaci nell'inibizione tumorale, non ha provocato effetti citotossici. Nel loro insieme, i risultati preliminari ottenuti indicano chiaramente che il metilspirano esercita un'attività inibitoria nei confronti di cellule tumorali di melanoma. In particolare, tale attività è concentrazione- e tempo-dipendente e si esplica attraverso l'induzione di apoptosi e l'alterazione del ciclo cellulare. Ulteriori studi sono in corso per valutare più dettagliatamente i meccanismi molecolari coinvolti nell'attività antiproliferativa ed eventualmente per lo studio di tale sostanza *in vivo*.

EFFETTO DELLA LATTOFERRICINA SULLA SENSIBILITÀ AI FLUOROCHINOLONI DI *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGENO

Catia Longhi (a), Massimiliano Marazzato (a), Maria Pia Conte (a), Valerio Iebba (a),
Serena Schippa (a), Lucilla Seganti (a), Fabiana Superti (b), Lucia Bertuccini (b),
Antonella Comanducci (a)

(a) *Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Università degli Studi Sapienza, Roma*

(b) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Escherichia coli è il microrganismo più comunemente isolato nelle infezioni del tratto urinario. L'analisi filogenetica e lo studio dei determinanti di patogenicità hanno dimostrato che ceppi di *E. coli* appartenenti ai gruppi filogenetici B2 e D sono preponderanti nelle infezioni del tratto urinario e che questi batteri possiedono fattori di virulenza specializzati. I fluorochinoloni sono gli antibiotici di elezione nel trattamento delle infezioni del tratto urinario ed il fatto che il loro impiego abbia determinato un aumento della resistenza tra i ceppi di *E. coli* ha incoraggiato la ricerca di nuove strategie antimicrobiche. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se le minime concentrazioni inibenti di due chinolonici di ultima generazione, norfloxacin e ciprofloxacina, nei confronti di ceppi di *E. coli* uropatogeni fossero influenzate in presenza di lattoferricina B. La lattoferricina B è un peptide naturale antimicrobico cationico di 25 amminoacidi, derivato dalla porzione N-terminale della lattoferrina bovina, del quale è nota la capacità di attraversare le membrane dei batteri Gram-negativi compromettendone la permeabilità. Parallelamente è stato eseguito uno studio di caratterizzazione dei ceppi isolati, e in particolare è stata saggiata la presenza di determinanti capsulari e l'appartenenza ai gruppi filogenetici. I risultati ottenuti con i saggi di sinergia hanno mostrato che il peptide cationico utilizzato da solo era attivo su tutti i ceppi saggiati e che nel 50% dei ceppi la combinazione di lattoferricina B con i fluorochinoloni determinava una diminuzione delle minime concentrazioni inibenti (sinergismo o parziale sinergismo). È possibile che in seguito all'incrementata permeabilità batterica attribuibile alla lattoferricina B, l'associazione peptide-antibiotico possa contribuire ad ottenere all'interno della cellula concentrazioni di antibiotico tali da contrastare i molteplici meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni presenti in *E. coli*.

RUOLO DEI GLICOSAMINOGLICANI NELL'ATTIVITÀ ANTI-HSV-2 DELLA LATTOFERRINA

Magda Marchetti, Maria Grazia Ammendolia, Fabiana Superti
Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Una delle funzioni biologiche della lattoferrina è rappresentata dalla sua attività antivirale, sebbene i meccanismi attraverso i quali questa proteina svolge la sua azione non siano stati ancora completamente identificati. I virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) sono stati da tempo inseriti nell'elenco dei virus sensibili all'azione inibente della lattoferrina. In particolare, è stato osservato che la lattoferrina bovina (bLf) previene l'infezione virale attraverso un meccanismo di competizione con i virus erpetici per il legame ai glicosaminoglicani (GAG) presenti sulla membrana cellulare. Lo scopo della presente ricerca è stato quello di approfondire lo studio del meccanismo d'azione della lattoferrina umana (hLf) e bovina nei confronti dell'infezione da HSV-2 *in vitro*. Come modello di studio sono stati utilizzati il ceppo 333 e il suo mutante gC-neg1 che presenta una forma troncata della glicoproteina C (gC). I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'attività antivirale della bLf in cellule GMK (rene di scimmia verde africana) è indipendente dall'interazione tra gC e GAG poiché non sono state osservate differenze di attività verso il ceppo selvaggio e il virus mutante. Per quanto riguarda hLf, lo stesso mutante (HSV-2 gC-neg1) è risultato invece più sensibile del ceppo selvatico, suggerendo la possibilità che la proteina umana interagisca con alcune strutture virali che nel virus non mutato sono mascherate da gC. Studi effettuati su altri modelli cellulari hanno evidenziato che la bLf è dotata di una maggiore attività rispetto alla hLf. In particolare, diversamente da quanto riportato per l'HSV-1, la proteina bovina è stata in grado di prevenire l'infezione virale anche in cellule prive di GAG. I risultati di questa ricerca hanno dimostrato per la prima volta che la lattoferrina bovina è in grado di bloccare un recettore di natura diversa dai glicosaminoglicani aggiungendo nuove informazioni sull'attività anti-erpetica di questa proteina.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEI PEPTIDI ANTIMICROBICI (AMPS) SU CEPPI DI *STAPHYLOCOCCUS* RESPONSABILI DI INFEZIONI URINARIE (UTIS)

Stefania Marcheggiani (a), Roberto Spurio (b), Maria Luisa Mangoni (c), Carmelo D'Asero (d),
Laura Mancini (a)

(a) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di
Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Biologia MCA Laboratorio di Genetica, Università degli Studi,
Camerino, Macerata*

(c) *Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli Studi Sapienza, Roma*

(d) *Ospedale S. Pietro Fatebenefratelli, Roma*

Le infezioni del tratto urinario (UTI_s) rappresentano un serio problema che affligge milioni di persone ogni anno in tutto il mondo e rappresentano la seconda causa di infezione dopo quelle respiratorie. Gli ambienti ospedalieri rappresentano un luogo dove queste infezioni diffondono molto rapidamente. Gli agenti eziologici maggiormente responsabili di queste infezioni sono microrganismi Gram negativi, ed in misura minore Gram positivi, virus e funghi. Gli agenti eziologici responsabili di queste infezioni sono spesso multi resistenti, questo fenomeno è attribuibile all'uso massiccio che si è fatto negli anni degli antibiotici e alla rapidità e capacità con la quale i batteri rispondono, sviluppando le resistenze, all'introduzione di nuove molecole. Questo fenomeno ha portato all'emergenza e alla diffusione di microrganismi epidemiologicamente significativi come i ceppi di *Staphylococcus meticillin-oxicillin* resistenti (MRSA). L'ampia prevalenza e diffusione di questi patogeni è largamente documentata tanto che da molti anni sono stati istituiti sia a livello europeo (EARSS) che mondiale (NNIS, DANMAP) dei programmi di sorveglianza. Da qui la necessità negli ultimi anni di sperimentare terapie alternative a quelle antibiotiche proprio per ridurre e/o tentare di arginare questo fenomeno. Tra le varie sostanze alternative, hanno suscitato molto interesse per le loro capacità antimicrobiche molecole note come "Peptidi Antimicrobici" (AMPs). Queste molecole vengono costantemente prodotte da molti organismi sia del regno vegetale che animale. Gli AMPs hanno caratteristiche chimico e fisiche che li rendono particolarmente adatti all'interazione con le membrane delle cellule batteriche, provocando un danno irreversibile che facilmente conduce alla loro morte. In questo studio è stata valutata l'attività antimicrobica di AMPs estratti dalle pelle degli anfibi, su 5 ceppi di *Staphylococci* ssp provenienti da urine di pazienti con infezioni dell'apparato urinario (UTIs). È stata determinata la Minima Concentrazione Inibente (MIC) e la Minima Concentrazione Battericida (MBC) di sei AMP_s in particolare Temporine (B, F, G ed L), Esculentina (ESC 1-18) e Bombinina (H₂), sui ceppi di *Staphylococci* spp. isolati. I risultati ottenuti mostrano che dei sei AMPs utilizzati la classe delle Temporine in particolare la temporina L, mostra un'elevata attività antibatterica nei confronti dei ceppi studiati. I risultati ottenuti di questo studio ampliano le conoscenze sull'azione degli AMPs nei confronti di microrganismi Gram positivi e

confermano i risultati ottenuti in altri studi ove era stata dimostrata una specifica attività degli AMPs nei confronti di isolati clinici. Questo studio rappresenta un contributo alla ricerca ed impiego di molecole con attività antimicrobica alternative e/o a supporto agli antibiotici.

ALCUNI CRITERI DI ETICA PER LA SPERIMENTAZIONE DI SOSTANZE NATURALI

Carlo Petrini

Unità di Bioetica, Presidenza, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La ricerca che riguarda sostanze naturali e, più in generale, terapie non convenzionali è resa difficile da alcune circostanze. Chi prescrive terapie non convenzionali in genere si dice attento alle specificità individuali. Studi di rassegna attestano come vengano prescritti trattamenti diversi a soggetti con gli stessi sintomi e che hanno ricevuto la stessa diagnosi. Di conseguenza può essere difficile includere tali terapie nei tipici schemi delle sperimentazioni cliniche. In genere le terapie non convenzionali non vengono prescritte singolarmente, ma in combinazione. Le sperimentazioni cliniche sono finalizzate a verificare effetti specifici, mentre in genere si ritiene che le terapie non convenzionali producano una molteplicità di effetti, talvolta in sinergia tra loro. I meccanismi di azione delle terapie non convenzionali sono in genere poco noti. È possibile che chi prescrive terapie non convenzionali abbia scarsa familiarità con i protocolli delle normali sperimentazioni cliniche. I medici che prescrivono terapie non convenzionali in genere lavorano individualmente: solo raramente sono inseriti in strutture organizzate. I pazienti in genere si rivolgono spontaneamente e privatamente a medici che utilizzano terapie non convenzionali ed è quindi difficile inserirli in programmi ampi di ricerca. Poiché la scelta di ricorrere a terapie naturali è in genere molto personale, la proposta generalizzata di partecipare a sperimentazioni cliniche potrebbe essere percepita come una coercizione. Il consenso informato potrebbe esserne falsato. Date le circostanze, spesso non sono fattibili studi in doppio cieco (si pensi, per esempio, al caso dell'agopuntura). Alcune istituzioni nazionali, internazionali e sovranazionali hanno formulato pareri, raccomandazioni, linee guida sull'argomento. Da un'analisi complessiva di un congruo numero di tali documenti è possibile enucleare alcuni aspetti con speciale rilevanza per l'etica. È importante che nelle sperimentazioni con sostanze naturali si considerino i seguenti requisiti:

- veridicità dell'informazione;
- efficacia della comunicazione;
- consenso informato;
- partecipazione volontaria;
- beneficio diretto per il soggetto partecipante, e non soltanto avanzamento generale delle conoscenze;
- proporzionalità tra rischi e benefici;
- tutela dei soggetti ed in particolare delle categorie vulnerabili;
- valutazione indipendente dei protocolli sperimentali e approvazione da parte del comitato etico;
- adeguata preparazione del personale;
- confidenzialità e tutela dei dati personali;
- accuratezza nella registrazione e nell'analisi dei dati;
- approfondimento scientifico dei possibili meccanismi;
- informazione ad altri medici curanti;
- cautela nel ricorso al placebo ed attenta valutazione di un eventuale effetto placebo.

EFFETTI ANTIINFIAMMATORI DELLA LATTOFERRINA BOVINA SULLE ANTIGEN PRESENTING CELLS

Patrizia Puddu (a), Daniela Latorre (a), Maria Carollo (a), Piera Valenti (b), Filippo Belardelli (a), Sandra Gessani (a)

(a) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienza della Salute Pubblica, Università degli Studi Sapienza, Roma*

La lattoferrina (Lf) è una glicoproteina in grado di legare il ferro, rilasciata dai neutrofili e nelle secrezioni esocrine (lacrime, latte ecc.). La Lf svolge importanti funzioni che includono l'attività antimicrobica, antitumorale, antinfiammatoria e immunomodulante. In questo studio abbiamo investigato gli effetti della Lf bovina (bLf) su differenziamento *in vitro* e maturazione della Cellula Dendritica (DC), e sui meccanismi che regolano il metabolismo del ferro nel monocita. I risultati ottenuti indicano che la bLf non interferisce con il differenziamento da monocita a DC, sebbene determini un blocco della maturazione di queste ultime indotta da LPS, polyI:C e R848, ligandi del *Toll Like Receptors* (TLR) 4, TLR3 e TLR8, rispettivamente. Le bLf-DC, differenziate in presenza di bLf, non mostrano un'aumentata espressione alla membrana delle molecole CD80, CD86, CD83 e MHC di classe I e II dopo stimolazione con gli agonisti dei TLR. Inoltre, le bLf-DC non perdono la capacità di internalizzare l'antigene e non producono citochine effettrici quali IL-12, TNF-alfa e IL-23, come avviene nelle cellule di controllo in risposta alla stimolazione. Al contrario, le bLf-DC maturano se stimolate con CD40L, suggerendo che il blocco maturativo osservato sia parziale e relativo a segnali derivanti dalla stimolazione dei TLR. Abbiamo inoltre osservato che la diminuita produzione di citochine polarizzanti risulta associata ad una diminuita risposta di tipo T helper 1. Il metabolismo del ferro (Fe^{+3}) è un processo strettamente controllato in cui la diminuzione dei livelli di Fe^{+3} disponibile è bilanciata da quello: 1) introdotto con la dieta; 2) ricavato dagli eritrociti senescenti; 3) mobilitato dai tessuti. In questo contesto, l'epcidina, prodotta dal fegato ed in minor quantità dai monociti, svolge un ruolo chiave riducendo l'assorbimento di ferro a livello intestinale e favorendone l'accumulo nei tessuti. Studi recenti hanno dimostrato che l'anemia da infiammazione (*anemia of chronic disease*) è determinata da alti livelli di epcidina indotta dalle citochine infiammatorie, in particolare IL-6, attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione STAT3. Esperimenti preliminari condotti su DCs e monociti da sangue periferico di donatori sani, stimolati con LPS e IL-6, suggeriscono che la bLf possa interferire con l'induzione di STAT3 totale o fosforilata, e l'espressione del recettore della transferrina (TfR1). Nel complesso questi risultati suggeriscono che nell'uomo la bLf possa esercitare un ruolo antinfiammatorio attraverso molteplici meccanismi comprendenti la modulazione dell'omeostasi del Fe^{+3} e l'attività delle DCs.

LA CIANIDINA 3-GLUCOSIDE ESERCITA UN'AZIONE INSULINO-MIMETICA IN ADIPOCITI UMANI E MURINI

Beatrice Scazzocchio (a), Rosaria Vari (a), Massimo D'Archivio (a), Fabio Galvano (b), Emanuele Soricelli (c), Gianfranco Silecchia (c), Roberta Masella (a)

(a) *Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Chimica Biologica, Università degli Studi, Catania*

(c) *Dipartimento di Chirurgia, Università degli Studi Sapienza, Roma*

Obiettivi. La cianidina 3-glucoside (C3G) è un'antocianina ampiamente diffusa negli alimenti. Numerosi studi hanno evidenziato la sua efficacia nel contrastare lo sviluppo di obesità ed insulino-resistenza, probabilmente modulando alcune attività specifiche dell'adipocita, principale responsabile della regolazione del metabolismo corporeo. L'insulino-resistenza è caratterizzata da una ridotta capacità da parte dell'insulina nel regolare l'omeostasi del glucosio nei tessuti target. In particolare, è stato osservato che la diminuita sensibilità degli adipociti all'insulina rappresenta un evento chiave nell'insorgenza dell'insulino-resistenza. Questo lavoro si propone di valutare gli effetti della C3G sull'omeostasi del glucosio e sulla sensibilità all'insulina in adipociti murini e in adipociti umani primari. In adipociti, esposti a diverse concentrazioni di C3G (0-50 μ M), sono stati saggiate sia l'*uptake* del glucosio che l'espressione del GLUT4.

Metodi. Preadipociti 3T3-L1 sono stati indotti a differenziare mediante una miscela di ormoni. Le cellule sono state utilizzate per gli esperimenti dopo 14 giorni dall'induzione del differenziamento, quando più del 90% delle cellule mostravano il classico fenotipo adipocitario. Gli adipociti umani sono stati isolati da biopsie di tessuto adiposo omentale prelevate da pazienti sottoposti ad interventi chirurgici per patologie benigne. L'*uptake* del glucosio è stato studiato mediante la valutazione dell'incorporazione cellulare di 2-deoxy-D-[³H] glucosio (2-DG) in cellule trattate con differenti concentrazioni di C3G (0-50 μ M), in presenza o meno di stimolazione insulinica. Inoltre sono stati valutati gli effetti di C3G (50 μ M) sulla traslocazione del GLUT4, rispetto al trattamento con insulina

Risultati. Il trattamento con C3G determinava un incremento statisticamente significativo (30%) della sensibilità insulinica sia negli adipociti umani che murini, come chiaramente dimostrato dall'aumento dell'*uptake* del glucosio osservato nelle cellule trattate con C3G in presenza di insulina. Da notare il fatto che la C3G mostrava un'azione insulino-mimetica, come dimostrato dall'aumento dell'*uptake* del glucosio (>50%) osservato nelle cellule in assenza di insulina. L'azione insulino-mimetica della C3G era inversamente proporzionale alla concentrazione della C3G stessa, ed era inoltre accompagnata da un aumento della traslocazione del GLUT4 sulla membrana plasmatica.

Conclusioni. I nostri risultati aprono prospettive future sulle possibili implicazioni terapeutiche delle antocianine nella prevenzione dell'obesità e delle sue complicanze.

L'ACIDO PROTOCATECUICO INDUCE L'ESPRESSIONE DEGLI ENZIMI GLUTATIONE PER OSSIDASI E GLUTATIONE REDUTTASI MEDIANTE L'ATTIVAZIONE DI NRF2 IN J774.A1

Rosaria Vari, Beatrice Scazzocchio, Massimo D'Archivio, Carmela Santangelo, Carmelina Filesi, Claudio Giovannini, Roberta Masella

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Obiettivi. I biofenoli contenuti nell'olio extra vergine d'oliva (EVOO) hanno effetti benefici nella prevenzione di patologie associate a stress ossidativo probabilmente in virtù delle loro proprietà anti-infiammatorie e antiossidanti. L'acido protocatecuico (PCA) contenuto nel EVOO è considerato uno dei maggiori metaboliti che si formano durante l'assorbimento dei biofenoli complessi. Esso, oltre ad essere dotato di attività antiossidante/antinfiammatoria, è capace di modulare diverse attività cellulari. Abbiamo precedentemente dimostrato che il PCA rafforza le difese antiossidanti endogene innalzando i livelli di espressione e le attività degli enzimi del ciclo del glutatione. Lo studio si proponeva di analizzare i meccanismi molecolari coinvolti nell'attivazione della glutatione perossidasi (Gpx) e della glutatione reduttasi (GR) indotta dal PCA nei macrofagi murini J774.A1. In particolare, poiché è noto il coinvolgimento del fattore di trascrizione NF-E2-related factor (Nrf2) nella regolazione degli enzimi antiossidanti e detossificanti di fase II, ne abbiamo valutato l'attivazione da parte di PCA.

Metodi. Le cellule J774.A1 e le J774.A1 silenziate con Nrf2-siRNA sono state mantenute in coltura in DMEM completo; raggiunta la confluenza, sono state incubate in presenza di PCA (0,25mM) per 30', 1h, 2h, 6h e 12h. L'RNA totale, estratto con Trizol, è stato utilizzato per analizzare, mediante RT-qPCR, l'espressione di Nrf2, Gpx e GR. L'espressione proteica di Nrf2 nel nucleo e di GPx e GR nel lisato totale è stata valutata mediante *western blotting*.

Risultati. Il trattamento con PCA induceva nelle J774.A1 un aumento di espressione dell'mRNA a 2h e della proteina a 6h sia di Gpx che di GR. Questo evento era preceduto da un aumento transiente dell'mRNA di Nrf2, con picco a 30', al quale era associato un aumento della proteina nucleare con un massimo di espressione a 2h. Silenziando l'espressione di Nrf2 con specifico siRNA, si è osservata una inibizione dell'aumento dell'espressione di Gpx e di GR indotta da PCA.

Conclusioni. I nostri risultati dimostrano che l'aumentata espressione di GPx e di GR indotta dall'acido protocatecuico è regolata dall'attivazione del fattore di trascrizione Nrf2. Ulteriori studi *in vivo* saranno necessari per validare la reale efficacia e il meccanismo di azione di questo composto fenolico.

SOPRAVVIVENZA DI DUE CEPPI BATTERICI PROBIOTICI, *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* IMC 501 E *LACTOBACILLUS PARACASEI* IMC 502, NEL TRATTO GASTRO-INTESTINALE UMANO E LORO EFFETTO SULLA MICROFLORA INTESTINALE

M. Cristina Verdenelli (a,b), Stefania Silvi (a,b), Cinzia Cecchini (a,b), Carla Orpianesi (a,b), Alberto Cresci (a,b)

(a) *Dipartimento di Scienze Morfologiche e Biochimiche Comparate, Università degli Studi, Camerino, Macerata*

(b) *Synbiotec Srl Spin-off di UNICAM, Camerino, Macerata*

I probiotici vengono definiti come microrganismi vivi che se somministrati in adeguata quantità conferiscono un effetto benefico sulla salute dell'ospite. In questo studio sono state valutate le proprietà probiotiche di diversi ceppi batterici appartenenti al genere *Lactobacillus* isolati dall'intestino umano. I ceppi sono stati identificati e saggiati per la resistenza all'acidità gastrica e agli acidi biliari, per la capacità di adesione a cellule HT-29, per la loro attività antipatogenica e sensibilità agli antibiotici ed inoltre valutato il profilo plasmidico. Dallo studio effettuato, due ceppi, *L. rhamnosus* IMC 501 and *L. paracasei* IMC 502, sono risultati resistenti al pH gastrico e agli acidi biliari. Nel saggio dell'attività antimicrobica, entrambi i ceppi sono risultati possedere delle proprietà inibitorie verso dei microrganismi potenzialmente patogeni, in particolare verso ceppi di *Candida albicans*. I due ceppi probiotici selezionati hanno dimostrato di avere un'elevata capacità di adesione alle cellule HT-29, incrementando questa loro caratteristica quando vengono usati in combinazione, ed inoltre di essere resistenti alla vancomicina, colistina solfato, gentamicina, acido oxolinico e kanamicina. Tramite uno studio clinico su volontari umani, è stata studiata sia la sopravvivenza dei due ceppi probiotici selezionati, somministrati per tre mesi con la normale dieta, sia la loro presenza nelle feci anche dopo sospensione del trattamento ed inoltre l'effetto modulatore sulla microflora intestinale. Dallo studio risulta quindi che i ceppi *L. rhamnosus* IMC 501 e *L. paracasei* IMC 502 mostrano delle proprietà ceppo specifiche, indispensabili per il loro utilizzo come probiotici in alimenti funzionali in grado di apportare effetti benefici sulla salute dell'uomo.

INDICE DEGLI AUTORI

- Adorini, L.; 13
Agostinelli, E.; 26
Alesiani, D.; 32
Amatiste, S.; 80
Ammendolia, M.G.; 49; 75; 80; 85
Andreola, F.; 15
Angelici, M.C.; 21; 48
Angiolella, L.; 45; 47
Arancia, G.; 26; 29; 30; 45
Aureli, P.; 80
Bagnato, M.; 62
Bassetti, D.; 79
Belardelli, F.; 20; 89
Bellavite, P.; 19
Berlutti, F.; 14
Bertuccini, L.; 84
Boffi, A.; 8
Bonadies, F.; 7
Bonesi, M.; 33
Bonura, A.; 46
Botta, B.; 8
Buonanno, F.; 48
Calcabrini, A.; 29; 45
Cammarano, R.R.; 76
Campagna, P.; 77
Canessa, A.; 79
Canini, A.; 32
Caracci, A.; 25
Carluccio, A.; 78
Carollo, M.; 89
Cassone, A.; 44; 45
Cavalli, P.; 60
Cecchini, C.; 92
Checoni, P.; 43
Chirumbolo, S.; 19
Cicconi, R.; 32
Civitelli, G.; 30
Cocco, G.; 7
Colombo, P.; 46
Colone, M.; 29; 45; 47
Colucci, M.; 18
Comanducci, A.; 84
Cometa, M.F.; 71
Condello, M.; 26; 30
Conforti, A.; 19
Conforti, F.; 33
Conte, M.P.; 84
Corinti, S.; 46
Cortese, C.; 69; 82
Cottarelli, A.; 25; 83
Cresci, A.; 92
Cruciali, M.; 79
D'Archivio, M.; 90; 91
D'Asero, C.; 86
D'Auria, F.D.; 47
De Bernardis, F.; 44
De Feo, V.; 31
De Martino, L.; 31
De Mico, A.; 83
De Tommasi, N.; 6
Della Seta, M.; 76
Delle Monache, G.; 8
Di Felice, G.; 46
Di Giannuario, A.; 18
Di Leginio, E.; 57
Diociaiuti, M.; 29
Dofrelli, E.; 49
Donatelli, I.; 49
Fabbri, A.; 17
Fabiani, C.; 49
Falzano, L.; 17
Federici, E.; 30
Federici, M.; 15
Ferrea, G.; 79
Ferrini, A.M.; 80
Figura, N.; 37
Filesì, C.; 91
Fiorentini, C.; 17
Firenzuoli, F.; 69; 82
Fuggetta, M.; 25; 83
Fuselli, S.; 80
Gallo, E.; 69

Gallo, F.R.; 10
 Galvano, F.; 90
 Garaci, E.; 15
 Gauzzi, M.C.; 20
 Geraci, A.; 53
 Gessani, S.; 20; 89
 Giacinti, G.; 80
 Giacomazza, D.; 46
 Giordani, C.; 29
 Giordano, N.; 37
 Giovannini, C.; 91
 Girolamo, A.; 44; 45
 Gori, L.; 69; 82
 Guida, S.; 25
 Guiso, M.; 7
 Iebba, V.; 84
 Iorio, E.; 28
 Koverech, A.; 64
 Lanzilli, G.; 25; 83
 Latorre, D.; 89
 Laviola, G.; 64
 Legnani, W.; 58
 Lista, P.; 30
 Loizzo, M.R.; 33
 Longhi, C.; 84
 Luvisetto, S.; 17
 Malchiodi-Albedi, F.; 21
 Malorni, W.; 17
 Mancini, L.; 86
 Mangoni, M.L.; 86
 Mannoni, V.; 80
 Marazzato, M.; 84
 Marcheggiani, S.; 86
 Marchetti, M.; 75; 85
 Marinelli, S.; 17
 Marra, M.; 29
 Martini, S.; 37
 Mascherini, V.; 69; 82
 Masella, R.; 90; 91
 Massai, D.; 82
 Mastrangelo, N.; 45
 Mastriota, M.; 18
 Mattei, M.; 32
 Matteucci, A.; 21
 Mattioli, L.; 63
 Mazzanti, G.; 55
 Melino, S.; 28; 39
 Menichini, Fe.; 33
 Menichini, Fr.; 33
 Menniti-Ippolito, F.; 67
 Mercuri, L.; 15
 Meschini, S.; 29; 30
 Miccinilli, R.; 59
 Minelli, E.; 56
 Molicotti, P.; 38
 Molinari, A.; 26; 29
 Mondello, F.; 29; 39; 44; 45
 Montel, C.; 80
 Morlino, R.; 80
 Nencioni, L.; 43
 Nicoletti, M.; 1
 Nicoletti, R.; 7
 Oliva, B.; 80
 Orpianesi, C.; 92
 Ortenzi, C.; 48
 Ortolani, R.; 19
 Paci, M.; 28; 39
 Pacifici, R.; 68
 Paesano, R.; 14
 Palamara, A.T.; 43; 47
 Palazzino, G.; 9
 Pantanella, F.; 14
 Pavone, F.; 17
 Perfumi, M.; 63
 Petrini, C.; 88
 Petruzzelli, R.; 39
 Pichini, S.; 68
 Pieretti, S.; 18
 Pierimarchi, P.; 15
 Pietrantoni, A.; 49
 Podo, F.; 28
 Pontieri E.; 80
 Pradel, P.; 80
 Puddu, P.; 89
 Purificato, C.; 20
 Puzelli, S.; 49
 Ragno, R.; 47
 Rasi, G.; 15
 Ravagnan, G.; 25
 Romussi, G.; 79
 Rosati, R.; 80
 Sabelli, R.; 28

Salvatore, G.; 5
Sampietro, F.; 79
Sanasi, M.F.; 7
Sanseverino, I.; 20
Santangelo, C.; 91
Santucci, A.; 37
Sanzini, E.; 70
Saponaro, M.; 61
Sartorelli, G.; 47
Scazzocchio, B.; 90; 91
Schippa, S.; 84
Seganti, L.; 84
Serafini, M.; 54
Serafino, A.; 15
Silecchia, G.; 90
Silvi, S.; 92
Sinibaldi Vallebona, P.; 15
Sivric, S.; 47
Soricelli, E.; 90
Spurio, R.; 86
Statti, G.A.; 33
Straface, E.; 17
Stringaro, A.; 29; 45; 47
Superti, F.; 49; 75; 80; 84; 85
Tammaro, A.; 80
Tempera, G.; 26
Tinari, A.; 49
Toccaceli, L.; 29; 45
Torge, R.; 8
Tricarico, M.; 25; 83
Tundis, R.; 33
Unfer, V.; 60
Valenti, P.; 14; 89
Vari, R.; 90; 91
Varisco, G.; 80
Vavala, E.; 47
Vella, A.; 19
Verdenelli, M.C.; 92
Verdier-Metz, I.; 80
Viceconte, N.; 26
Virmani, A.; 64
Zonfrillo, M.; 15

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, gennaio-marzo 2009 (n.1) 3° Suppl.