

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.

