



Rapporti

ISTISAN

11/19



Primo Convegno Nazionale
Sostanze naturali:
dalla ricerca di base all'applicazione clinica



ISSN 1123-3117

ATTI
A cura di
A. Geraci, F. Mondello e A. Stringaro

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

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

**Istituto Superiore di Sanità
Roma, 23-25 marzo 2009**

ATTI

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

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

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
11/19**

Istituto Superiore di Sanità

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

A cura di Andrea Geraci, Francesca Mondello e Annarita Stringaro
2011, vi, 200 p. Rapporti ISTISAN 11/19

Il convegno è stato organizzato dal Gruppo di Studio dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) "Terapie Innovative e Sostanze Naturali" (TISNa), costituitosi nel 2008 dalla collaborazione dei dipartimenti del Farmaco, di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate e di Tecnologie e Salute. Questo evento ha rappresentato il primo incontro nazionale sull'argomento "Sostanze Naturali" con l'obiettivo di focalizzare l'attenzione sulle ricerche più recenti riguardanti la caratterizzazione chimica, le attività biologiche, le applicazioni cliniche, il profilo di sicurezza, gli aspetti regolatori delle sostanze e/o molecole di origine naturale. A questo evento ha contribuito un elevato numero di ricercatori appartenenti sia all'ISS, sia alle Università e Centri di ricerca dislocati su tutta la penisola. Al termine del convegno è emerso chiaramente che dalla "natura" potranno essere ottenute nuove soluzioni sia preventive sia terapeutiche, la cui efficacia e sicurezza saranno raggiunte applicando una ricerca su solide basi scientifiche, per garantire *in primis* la salute pubblica.

Parole chiave: Prodotti naturali; Farmaci; Alimenti; Interazioni

Istituto Superiore di Sanità

1st National Conference. Natural Products: from Scientific Research to Clinical Application. Istituto Superiore di Sanità, Rome, March 23-25, 2009.

Edited by Andrea Geraci, Francesca Mondello and Annarita Stringaro
2011, vi, 200 p. Rapporti ISTISAN 11/19 (in Italian)

This conference has been organized by the Istituto Superiore di Sanità (ISS) Study Group called "Novel Therapies and Natural Products" (TISNa). This group was born in 2008, under an intra-departmental agreement made among the Drug, Infectious Diseases, Technology and Health Departments. This event represented the first national meeting focused on the issue "Natural Products" and on the most recent findings related to chemical characterization, biological activity, clinical applications, safety evaluation and regulatory aspects of the molecular and/or substantial natural products. This symposium was attended by an elevated number of researchers from both ISS and Universities and Research Centres all over the Country. At the end of the conference it was made clear what we can expect from "nature": a new range of preventive and therapeutic solutions whose efficacy and safety will be granted only by the application of research based on solid scientific grounds to secure *in primis* public health.

Key words: Natural products; Drugs; Food; Interactions

Si ringrazia la sig.ra Valentina Cecchetti della Segreteria Scientifica e Gestione del Personale del Dipartimento MIPI per aver curato l'editing e l'elaborazione grafica del presente Rapporto e la dr.ssa Giuseppina Mandarino del Reparto Micosi Superficiali e Sistemiche del Dipartimento MIPI per la revisione della bibliografia.

Si ringrazia inoltre Veronica Bizzotti, Alessia Caratelli, Daniela Casale, Debora Lepore della Segreteria Scientifica e Gestione del Personale del Dipartimento MIPI per l'elevata qualità dell'assistenza segretariale e tecnica dell'organizzazione del Convegno.

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

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Geraci A, Mondello F, Stringaro A (Ed.). *I Convegno Nazionale. Sostanze naturali: dalla ricerca di base all'applicazione clinica. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 23-25 marzo 2009. Atti.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/19).

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, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2011



INDICE

Prefazione <i>Antonio Cassone</i>	iv
Introduzione	1
Sintesi della lettura magistrale. Sostanze naturali all'alba del nuovo millennio <i>Marcello Nicoletti</i>	2
<hr/>	
SESSIONE I	
Chimica delle sostanze naturali	5
Propedeutica chimica alle proprietà biologiche e terapeutiche degli oli essenziali <i>Giuseppe Salvatore</i>	7
Studio dell'attività biologica di sostanze naturali mediante tecniche spettroscopiche e spettrometriche <i>Fabrizio Dal Piaz, Laura Faiella, Nunziatina De Tommasi</i>	13
Sintesi di apolidinoni, composti ad attività antitumorale <i>Francesco Bonadies, Gianfranco Cocco, Marcella Guiso, Rosario Nicoletti, Maria Filomena Sanasi</i>	17
Studi di sostanze naturali con attività terapeutica da piante dalla medicina tradizionale: le specie di <i>Hypoxis</i> <i>Giovanna Palazzino</i>	23
Metodi di HPLC e HPTLC messi a confronto per la determinazione del <i>fingerprinting</i> della <i>Lawsonia inermis</i> L. <i>Francesca Romana Gallo</i>	31
<hr/>	
SESSIONE II	
Attività immunomodulanti e antinfiammatorie delle sostanze naturali	37
Molteplici ruoli del sistema vitamina D nella regolazione della risposta immunitaria <i>Luciano Adorini</i>	39
Importanza della lattoferrina nell'omeostasi sistemica del ferro <i>Alessandra Frioni, Tiziana Natalizi, Melissa Tendini, Enrica Pacifici e Piera Valenti</i>	44
Effetto stimolatorio dell'olio essenziale di eucalipto sull'immunità innata cellulo-mediata <i>Annalucia Serafino, Federica Andreola, Manuela Zonfrillo, Luana Mercuri, Memmo Federici, Noemi Moroni, Rossana Psaila, Pasquale Pierimarchi</i>	50
Il CNF1 di <i>Escherichia coli</i>: una sostanza naturale di origine batterica con potenziali proprietà terapeutiche <i>Alessia Fabbri, Sara Travaglione, Carla Fiorentini</i>	56
Prodotti naturali ad attività analgesiche e antinfiammatorie <i>Mariantonella Colucci, Amalia Di Giannuario, Marica Mastriota, Stefano Pieretti</i>	61

Attività modulatoria del flavonoide naturale quercetina sulla funzione di basofili umani <i>in vitro</i> <i>Salvatore Chirumbolo, Anita Conforti, Antonio Vella, Riccardo Ortolani, Paolo Bellavite...</i>	66
Attività immunomodulatoria della vitamina D3 in cellule dendritiche umane <i>Maria Cristina Gauzzi, Cristina Purificato, Isabella Sanseverino, Manuela Del Cornò, Filippo Belardelli, Sandra Gessani</i>	70
<hr/>	
SESSIONE III	
Sostanze naturali e attività antitumorale <i>in vitro</i>	75
Il resveratrolo: una molecola naturale ad ampio spettro con attività antitumorale <i>Maria Pia Fuggetta, Giulia Lanzilli, Maria Tricarico, Andrea Cottarelli, Serena Guida, Giampiero Ravagnan</i>	77
Composti organici naturali contenenti zolfo estratti dall'aglio: studi sul meccanismo d'azione per la prevenzione e la terapia del cancro <i>Sonia Melino, Renato Sabelli, Egidio Iorio, Maurizio Paci</i>	81
Effetto del <i>tea tree oil</i> e del suo componente attivo terpinen-4-olo sulla migrazione e l'invasione delle cellule di melanoma umano <i>Giuseppina Bozzuto, Marisa Colone, Laura Toccaceli, Annarita Stringaro, Agnese Molinari</i>	85
L'alcaloide vegetale voacamina induce morte autofagica in cellule tumorali umane farmacoresistenti <i>Pasquale Lista, Maria Condello, Elena Federici, Gabriele Civitelli, Giuseppe Arancia, Stefania Meschini</i>	89
Composizione fitochimica e attività citotossica <i>in vitro</i> dell'olio essenziale di <i>S. acetabulosa</i> L. <i>Monica R. Loizzo, Federica Menichini, Rosa Tundis, Marco Bonesi, Giancarlo A. Statti, Filomena Conforti, Francesco Menichini</i>	93
<hr/>	
SESSIONE IV	
Sostanze naturali con attività antimicrobica	99
Peptidi antimicrobici: una naturale difesa dell'organismo e una potenziale terapia <i>Sonia Melino, Ridvan Nepravishta, Francesca Mondello, Maurizio Petruzzelli, Maurizio Paci</i>	101
Attività antivirale delle sostanze naturali <i>Paola Checconi, Lucia Nencioni, Anna Teresa Palamara</i>	105
Oli essenziali: ruolo e prospettive d'uso nelle infezioni fungine <i>Francesca Mondello, Antonietta Girolamo, Antonio Cassone</i>	110
Meccanismo di azione e proprietà terapeutiche dell'olio essenziale di <i>Melaleuca alternifolia</i> su ceppi farmacosensibili e farmacoresistenti di <i>Candida albicans</i> <i>Marisa Colone, Francesca Mondello, Annarica Calcabrini, Laura Toccaceli, Letizia Angiolella, Antonietta Girolamo, Nicolina Mastrangelo, Giuseppe Arancia, Antonio Cassone, Annarita Stringaro</i>	120

Fattore anti-LPS da <i>Parietaria judaica</i> <i>Angela Bonura, Daniela Giacomazza, Silvia Corinti, Gabriella Di Fel, Fabrizio Gianguzza, Paolo Colombo</i>	126
Attività antimicotica dell'olio essenziale di <i>Mentha suaveolens</i> <i>Letizia Angiolella, Elisabetta Vavala, Rino Ragno, Annarita Stringaro, Marisa Colone, Silvia Sivric, Gianni Sartorelli, Felicia Diodata D'Auria, Anna Teresa Palamara</i>	129
Climacostolo: nuovo antibiotico? <i>Federico Buonanno, Maria Cristina Angelici, Claudio Ortenzi</i>	134
Attività della lattoferrina bovina sull'infezione da virus influenzale <i>Agostina Pietrantonio, Antonella Tinari, Maria Grazia Ammendolia, Eleonora Dofrelli, Simona Puzelli, Concetta Fabiani, Isabella Donatelli, Fabiana Superti</i>	143
<hr/>	
SESSIONE V	
Sostanze naturali: le applicazioni cliniche	149
Complessità in natura e salute umana <i>Andrea Geraci</i>	151
Studio moderno delle piante officinali: le piante adattogene <i>Mauro Serafini</i>	155
La fitoterapia tradizionale cinese tra personalizzazione ed <i>Evidence Based Medicine (EBM)</i> <i>Emilio Minelli</i>	159
La farmacopea ayurvedica come fonte di sostanze naturali per la pratica clinica <i>Edoardo Di Leginio</i>	165
Terapia complementare oncologica con <i>Viscum album</i>: dalla tradizione alla ricerca scientifica <i>Walter Legnani</i>	171
Acido folico e mio-inositolo per una prevenzione totale dei difetti del tubo neurale <i>Vittorio Unfer, Pietro Cavalli</i>	177
Microdosi <i>Marcella Saponaro</i>	182
Acquisizioni in campo oncologico sull'azione terapeutica di funghi epigei. Analisi epidemiologica e fenomenologica <i>Maurizio Bagnato, Stefano Rizzo</i>	187
Ruolo di composti naturali come il coenzima Q10 nella terapia della neurotossicità associata al Parkinson <i>Ashraf Virmani, Franco Gaetani, Aleardo Koverech, Giovanni Laviola</i>	191
<hr/>	
SESSIONE VI	
Profilo di sicurezza e aspetti regolatori	195
Integratori alimentari a base di piante ed estratti vegetali <i>Brunella Carratù, Elisabetta Sanzini</i>	197

PREFAZIONE

Nella prefazione al I Convegno Nazionale sulle Sostanze Naturali, tenutosi in Istituto a marzo del 2009, dicevo testualmente che “l’interesse per le attività biologiche delle sostanze di origine naturale è in progressiva crescita e questo non può non attrarre l’attenzione degli enti di ricerca e dei loro rispettivi programmi”. A distanza di un paio d’anni, l’interesse per queste sostanze non solo si è viepiù espanso ma sono stati lanciati programmi di ricerca da importanti Enti finanziatori quali la Comunità Europea e il *National Institutes of Health* di Bethesda (NIH) in cui speciali sezioni sono state dedicate a questa materia, spesso in combinazione con ricerca sui nanomateriali e le tecniche di microincapsulazione.

Il settore ha raggiunto rapidamente una tale notevole consistenza che non ci sono grandi Istituzioni di ricerca che al loro interno non abbiano gruppi attivi e propositivi. Colpisce altresì il numero di brevetti recentemente depositati sulla scoperta e l’uso di principi e formulazioni di prodotti da sostanze naturali. Nel database *della United States Patent and Trademark Office* (USPTO) e dell’Ufficio Brevetti Europeo si possono trovare decine di brevetti d’uso per il solo *tea tree oil*, che includono applicazioni microbiologiche, dermatologiche, immunologiche, dispositivi medici e prodotti d’erboristeria e industriali.

Quello che spesso manca è una solida definizione degli standard insieme ad un significativo progresso nella conoscenza dei modi d’azione delle numerosissime formulazioni, aree queste che costituiscono delle criticità per ulteriori progressi. I contenuti di questo primo Convegno forniscono peraltro una prova di quanto i ricercatori impegnati nelle variegata indagini sulle sostanze naturali avvertano anche l’esigenza di meglio definire le aree di potenziale impiego di queste sostanze, evitando che diventino la panacea di tutti i mali.

I ricercatori del gruppo Terapia Innovative e Sostanze Naturali (TISNa) in particolare, hanno dimostrato in questi anni piena coscienza degli attuali limiti investigativi insieme alle grandi potenzialità che la Natura, in particolare le piante, continua a offrirci per il mantenimento dell’omeostasi cellulare, l’integrazione delle funzioni organiche, il benessere psico-fisico individuale e collettivo, in una parola la Sanità Pubblica.

Il mio plauso al TISNa, e il mio augurio, sono ora alla continuità, alla capacità di interagire, di formare squadra, di creare innovazione, di fare ricerca di qualità internazionale di essere quindi a pieno titolo “ricercatori di Sanità Pubblica”.

Antonio Cassone

*Già Direttore
Dipartimento di Malattie Infettive,
Parassitarie ed Immunomediate (MIPI)*

INTRODUZIONE

Il Convegno “Sostanze naturali: dalla ricerca di base all’applicazione clinica” rappresenta il primo incontro nazionale sull’argomento “Sostanze Naturali”, svolto presso l’Istituto Superiore di Sanità (ISS). Esso, insieme al workshop “Sostanze naturali: attività farmacologica, meccanismo d’azione, aspetti applicativi e normativi” del 26 giugno 2008, unitamente ai seminari mensili che si svolgono presso il nostro Istituto, sono il frutto della collaborazione dei dipartimenti del Farmaco, di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate e di Tecnologie e Salute che hanno dato vita nel 2008 al gruppo di studio dell’ISS “Terapie Innovative e Sostanze Naturali” (TISNa). La nascita di questo gruppo di studio è stato un evento quasi obbligato visto che in molti dipartimenti dell’ISS si utilizzano da diverso tempo, nell’ambito dell’attività di ricerca, le sostanze naturali. Il gruppo di studio TISNa, costituitosi spontaneamente e in maniera interdipartimentale, è nato quindi con lo scopo di favorire lo scambio di informazioni relative alle ricerche in corso, tenendo conto delle diverse competenze presenti all’interno del nostro Istituto e con il fine ultimo di stimolare la nascita di future collaborazioni e progetti di ricerca. Queste giornate sono state un’occasione per approfondire ulteriormente l’argomento “Sostanze Naturali” che rappresenta un enorme potenziale serbatoio di soluzioni per la salute umana, ma solo dopo che esse siano state sottoposte al vaglio di una rigorosa ricerca scientifica e al controllo delle autorità competenti. Questi studi hanno quindi lo scopo di trovare nuovi approcci preventivi e terapeutici, eventualmente sinergici con i farmaci di sintesi, per migliorare la risposta al bisogno di salute, oltre che a soddisfare le curiosità scientifiche.

L’interesse per le attività biologiche delle sostanze di origine naturale è in progressiva crescita per diverse ragioni culturali, scientifiche ed economiche. È sotto gli occhi di tutti un aumento da parte della popolazione dell’utilizzo di integratori alimentari e di varie sostanze a base di prodotti di origine naturale che spesso non sono né standardizzati, né studiati per tutte le loro possibili conseguenze e azioni, sia benefiche che avverse. Inoltre la progressiva mancanza di farmaci antimicrobici, con l’associata crescente farmaco-resistenza, lo scarso coinvolgimento delle grandi industrie nella ricerca sui farmaci orfani, gli effetti avversi e il costo elevato dei farmaci di sintesi hanno sollecitato anche l’attenzione del mondo scientifico e industriale verso lo studio dell’ampio spettro di attività biologiche delle sostanze naturali. In tale contesto, in cui si rende necessario compiere ricerche con basi sperimentali accurate e con rigoroso metodo scientifico, queste giornate congressuali rappresentano un’occasione particolare per approfondire alcuni aspetti emergenti della ricerca sulle sostanze di origine naturale. Ci si prefigge anche di dare un contributo alla crescita scientifico-culturale e multidisciplinare in questo campo della ricerca, promuovendo la nascita di future collaborazioni con le strutture regionali, le università e gli altri enti di ricerca presenti in Italia. Il Convegno si è articolato durante tre giorni, 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. In particolare, i temi trattati in questo contesto si sono focalizzati soprattutto sulle ricerche più recenti. I contributi che vengono riportati in questo volume sono le relazioni di alcuni interventi presentati durante le tre giornate del convegno.

I curatori del Rapporto

SINTESI DELLA LETTURA MAGISTRALE SOSTANZE NATURALI ALL'ALBA DEL NUOVO MILLENNIO

Marcello Nicoletti

Dipartimento di Biologia Vegetale, Sapienza Università di 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 e 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 e adattare le potenzialità delle sostanze naturali con una produzione continua di nuovi farmaci e di prodotti a varia utilità.

Tra le principali caratteristiche del fenomeno, una certa trasversalità che ha teso a travalicare precedenti definizioni, norme e atteggiamenti, creando anche confusione e aprendo la strada a disinformazione, ma in ogni caso ha avuto la positività di investire in modo evidente in tutti i possibili prodotti del settore con una ventata di rinnovamenti e novità. Come in una primavera accelerata, antichi rami si sono rivitalizzanti, mentre intere nuove tipologie sono state prodotte, generando un quadro inizialmente caotico, ma anche ricco di vitalità e interessi. Come isole in un mare agitato, si sono consolidate nuove e vecchie tipologie e sono emersi nuovi fenomeni, tra i quali: i nutraceutici, nell'arcipelago degli integratori alimentari e dei prodotti dietetici, seguiti dai cosmeceutici, per la cura del corpo a vari livelli suffragati dall'equazione salute=benessere=bellezza, e infine la gamma variegata dei fitoterapici, per il più o meno conclamato trattamento di una gamma infinita di patologie di vario livello. L'abuso della desinenza "ceutico" testimonia la propensione per proprietà salutistiche, caratterizzante la grande maggioranza dei prodotti, in sintonia con la richiesta di mercato e le aspirazioni dei produttori.

Una costellazione di prodotti, generati dall'attività creatrice di industrie piccole e medie, frutto dell'esplosione di interesse commerciale verso i prodotti naturali, generata a sua volta dallo spostamento di importanti quote di consumatori. In effetti, tra i punti di forza del settore, un posto speciale va assegnato di diritto al mondo produttivo, che con vitalità e capacità

sorprendenti, è stato in grado di rispondere prontamente alla richiesta del mercato, contribuendo positivamente all'apertura e al consolidamento dei nuovi settori. Come in altri casi, caratterizzati da una rapida crescita, esiste un problema di qualità, che investe non solo il livello di preparazione, ma va dalla necessità di controlli fino ai *claims*. Questo aspetto sarà sicuramente determinante nel prossimo futuro. L'unico apporto decisivo, che potrà evitare la perdita di buona parte della produttività traducendosi in calo di numero di aziende e posti di lavoro, sarà la validazione scientifica, in quanto richiesta con forza in primo luogo dalle normative europee, e in ogni caso necessaria per rendere credibile e adatto il settore.

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 a raggiungere un 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 e il rispetto della comune appartenenza al progetto naturale, tra l'adesione generale ad una spinta propulsiva rinnovatrice e un progresso consapevole rallentato.

Questa dicotomia pesa su tutte le decisioni e ci coinvolge, da quelle personali quotidiane a quelle planetarie sul futuro imminente. Se commetteremo degli errori, 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

PROPEDEUTICA CHIMICA ALLE PROPRIETÀ BIOLOGICHE E TERAPEUTICHE DEGLI OLI ESSENZIALI

Giuseppe Salvatore
Accademia di Storia dell'Arte Sanitaria, Roma

Introduzione

Tra le preparazioni vegetali, l'olio essenziale rappresenta la forma più concentrata di sostanze naturali (tra 2 mL/kg e 150 mL/kg droga essiccata). Si ottiene da una matrice vegetale posta in idro-distillazione o in corrente di vapore, da cui si liberano le sostanze volatili. Queste in minima parte rimangono solubilizzate nell'acqua di distillazione, ma in prevalenza vi affiorano separandosi in superficie, costituendo il cosiddetto olio essenziale, che ha proprietà chimiche e chimico-fisiche distintive, organolettiche che ricordano la pianta da cui deriva e biologiche spesso di significativo valore scientifico e applicativo.

Gli oli essenziali erano merce pregiata di scambio tra i popoli; giungevano in occidente, nei laboratori alchemici e nelle spezierie lungo interminabili carovaniere e rotte marine della *via delle essenze*. Prevedibilmente, vi giungevano spesso in forma tagliata o alterata rispetto al prodotto naturale originario a cura dei mercanti. Sempre raccontavano una storia di usi antichi, di riti e di tradizioni esotiche e di promesse di utilità, tra le più stravaganti, principalmente per le sensazioni olfattive che destavano e che erano più gradevoli di quelle offerte dall'inadeguata pulizia personale e dal degrado igienico e ambientale delle città di allora. Oggi trovano rinnovate applicazioni, nella produzione di prodotti di largo consumo: alimenti, bevande, integratori, prodotti farmaceutici, cosmetici, di igiene personale e domestica, aromi e fragranze, sostanze chimiche isolate o riprodotte per sintesi chimica. Sono applicati, previo aromagramma, in aromaterapia; ma questo termine è utilizzato, con significato improprio, in altri contesti più propri dell'aromacologia.

Chimica degli oli essenziali

La chimica descrive queste sostanze volatili primariamente nel ruolo e nelle trasformazioni fisiologiche cui partecipano nella pianta viva, indicandole con la denominazione generica di metaboliti secondari, poi nella composizione che hanno nelle parti separate o recise della pianta, fresche o essiccate, e in quella finale dell'olio essenziale distillato, eventualmente manipolato come posto in commercio, per essere utilizzato tal quale o nei prodotti finiti. Infatti, gli oli essenziali sono commercializzati deterpenati, sesquideterpenati, rettificati, privati parzialmente o totalmente di un particolare costituente, addizionati di antiossidanti e perfino adulterati e sofisticati.

I requisiti di conformità a specifici standards, chimico-fisici e di composizione chimica, sono posti dalle farmacopee nazionali e internazionali (per esempio, la *British Pharmacopoeia*, *United States Pharmacopoeia*, *European Pharmacopoeia*), dalla *Scientific Committee of the Essential Oil Association* (EOA Standards), dall'industria degli aromi (*Food Chemicals Codex*, *Flavour & Fragrances Houses*) e da enti autonomi di certificazione (*International Standards Organisation* - ISO Standards TC54, *Association Française de Normalisation* - AFNOR); a

questi standards devono, comunque, far riferimento i produttori e distributori di oli essenziali nel soddisfare specifiche richieste degli utilizzatori, i quali richiedono convenienza di prezzo, garanzie di autenticità, di provenienza e di costanza dei parametri caratteristici nei futuri acquisti. Spesso l'origine e la provenienza delle droghe vegetali e dei loro oli presentano composizioni e chemotipi distintivi (talvolta di piante autoctone) e caratteristiche organolettiche che denotano una migliore qualità. Nondimeno si ritrovano sul mercato oli ricostituiti (propriamente detti, rinforzati, misti, di fantasia) derivanti da manipolazioni e preparazioni chimiche che sono il frutto della capacità creativa di speciali formulatori, che ne rivendicano la proprietà intellettuale e la riservatezza industriale della composizione (1).

Gli oli essenziali possono essere tagliati e variamente adulterati; i modi con cui ciò avviene più frequentemente sono: a) aggiunta di singole materie prime come diluenti inodori (per esempio, solventi organici, materie prime di profumeria od oli vegetali; all'esame di routine gascromatografico queste sostanze possono non essere rivelabili oppure se rivelabili sono spesso identificabili con difficoltà soprattutto quando si tratta di miscele complesse che danno numerosi picchi gascromatografici); b) aggiunta di oli essenziali più a buon mercato o aggiunta di specifiche sostanze per far passare un olio per un altro; c) aggiunta di sostanze sintetiche (naturali-identiche) a un olio che le contiene naturalmente (per esempio, aggiunta di linalolo e linalile acetato all'olio di bergamotto; aggiunta di *p*-cimene e timolo all'olio di timo; aggiunta di terpinen-4-olo, α - e γ -terpinene al *tea tree oil*); d) aggiunta di isolati o componenti naturali; e) aggiunta di oli essenziali ricostituiti a oli essenziali di maggior valore commerciale; f) aggiunta di oli normali a oli certificati.

Tra le varie pratiche di sofisticazione è singolare quella di oli di timo del commercio caratterizzati da uno scarso contenuto di timolo e da una marcata presenza di isopropilcresoli (fino al 50%); questi composti sono stati identificati mediante gascromatografia-spettrometria di massa e risonanza magnetica nucleare, quali prodotti di reazione tra il cresolo e l'alcool isopropilico (2, 3). Altri esempi di adulterazione di numerosi oli essenziali sono stati descritti da Burfield nell'*International Federation of Aromaterapist Annual AGM* che si è svolto a Londra l'11 ottobre 2003.

La genuinità e l'identità di un olio essenziale sono normalmente valutate eseguendo saggi chimici e chimico-fisici di uso comune e metodologie strumentali diverse, che solo pochi laboratori sono in grado di attuare. I parametri organolettici sono i primi a essere considerati; spesso l'odore già da solo può fornire indicazioni sulla scarsa qualità di un olio.

La rispondenza ai parametri classici, chimico-fisici (solubilità, densità relativa, indice di rifrazione, potere rotatorio, assorbimento nell'ultravioletto) e chimici (indice di acidità, indice di esteri e tenore in esteri, tenore di alcoli liberi e totali, alcoli terziari, fenoli, aldeidi, chetoni, determinazione di specifiche sostanze, per esempio rodinolo, citronellolo, citronellale, cineolo, aldeide benzoica, metilantranilato di metile), e a quelli fissati nelle monografie di farmacopea o ISO, non può essere sufficiente a garantire la genuinità e l'autenticità di un prodotto. L'applicazione integrata di tecniche cromatografiche e strumentali è la soluzione, purtroppo complessa e costosa, attualmente adottata nei moderni laboratori che si occupano di sostanze naturali; normalmente per avere indicazioni e conferme di autenticità o di adulterazione di un olio si ricorre alla cromatografia su strato sottile (TLC), alla gas-cromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC/FID) con colonne capillari, apolari, polari o chirali, alla gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC/MS) e alla risonanza magnetica nucleare (^{13}C -NMR). Un accenno merita la micro-estrazione in fase solida (*Solid Phase Micro-Extraction*, SPME), una tecnica che consente l'esame diretto della componente volatile di una matrice solida, liquida o viscosa che si diffonde nel suo intorno, e ciò senza ricorrere all'estrazione con solventi organici spesso tossici (4). La SPME può essere vantaggiosamente utilizzata nel caso di droghe vegetali destinate alla distillazione di oli essenziali, allo scopo di

avere una preliminare conoscenza delle sostanze volatili, tra cui quelle dotate di una certa tossicità. Nell'esposizione orale sono stati presentati i profili gas cromatografici di numerose droghe vegetali, tutte descritte nella *European Pharmacopoeia* (5).

Nell'esaminare la composizione chimica, quali-quantitativa, dei componenti di un olio essenziale, una particolare attenzione viene solitamente riposta al *fingerprinting* fitochimico e ai marker *compounds*, la cui presenza può essere indice di specificità per stabilire la provenienza di un olio in esame da una data specie vegetale oppure per accertare un'adulterazione. In alcuni casi oli essenziali di specie vegetali diverse presentano una composizione dei principali componenti praticamente comparabile, ma si differenziano tra loro per la presenza o meno di talune sostanze secondarie. Così, per esempio, la presenza di pseudoeugenil-2-metilbutirato conferma la genuinità dell'olio di *Pimpinella anisum*, nel mentre la stessa sostanza è assente nell'olio di *Illicium verum*. L'aggiunta a scopo di adulterazione di sostanze di sintesi naturali-identiche può essere evidenziata attraverso le loro impurezze, che non si ritrovano in natura (per esempio: *cis*-anetolo quale impurezza dell'anetolo di sintesi; deidrolinalolo, diidrolinalolo, tetraidrolinalolo sono impurezze del linalolo di sintesi; 5-fenil penta-2,4-dienale si ritrova come impurezza nell'aldeide cinnamica di sintesi). La composizione quali-quantitativa alterata di alcune sostanze rispetto a quella originaria, poi, può essere indice di ossidazione del prodotto, come nel caso del *tea tree oil* in cui l'alterazione del prodotto è evidenziata dall'aumento di *p*-cimene e dalla diminuzione dei terpeni.

Tra i componenti di un olio essenziale ve ne sono di quelli che presentano il fenomeno dell'isomeria ottica e spesso gli isomeri (enantiomeri) di una stessa sostanza hanno rapporti percentuali distintivi; ma le corrispondenti proprietà chimiche, chimico-fisiche, farmacologiche e tossicologiche sono tra loro differenti. Quindi, è utile poterli identificare e dosare in un olio essenziale; la gascromatografia con colonne chirali è la tecnica strumentale utilizzata al riguardo.

Queste considerazioni sottolineano l'importanza del fatto che le droghe vegetali e gli oli relativi destinati alla ricerca o agli usi previsti, siano garantiti per la qualità e sicurezza. Quindi essi devono essere di provenienza sicura e di composizione chimica nota, eventualmente "accertata" al momento dell'uso, anche per la presenza di sostanze, naturali o adulteranti, più o meno tossiche [per esempio, allilbenzeni (estragolo, eugenolo, metileugenolo, elemicina, safrolo, miristicina, Dill apiol, Parsley apiol), propenilbenzeni (anetolo *cis*- e *trans*-, metilisoegenolo, isolemicina, asarone *cis*- e *trans*-, isosafrolo *cis*- e *trans*-), allergizzanti (per esempio, aldeide cinnamica, citrale, cumarina, eugenolo, geraniolo, idrossictronellale, tra quelle di maggiore frequenza allergizzante; citronellolo, farnesolo, limonene, linalolo, tra quelle di minore frequenza allergizzante) e immunosoppressori (principalmente nei casi di adulterazione, per esempio, ftalati] e conformi a specifiche norme. A quest'ultimo riguardo le monografie della Farmacopea Europea (VI Edizione, 2008 e supplementi) costituiscono un utile riferimento per quanto riguarda le caratteristiche delle droghe vegetali caratterizzate da un titolo in essenza (achillea, angelica radice, anice, anice stellato, arancia amara epicarpo e mesocarpo, arancia amara fiori, assenzio, boldo foglia, camomilla fiori, camomilla romana fiori, cannella corteccia, carvi frutto, coriandolo, curcuma xanthorrhiza, eucalipto, finocchio amaro, finocchio dolce, garofano, ginepro, lavanda, lentisco, levistico, melissa, menta piperita, olmaria, origano, rosmarino, salvia, salvia triloba, timo, timo spontaneo, valeriana, zenzero) e degli oli essenziali (*Anise oil*; *Bitter-fennel fruit oil*; *Bitter-orange-flower oil*; *Capsicum oleoresin, refined and quantified*; *Caraway oil*; *Cassia oil*; *Cinnamon bark oil, Ceylon*; *Cinnamon leaf oil, Ceylon*; *Citronella oil*; *Clary sage oil*; *Clove oil*; *Coriander oil*; *Eucalyptus oil*; *Juniper oil*; *Lavender oil*; *Lemon oil*; *Mandarin oil*; *Matricaria oil*; *Mint oil, partly dementholised*; *Neroli oil*; *Nutmeg oil*; *Peppermint oil*; *Pine (dwarf) oil*; *Pine sylvestris oil*; *Pinus pinaster type turpentine*

oil; Rosemary oil; Star anise oil; Sweet orange oil; Tea Tree oil; Thyme oil; Turpentine oil, *Pinus pinaster* type).

Frequentemente sono sperimentati idrodistillati ottenuti in laboratorio per le proprietà biologiche, particolarmente per la potenziale capacità antimicrobica, antimicotica e medicinale; però i risultati di queste ricerche, in vista di pratiche applicazioni, debbono essere verificati su campioni commerciali per la composizione chimica e le caratteristiche biologiche.

Agli oli essenziali sono state associate varie proprietà terapeutiche, ma la *Committee on Herbal Medicinal Products* dell'*European Medicines Agency* (6) ha considerato finora solo tre oli essenziali come medicinali, basandosi su un uso ben stabilito (WEU) o semplicemente su un uso tradizionale (TU):

- *Foeniculum vulgare* Miller subsp. *vulgare* var. *vulgare*, aetheroleum (finocchio amaro essenza):
come espettorante nella tosse associata a raffreddore (TU).
- *Pimpinella anisum* L., aetheroleum (anice verde essenza):
 - a) per il trattamento sintomatico di lievi, spasmodici disturbi gastrointestinali, compresi gonfiore e flatulenza (TU);
 - b) come espettorante nella tosse associata a raffreddore (TU).
- *Mentha x piperita* L., aetheroleum (menta essenza):
 - a) per uso topico e transcutaneo (TU):
 - per alleviare i sintomi di tosse e raffreddori;
 - per il sollievo sintomatico dell'affaticamento localizzato dei muscoli;
 - per il sollievo sintomatico di condizioni di prurito localizzato sulla cute intatta;
 - b) per inalazione per il sollievo dei sintomi di tosse e raffreddori (TU);
 - c) per uso oromucosale per il sollievo dei sintomi di tosse e raffreddore (TU);
 - d) per uso orale per il sollievo sintomatico di lievi spasmi del tratto gastrointestinale, flatulenza e dolore addominale, specialmente in pazienti con la sindrome dell'intestino irritabile (WEU);
 - e) per uso topico per alleviare lievi tensioni tipo mal di testa (WEU).

Gli studi pubblicati sull'attività biologica degli oli essenziali chimicamente definiti sono ben più numerosi e tra questi si citano alcuni di quelli dei presenti al convegno (7-24); le evidenze maggiori di potenziali usi sono come bioconservanti, disinfettanti e medicinali e come 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. Ma queste possibilità applicative sono tanto più credibili quanto più i campioni utilizzati sono rispondenti ai requisiti chimici qui esposti.

Bibliografia

1. Salvatore G, Tateo F. Oli essenziali e corrispondenti ricostituiti: correlazioni, realtà strutturali e applicative. *Industrie delle Bevande* 1992;117:5-12.
2. Tateo F, Salvatore G, Nicoletti M. Problematiche sugli aspetti qualitativi, sanitari e di mercato di olii essenziali. Nota I: Diisopropilcresoli in campioni commerciali di timo sofisticati. *Industrie Alimentari* 1992;300:28-35.

3. Tateo F, Salvatore G, Nicoletti M. Problematiche sugli aspetti qualitativi, sanitari e di mercato di oli essenziali. Nota II: Presenza in oli di timo di derivati della isopropilazione dei cresoli. *Industrie Alimentari* 1993;XXXII:373-6 e 382.
4. Salvatore G, Nicoletti M. Solid Phase Micro-Extraction en el estudio de la componente aromática de las drogas vegetales. *VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina*, Antigua Guatemala: 6-10 de octubre 1997. Libro de resúmenes.
5. Council of the Europe. The European Pharmacopoeia, VI Ed. 2008 and Supplements 6.1 (April 2008)-6.3 (April 2009).
6. Committee on Herbal Medicinal Products of the European Medicines Agency. Disponibile all'indirizzo http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000264.jsp&mid=WC0b01ac0580028e7c&url=menus/about_us/about_us.jsp; ultima consultazione 05/10/2011.
7. Mazzanti G, Battinelli L, Salvatore G. Antimicrobial properties of the linalool rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal* 1998;13:289-94.
8. Ferrini AM, Mannoni V, Hodzic S, Salvatore G, Aureli P. Activité microbienne de l'huile de bergamote par rapport à la composition chimique et l'origine différente. *Actes des 16èmes Journées Internationales des Huiles essentielles*. Digne les Bains 3- 6 September 1997.
9. Battinelli L, Salvatore G, Martino MC, Mazzanti G. *Zingiber officinale* essential oil: screening for antimicrobial activity. *Fitoterapia* 1998;Suppl.5:71.
10. Ghelardini C, Salvatore G, Galeotti N, Mazzanti G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *Fitoterapia* 1998;Suppl.5:72.
11. Renzini G, Scazzocchio F, Lu M, Mazzanti G, Salvatore G. Antibacterial and Cytotoxic Activity of *Hyssopus officinalis* L. Oils. *Journal Essential Oil Research* 1999;11:649-54.
12. Ghelardini C, Galeotti N, Salvatore G, Mazzanti G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica* 1999;65:700-3.
13. D'Auria FD, Laino L, Strippoli V, Tecca M, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G. *In Vitro* Activity of *Tea tree oil* Against *Candida albicans* Mycelial Concession and Other Pathogenic Fungi. *J Chemoth* 2001;13(4):377-83.
14. Ferrini AM, Mannoni V, Salvatore G, Aureli P. Attività antibatterica dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* e dei suoi principali componenti nei confronti di batteri di origine clinica e alimentare. 30° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia. Catania: 6-9 ottobre 2002 *Bollettino della Società Italiana di Microbiologia* 2002;4(1):65.
15. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. Attività antimicotica *in vitro* e *in vivo* dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (*Tea tree oil*) su lieviti patogeni umani sensibili e resistenti agli azolici. 30° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia. Catania 6-9 ottobre 2002. *Bollettino della Società Italiana di Microbiologia* 2002;4(1):70.
16. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of *tea tree oil* against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeast. *J Antimicrob Chemoth* 2003;51:1223-9.
17. Mondello F, Gentile E, Girolamo A, Salvatore G. Olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* Cheel: caratterizzazione chimica e attività antimicotica *in vitro* e *in vivo* su lieviti patogeni umani. *Piante Medicinali* 2003;2(4):185-93.
18. B. Oliva, C. Piccirilli, T. Ceddia, E. Pontieri, P. Aureli, A.M. Ferrini. Antimicotyc activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Letters in Applied Microbiology* 2003;37:185-7.
19. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the *InVitro* Growth of Human Melanoma Cells. *J Invest Derm* 2004;22:349-60.

20. Iori A, Grazioli D, Gentile E, Marano G, Salvatore G. Acaricidal proprieties of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Tea tree oil*) against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Vet Parasit* 2005;129:173-6.
21. D'Auria FD, Tecca M, Strippoli V, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yast and mycelial form. *Medical Mycology* 2005;43:391-6.
22. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. Attività *in vitro* e *in vivo* del terpinen-4-olo, componente dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (*Tea tree oil*) nei confronti di *Candida albicans*, sensibile o resistente agli imidazolici. *Bollettino della SIM* 2005;7(1):95.
23. Ferrini AM, Mannoni V, Aureli P., Salvatore G, Piccirilli E, Ceddia T, Pontieri E, Sessa R, Oliva B. *Melaleuca alternifolia* essential oil possesses potent anti-straphylococcal activity extended to strains resistant to antibiotics. *Int J Immunopath Pharmac* 2006; 19(3):539-44.
24. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Tea Tree*) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Inf Dis* 2006;6:158-65

STUDIO DELL'ATTIVITÀ BIOLOGICA DI SOSTANZE NATURALI MEDIANTE TECNICHE SPETTROSCOPICHE E SPETTROMETRICHE

Fabrizio Dal Piaz, Laura Faiella, Nunziatina De Tommasi
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Salerno

Introduzione

Negli ultimi anni l'attenzione del mondo scientifico è stata focalizzata sull'analisi a livello molecolare del meccanismo d'azione di composti naturali farmacologicamente attivi. Le sostanze naturali costituiscono una ampia fonte di materiale per effettuare screening di interazione nei confronti di numerosi target biologici. L'elevata diversità chimica dei metaboliti di origine naturale offre da sempre modelli strutturali diversificati per la progettazione e la sintesi di potenziali farmaci (1, 2). 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". Infatti, a tutt'oggi molti composti di origine naturale sono in fase di sperimentazione clinica (3). I processi evolutivi hanno portato nel corso dei millenni alla selezione e alla produzione di metaboliti secondari in grado di interagire in maniera selettiva con un'ampia varietà di proteine e di altri target biologici (4). In particolare, l'elevata omologia tra i domini strutturali e funzionali delle proteine di origine vegetale o marina e quelle umane, consente a tali molecole di interagire sia con le une che con le altre con affinità paragonabile (5). I composti naturali sono molecole a basso peso molecolare che presentano un elevato potenziale terapeutico nel trattamento di numerose patologie quali, ad esempio, l'infiammazione, alcune malattie cardiovascolari e il cancro (6). Piccole molecole naturali bioattive 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 (7). 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 e ottenere relazioni struttura-attività anche in previsione di successive strategie sintetiche.

Sebbene, il potenziale terapeutico di molecole di origine naturale venga investigato a fondo mediante studi cellulari o saggi *in vivo*, il loro meccanismo di azione, e i loro partners macromolecolari all'interno della cellula, rimangono spesso completamente oscuri. Infatti, molti farmaci naturali sono stati scoperti dall'osservazione fenotipica dell'effetto di un composto o di un estratto su di una cellula o su di un organismo. Si rivela, perciò, necessario identificare i target biologici (tipicamente di natura proteica) di tali composti, l'interazione con i quali determina l'effetto farmacologico osservato. Su tali basi è possibile sia comprendere i percorsi metabolici che sono influenzati da tali sostanze, sia migliorarne le proprietà di selettività e di efficienza, cercando di diminuirne gli effetti collaterali.

L'identificazione del target molecolare di un potenziale farmaco ha diversi vantaggi. Il più significativo è la possibilità di mettere a punto saggi basati sul bersaglio e di consentire studi di relazioni struttura-attività (SAR) per guidare la sintesi farmaceutica mirata all'ottimizzazione del *lead compound*. La conoscenza del bersaglio del farmaco può anche facilitare l'identificazione di tossicità potenziali o effetti collaterali se sono già noti per quel bersaglio.

Raggiungere questo scopo in maniera efficace, obiettiva ed efficiente è una importante sfida della nuova era del *drug discovery and optimization*.

Nonostante l'avanzamento tecnologico, l'identificazione dei bersagli macromolecolari di molecole biologicamente attive così come l'analisi della risposta dei sistemi cellulari in seguito alla somministrazione di tali composti, rimangono problemi centrali della chimica farmaceutica e della chimica biologica. Le innovazioni negli *high-throughput screening* hanno portato ad un aumento del numero di nuove molecole *lead*. Sfortunatamente esistono ancora considerevoli rischi e incertezze associati alla scoperta e alla validazione di nuovi farmaci di origine naturali, poiché il potenziale terapeutico dei metaboliti attivi viene valutato in modelli cellulari e il loro esatto meccanismo di azione e il reale spettro dei loro partner intracellulari rimane essenzialmente oscuro.

La proteomica chimica

Studi di proteomica chimica rappresentano una valida strategia per identificare e validare target proteici che leghino piccole molecole in modo rapido, sistematico. La proteomica chimica è un efficace approccio che ha la potenzialità di trovare interattori specifici in un'analisi su scala moderata. La proteomica chimica identifica le proteine che legano specificamente e direttamente il composto candidato grazie alla loro purificazione per cromatografia di affinità, utilizzando il candidato immobilizzato, e alla loro successiva analisi mediante spettrometria di massa (8).

L'approccio di proteomica chimica prevede l'utilizzo di metaboliti bioattivi immobilizzati su un opportuno supporto solido. Tale approccio può essere diviso in due fasi:

1. Generazione di una matrice funzionale covalentemente modificata con il ligando. I ligandi bioattivi in esame sono immobilizzati su di una resina opportunamente attivata attraverso la formazione di un legame covalente (9). Sono utilizzate allo scopo matrici gelificate di agarosio attivate con funzioni 1-1' carbonil-di-imidazoliche, inizialmente modificate con l'inserimento di bracci spaziatori bifunzionali, il cui uso è necessario per diminuire l'ingombro sterico tra i *partners* macromolecolari del composto e la matrice solida.
2. Cromatografia di affinità seguita dall'identificazione dei *partners* molecolari che interagiscono specificamente con il composto in esame.

Per caratterizzare i target delle sostanze in esame, diversi estratti cellulari, totali o parziali, di sistemi biologici accuratamente selezionati sono incubati sulle colonne di affinità preparate come descritto precedentemente. Dopo numerosi lavaggi atti a rimuovere il materiale adsorbito aspecificamente sulla resina modificata, le proteine specificamente legate sono eluite dalla colonna, separate su gel SDS-PAGE e rivelate mediante opportuna colorazione. Le corsie del gel sono tagliate, le proteine presenti sono digerite *in situ* con enzimi proteolitici e le miscele peptidiche risultanti sono sottoposte ad analisi MS ad alta risoluzione accoppiate con cromatografia a fase inversa a nano-flussi (10). I dati ottenuti sono quindi processati mediante sistemi di bio-informatica e l'identificazione delle proteine è ottenuta mediante ricerche automatizzate sui *database* NCBI e SwissProt utilizzando opportuni software.

Surface plasmon resonance (SPR)

La proteomica chimica costituisce un efficiente approccio per scoprire la funzione di proteine non note, identificando i meccanismi molecolari di azione di molecole bioattive; poiché

la cromatografia di affinità con piccole molecole immobilizzate soffre del problema di legami non-specifici, i target identificati con esperimenti di proteomica chimica devono essere confermati da successivi studi spettroscopici, mediante tecniche quali la Risonanza Plasmonica di Superficie e l'STD-NMR (*saturation transfer difference-nuclear magnetic resonance*). La *Surface plasmon resonance* è una tecnica molto potente e sensibile nel determinare le interazioni di una grande varietà di biocomposti con un'altrettanto grande varietà di ligandi, e in modo particolare le interazioni proteina-ligando, proteina-proteina e proteina-DNA. Nell'analisi SPR, l'interazione tra piccole molecole e i loro partners proteici è monitorata in tempo reale, e la velocità di associazione e dissociazione è misurata con alta precisione (11-14). Analisi *Surface plasmon resonance* possono essere effettuate quando gli esperimenti di proteomica chimica hanno portato all'identificazione di una proteina come putativo bersaglio molecolare di un determinato composto: la proteina suggerita come target è immobilizzata su di un chip e soluzioni a diversa concentrazione del composto in questione verranno iniettate su di essa. I dati ottenuti da questi esperimenti permetteranno di confermare (o meno) la reale interazione tra il composto e il suo putativo target, e consentiranno di misurare i parametri cinetici e termodinamici di tale interazione.

Proteomica quantitativa

Se è vero che la maggior parte delle molecole agisce su un singolo bersaglio principale per svolgere la azione terapeutica, bisogna considerare che tutte le funzioni fisiologiche sono regolate da complessi proteici e perciò basate sull'interazione proteina-proteina. Ciò significa che il trattamento dei sistemi cellulari con piccole molecole può alterare più di un network biologico, provocando una serie di effetti secondari difficilmente prevedibili. È perciò di fondamentale importanza osservare l'effetto globale del trattamento di piccole molecole sui sistemi cellulari. L'approccio proteomico combinato con altri metodi biochimici, può ricostruire i network regolativi, le cascate di segnale e i *pathway* metabolici dopo il trattamento con la molecola, consentendo ipotesi sulle specifiche vie enzimatiche modulate e sui bersagli che possono essere coinvolti (9). Lo studio del proteoma è contemporaneamente complesso e dinamico (15). Il bagaglio proteico di una cellula o di un organismo, infatti, non costituisce una proprietà immutabile nel tempo e determinata esclusivamente dal suo patrimonio genetico: anche solo in un organismo unicellulare, il livello di espressione di alcune proteine varia infatti in modo drammatico in funzione di fattori che vanno dall'età alla temperatura, dallo stress all'interazione con molecole esogene (16). Inoltre, anche la struttura primaria e terziaria delle proteine può variare nel tempo, spesso in risposta a determinati stimoli, modificandone drasticamente l'attività biologica per effetto di modificazioni post-traduzionali più o meno transienti (17). A causa della complessità della maggior parte dei campioni biologici, la spettrometria di massa e i programmi bio-informatici di analisi di dati sono le tecniche più potenti per tali studi, anche se la selezione dei campioni biologici per caratterizzare lo stato di una malattia è di primaria importanza.

Bibliografia

1. Strohl WR. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discov Today* 2000;5(2):39-41.
2. Gullo VP, McAlpine J, Lam KS, Baker D, Petersen F. Drug discovery from natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33(7):523-31.

3. Rishton GM. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. *Am J Cardiol* 2008;101(10A):43D-49D.
4. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Rev Drug Discov* 2005;4(3):206-20.
5. Zhang MQ, Wilkinson B. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18(6):478-88.
6. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 2007;70(3):461-77.
7. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today* 2008;13(19-20):894-901.
8. Dal Piaz F, Vassallo A, Lepore L, Tosco A, Bader A, De Tommasi N. Sesterterpenes as tubulin tyrosine ligase inhibitors. First insight of structure-activity relationships and discovery of new lead. *J Med Chem* 2009;52(12):3814-28.
9. Sleno L, Emili A. Proteomic methods for drug target discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12(1):46-54.
10. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006;1(6):2856-60
11. Monti MC, Casapullo A, Cavasotto CN, Tosco A, Dal Piaz F, Ziemys A, Margarucci L, Riccio R. The binding mode of petrosaspongiolide M to the human group IIA phospholipase A(2): exploring the role of covalent and noncovalent interactions in the inhibition process. *Chemistry* 2009;15(5):1155-63.
12. Mayer M, Meyer B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Edi.* 1999;38:1784-8.
13. Dal Piaz F, Vassallo A, Lepore L, Tosco A, Bader A, De Tommasi N. Sesterterpenes as Tubulin Tyrosine Ligase Inhibitors. First Insight of Structure-Activity Relationships and Discovery of New Lead *J Med Chem* 2009;52(12):3814-28.
14. Dal Piaz F, Vassallo A, Bader A, Lepore L, Eletto D, De Tommasi N. Chemical and biological studies on sesterterpenes from *Salvia Domenica*. Proceedings of 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Athens: 3-8 August 2008. *Planta Medica* 2008;74:1067.
15. Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis* 1999;20(4-5):678-88.
16. Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Ruger R. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67(1):86-156.
17. Spickett CM, Pitt AR, Morrice N, Kolch W. Proteomic analysis of phosphorylation, oxidation and nitrosylation in signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764(12):1823-41.

SINTESI DI APLIDINONI, COMPOSTI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE

Francesco Bonadies, Gianfranco Cocco, Marcella Guiso, Rosario Nicoletti, Maria Filomena Sanasi
Dipartimento di Chimica, Sapienza Università di Roma

Introduzione

Oggi si stima che più del 50% dei principi attivi di preparati farmaceutici derivi da fonti naturali terrestri. Per esempio, circa il 25% dei farmaci anticancro sono prodotti naturali e un altro 25% è costituito da derivati sintetici di prodotti naturali (1).

Per contrasto, il mare è stato solo limitatamente esplorato sebbene quasi i tre quarti della superficie della Terra sia coperta dagli oceani. Negli ultimi quarant'anni, tuttavia, la ricerca in questo campo ha fatto passi da gigante; sono stati descritti migliaia di nuovi prodotti naturali isolati da organismi marini e questo numero è in costante crescita (2).

Tra le fonti di composti bioattivi i Tunicati, ad esempio, sembrano particolarmente promettenti. Basta ricordare che, tra i sei composti di origine marina che hanno raggiunto lo stadio della sperimentazione clinica come farmaci antitumorali, tre, la Didemmina B, l'Aplidina e l'Ecteinascidina 743 sono metaboliti isolati da ascidie (3).

I Tunicati (o Urocordati) costituiscono un *sub-phylum* dei Cordati, che include anche l'uomo e gli altri vertebrati. Da un punto di vista evuzionistico, quindi, essi sono gli invertebrati più avanzati. Il *sub-phylum*, in realtà, comprende tre classi ma soltanto le specie appartenenti ad una delle tre, gli ascidiacei, non sono solo pelagiche ma presentano anche una fase bentonica. Ciò si riflette in una maggiore facilità di raccolta e fa sì che gli ascidiacei siano di gran lunga i Tunicati più studiati.

Gli Aplidinoni: fonti naturali, caratterizzazione strutturale e attività biologica

La letteratura è ricca di esempi di composti naturali a struttura terpeno-chinonica/idrochinonica, isolati sia da fonti marine che terrestri (4).

L'analisi degli estratti di alcune specie di ascidiacei presenti nell'area mediterranea, ha portato al rinvenimento di numerose nuove molecole appartenenti a questa classe di composti, dotate di attività antiproliferativa su diverse linee cellulari tumorali (5-6). Questi chinoni prenilati presentano scheletri carboniosi abbastanza differenti a causa di ciclizzazioni intra- e inter-molecolari delle catene isopreniche che danno origine a strutture policicliche o macrocicliche. Inoltre, ad alcune di queste complesse strutture si possono legare amminoacidi o residui di taurina (7).

Nell'ambito di tali studi, presso il Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università "Federico II" di Napoli, è stato eseguito l'esame della specie *Aplidium conicum* che ha portato all'isolamento di nuovi metaboliti a struttura terpeno-chinonica: i Conicachinoni A e B (8), i Tiaplidiachinoni A e B (9) e gli Aplidinoni A, B e C (10) (Figura 1).

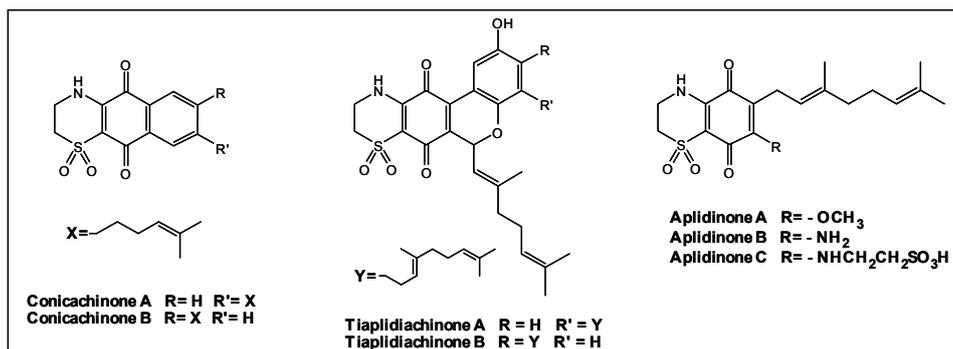


Figura 1. Nuovi metaboliti isolati dall'*Aplidium* c.: Conicachinoni, Tiaplidiachinoni e Aplidinoni

Questi composti, pur essendo strutturalmente differenti, sono tutti caratterizzati dalla presenza di un anello 1,1-dioxo-1,4-tiazinico condensato con una porzione *p*-benzoquinonica prenilata (8). Per quanto riguarda la caratterizzazione strutturale degli Aplidinoni, l'insieme dei dati NMR non era stata sufficiente per l'assegnazione univoca della regiochimica dell'anello eterociclico; quella degli Aplidinoni A e B riportata in figura, è stata assegnata, in un primo momento, sulla base del confronto dei valori di chemical shift ¹³C-NMR sperimentali dei composti naturali, con quelli ottenuti per due modelli semplificati attraverso calcoli quantomeccanici basati sul metodo GIAO (11-12).

L'assegnazione univoca della struttura è stata possibile solo in seguito alla sintesi dei modelli A1 e A2, che ha consentito di confrontare i dati sperimentali di queste molecole con quelli teorici e quindi con quelli dell'Aplidinone A (13).

Presso i laboratori del Dipartimento di Biologia cellulare, Fisiologia e Immunologia dell'Università di Cordoba, sono stati effettuati studi di attività biologica sugli Aplidinoni A e C, l'Aplidinone B non è stato testato a causa delle esigue quantità di prodotto estratto.

L'Aplidinone A ha mostrato un marcato e selettivo effetto citotossico *in vitro* nei confronti di linee cellulari Jurkat del linfoma T umano, mentre l'Aplidinone C è risultato completamente inattivo.

L'Aplidinone A inibisce il sistema PMOR (NADH ossido-reduttasi della membrana plasmatica) che costituisce una catena di trasporto degli elettroni presente nella membrana plasmatica di tutte le cellule, essenziale per controllare la crescita cellulare e il differenziamento. Gli Aplidinoni, competono con il coenzima Q₁₀ per il sito attivo di una delle componenti di questo complesso enzimatico (t-NOX), la cui inibizione conduce ad un aumento dei livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e alla deplezione delle quantità di glutazione ridotto (GSH).

È ormai noto che le neoplasie non sono correlate soltanto alla proliferazione cellulare ma anche ad una diminuzione degli eventi apoptotici ed, inoltre, che i processi anti-apoptotici nelle cellule tumorali contribuiscono alla sopravvivenza e favoriscono la metastatizzazione.

L'Aplidinone A causa sia un aumento degli eventi apoptotici che l'inibizione dei processi anti-apoptotici attraverso due vie differenti. Lo stress ossidativo conseguente all'azione di questo composto, infatti, da un lato si traduce in un repentino crollo del potenziale mitocondriale trans-membrana, successivo rilascio nel citosol di fattori attivanti la cascata delle caspasi e induzione, infine, del processo apoptotico (14); dall'altro porta all'inattivazione di una famiglia di fattori di trascrizione, nota con il termine NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) e, quindi, all'inibizione dell'espressione di alcuni geni anti-apoptotici (15).

Sintesi di analoghi dell'Aplidinone A

Il lavoro di sintesi è iniziato con la pianificazione di un schema sintetico per i modelli A1 e A2, allo scopo di confermare l'assegnazione strutturale dell'Aplidinone A effettuata attraverso calcoli teorici.

La via di sintesi utilizzata (Figura 2), non essendo regioselettiva, ci ha consentito di preparare contemporaneamente in modo semplice e in pochi passaggi sia A1 che A2 (13).

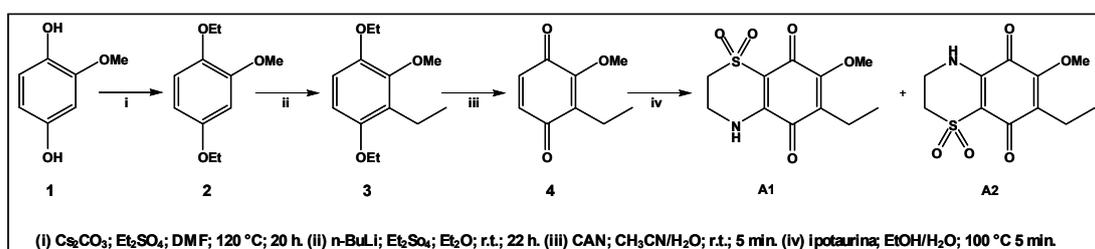


Figura 2. Sintesi dei modelli A1 e A2

Lo studio è proseguito con la sintesi di analoghi strutturali dell'Aplidinone A caratterizzati da sostituenti alchilici diversi da quello del composto naturale (catene lineari a 8 e 14 atomi di carbonio), in modo da poter effettuare studi SAR per evidenziare l'influenza di questi sostituenti sull'attività antitumorale degli Aplidinoni.

Il percorso sintetico precedentemente descritto non è risultato utilizzabile per giungere alla sintesi di derivati con catene laterali a maggior numero di atomi di carbonio. Infatti, l'alchilazione del dietiltere del metossi-idrochinone mediante litiazione, seguita dalla reazione con l'adatto alogenuro alchilico primario, quando si è utilizzato 1-Bromo ottano ha fornito il prodotto atteso con basse rese, mentre non ha portato ad alcun prodotto alchilato nel caso dell'1-Bromo tetradecano. Si è quindi messo a punto un nuovo schema sintetico (Figura 3); per questa via si è giunti alla sintesi sia dei derivati con catena n-ottilica che di quelli con catena n-tetradecilica (13).

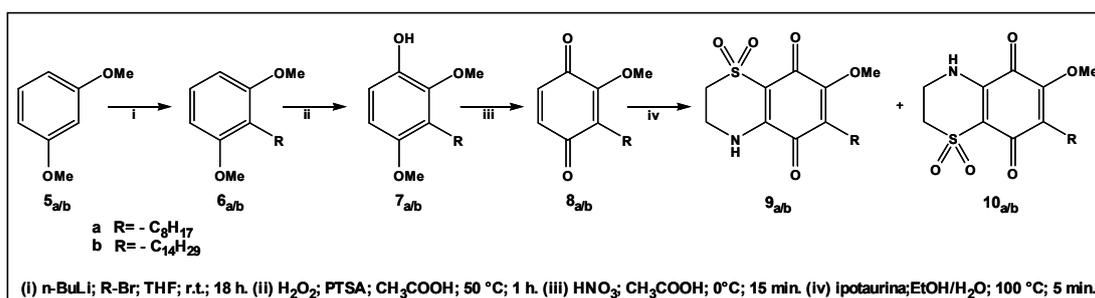


Figura 3. Sintesi degli analoghi con catena n-ottilica e n-tetradecilica

Come si può notare, in entrambi i percorsi sintetici degli analoghi dell' Aplidinone A, il passaggio chiave è quello di formazione dell'anello 1,1-dioxo-1,4-tiazinico, che è stato realizzato tramite la reazione del chinone con l'acido 2-aminoetansolfonico (ipotaurina), e che permette di preparare entrambi i regioisomeri sebbene con netta prevalenza di quello "non naturale".

Questo tipo di reazione è stata utilizzata per la prima volta nel 1988 per la sintesi di un anello 1,1-dioxo-1,4-tiazinico condensato con un nucleo naftochinonico, successivamente, Harada si servì dello stesso protocollo per sintetizzare gli Adociachinoni A e B (16).

Il meccanismo ipotizzato per questa reazione, è quello di un'addizione coniugata tipo Michael di acidi solfinici o ammine ad un sistema chinonico di cui solo uno dei due doppi legami sia completamente sostituito.

Per spiegare l'andamento regiochimico della reazione di addizione dell' ipotaurina, abbiamo voluto individuare il carbonio più elettropositivo fra i due carboni metinici dell'anello chinonico, e quindi preferito per l'attacco nucleofilo da parte del gruppo solfinico. Abbiamo perciò effettuato un esperimento HMBC sul chinone (4) (Figura 4) che ci ha consentito di verificare l'esistenza di un accoppiamento *long-range* fra il carbonio 6, che è risultato essere anche il più deschermato, e i protoni del primo gruppo metilenico della catena alchilica.

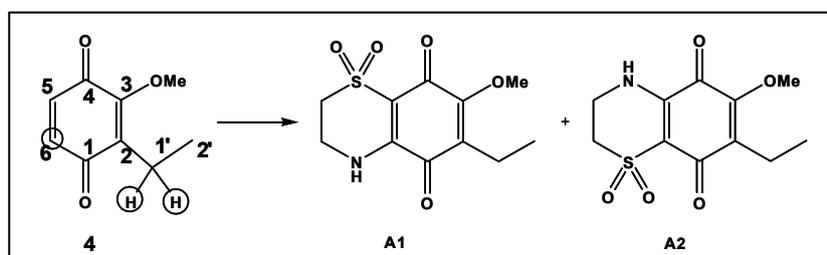


Figura 4. Chinone oggetto dell'esperimento HMBC

I dati ricavabili da questo esperimento spiegano quindi il prevalere nella sintesi del regioisomero "non naturale".

La reazione di addizione compete, però, con l'equilibrio redox che si instaura tra il chinone (sistema ossidante) e l'ipotaurina (sistema riducente). Nel nostro caso, si ottiene comunque una discreta quantità del prodotto di addizione-condensazione.

Studi SAR

Le indagini biologiche condotte sugli analoghi sintetici dell'Aplidinone A hanno evidenziato sensibili variazioni dell'attività pro-apoptotica su linee cellulari Jurkat del linfoma T umano, in funzione della regiochimica dell'anello tiazinico e della lunghezza della catena alchilica (13).

L' Aplidinone A risulta citotossico per il 50% delle cellule quando la sua concentrazione è di circa 50 μM (Tabella 1). Confrontando l' attività biologica del composto naturale con quella dei suoi analoghi sintetici, essa risulta:

- aumentata per il composto con regiochimica "non naturale" e catena alchilica ad 8 atomi di carbonio (10a).

- diminuita per i composti con catena alchilica a 2 atomi di carbonio (A1 e A2) e per quello con regiochimica “non naturale” e catena alchilica a 14 atomi di carbonio (10b).
- minima per i composti con regiochimica “naturale” e catena alchilica a 8 e 14 atomi di carbonio (9a e 9b).

Tabella 1. Citotossicità dell'Aplidinone A (APL A) e dei suoi derivati di sintesi

Composti	APL A	A1	A2	9a	9b	10a	10b
IC50 (μM)	44,5±6	>50	>50	>50	20,7±2	>50	>50

Possiamo quindi concludere che i derivati sintetici con regiochimica dell'anello tiazinico “non naturale” sono più attivi dei rispettivi regioisomeri “naturali”.

Il composto con catena alchilica ad otto atomi di carbonio (10a) è risultato il più attivo probabilmente per una maggiore lipofilità, ma questo effetto non è mantenuto nel composto 10b probabilmente a causa di una minore affinità per il sito attivo dovuto alla presenza della catena tetradecilica.

Bibliografia

1. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products* 1997;60(1):52-60.
2. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* 2003; 8(12): 536-544.
3. Le Tourneau C, Raymond E, Faivre S. Aplidine: a paradigm of how to handle the activity and toxicity of a novel marine anticancer poison. *Current Pharmaceutical Design* 2007;13(33):3427-39.
4. Minale L, Riccio R, Sodano G. Avarol, a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge *Disidea avara*. *Tetrahedron Letters* 1974;38:3401-4.
5. Aiello A, Carbonelli S, Fattorusso E, Iuvone T, Menna M. New bioactive sulfated metabolites from the Mediterranean tunicate *Sidnyum turbinatum*. *Journal of Natural Products* 2001;64(2):219-2.
6. Aiello A, Carbonelli S, Esposito G, Fattorusso E, Iuvone T, Menna M. Turbinamide, a new selective cytotoxic agent from the Mediterranean tunicate *Sidnyum turbinatum*. *Organic Letters* 2001;3(19):2941-4.
7. Fenical W. Geranyl hydroquinone, a cancer protective agent from the Tunicate *Aplidium* species. *Food-Drugs Sea* 1976;4:388-94.
8. Aiello A, Fattorusso E, Luciano P, Menna M, Esposito G, Iuvone T, Pala D. Conicaquinones A and B, two novel cytotoxic terpene quinones from the Mediterranean ascidian *Aplidium conicum*. *European Journal of Organic Chemistry* 2003;5:898-900.
9. Aiello A, Fattorusso E, Luciano P, Macho A, Menna M, Munoz E. Antitumor Effects of Two Novel Naturally Occurring Terpene Quinones Isolated from the Mediterranean Ascidian *Aplidium conicum*. *J Med Chem* 2005;48:3410-6.
10. Aiello A, Fattorusso E, Luciano P, Mangoni A, Menna M. Isolation and structure determination of aplidinones A-C from the Mediterranean ascidian *Aplidium conicum*: A successful regiochemistry assignment by quantum mechanical ¹³C NMR chemical shift calculations. *European Journal of Organic Chemistry* 2005;5024-30.

11. Barone G, Gomez-Paloma L, Duca D, Silvestri A, Riccio R, Bifulco G. Structure validation of natural products by quantum-mechanical GIAO calculations of ^{13}C NMR chemical shifts. *Chemistry A European Journal* 2002;8:3233-9.
12. Barone G, Duca D, Silvestri A, Gomez-Paloma L, Riccio R, Bifulco G. Determination of the relative stereochemistry of flexible organic compounds by ab initio methods: conformational analysis and Boltzmann-averaged GIAO ^{13}C NMR chemical shifts. *Chemistry A European Journal* 2002;8:3240-5.
13. Aiello A, Fattorusso E, Luciano P, Menna M, Calzado MA, Munoz E, *et al.* Synthesis of structurally simplified analogues of aplidinone A, a pro-apoptotic marine thiazinoquinone. *Bioorg Med Chem* 2010;18(2):719-27.
14. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(3):1259-63.
15. Macho A, Lucena C, Sancho R, Daddario N, Minassi A, Munoz E, Appendino G. Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper: Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *European Journal of Nutrition* 2003;42(1):2-9.
16. Harada N, Sugioka T, Soutome T, Hiyoshi N, Uda H, Kuriki T. Synthesis and absolute stereochemistry of (+)-adociaquinones A and B. *Tetrahedron Asymmetry* 1995;6(2):375-6.

STUDI DI SOSTANZE NATURALI CON ATTIVITÀ TERAPEUTICA DA PIANTE DALLA MEDICINA TRADIZIONALE: LE SPECIE DI *HYPOXIS*

Giovanna Palazzino
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Ogni Medicina Tradizionale (MT), come insieme delle conoscenze, pratiche e metodi usate presso una data popolazione per curare o prevenire squilibri fisici e/o mentali che possono ledere il benessere di un singolo individuo, può essere considerata un'utile fonte per la messa a punto di nuove terapie. In particolare le piante medicinali usate dai medici tradizionali ovvero gli *healers* locali possono essere una fonte di nuove sostanze naturali ad attività terapeutica.

Numerosi sono, d'altra parte, i farmaci entrati nelle farmacopee e/o nei prontuari internazionali dopo lo studio dei rimedi tradizionali a base vegetale: dagli alcaloidi della Vinca quali vinblastina e vincristina (1) ai derivati del tassolo come antitumorali (2), dalla tubocurarina alla digossina (3) e altri. Così come sono numerose le sostanze isolate da piante della MT 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, un esempio da ricordare è quello della camptotecina. Molte delle sostanze isolate dalle piante, prodotte dalle stesse come metaboliti secondari in risposta agli stress biogeni e abiogeni, hanno poi contribuito al chiarimento di alcuni processi biochimici cellulari (4).

Nei paesi industrializzati, ove il sistema di cura dominante è basato sulla medicina allopatrica, la MT è intesa come medicina non-convenzionale o come medicina complementare/alternativa (CAM).

Con queste premesse la stessa Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha dato una forte spinta allo studio delle piante usate nella MT in particolare dei paesi in via di sviluppo per trovare una validazione scientifica al loro uso terapeutico tradizionale e giustificarne soprattutto una loro utilizzazione nella cura primaria immediata presso le stesse popolazioni d'origine come cura a basso prezzo e facilmente recuperabile (5-8). Da una stima dello stesso OMS, infatti, solo in Africa più dell'80% della popolazione fa ricorso alla MT per risolvere i propri bisogni di cura perché più facilmente accessibile sia dal punto di vista dell'offerta sia dal punto di vista economico: il rapporto tra professionisti della MT e popolazione è di 1:400, mentre tra professionisti della medicina allopatrica e popolazione è di 1:20.000; il costo medio per una cura antimalarica a base di antimalarici allopatrici pirimetamina/sulfadoxina si aggira intorno a parecchi dollari mentre il trattamento con i rimedi vegetali locali è considerevolmente più economico e a volte può essere anche non pagato in relazione alla 'ricchezza' del paziente. Di contro nei paesi sviluppati l'uso popolare delle CAM è cresciuto negli ultimi anni perché alimentato dalla paura degli effetti collaterali dei farmaci chimici, dalle questioni sulle modalità di assunzione non-orale delle medicine allopatriche e dal maggiore accesso pubblico alle informazioni sulla salute. L'uso maggiore di queste medicine MT/CAM richiede quindi per lo stesso OMS un maggiore

domanda di evidenza per la sicurezza, efficacia e qualità dei prodotti e delle pratiche della MT/CAM. La messa a punto di programmi strategici per gli anni 2002-2010 testimonia questo forte interesse dell'OMS per le MT viste anche come "medicine della povertà" (9, 10).

A livello europeo la recente emanazione della Direttiva 2004/24/CE (11) su la registrazione semplificata per i "medicinali tradizionali vegetali" richiama comunque alle linee guida su preparazione, controllo di qualità e standardizzazione delle sostanze vegetali (equiparate alle sostanze farmaceutiche attive dei medicinali allopatrici) sia in forma di droghe vegetali sia come preparati vegetali, dimostrati sicuri ed efficaci dall'uso consolidato per 30 anni nella medicina popolare di un dato paese. Tali linee guida, dettate dall'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA), presuppongono la conoscenza dei componenti chimici di una sostanza vegetale come principi attivi o come composti identificativi ovvero markers caratteristici di quella data pianta d'uso terapeutico tradizionale.

Di qui la ricerca anche come isolamento e caratterizzazione chimica di sostanze naturali con attività terapeutica o anche come "markers" caratterizzanti dalle piante medicinali tradizionali deve essere implementata e valorizzata per assicurare un adeguato controllo di qualità delle stesse a garanzia della loro efficacia e sicurezza, verosimili in base all'esperienza e all'impiego consolidato nella MT.

In questo ambito lo studio di alcune piante della famiglia delle Hypoxidaceae indicate dalla MT dell'Africa sudsahariana ha portato a promettenti risultati.

Hypoxis radix

Lo studio delle radici di *Hypoxis* è uno degli esempi più idonei a dimostrare come l'isolamento e la caratterizzazione di sostanze naturali da piante della MT e la loro successiva valutazione bio-farmacologica sia a sostegno delle cure tradizionali. Parliamo per semplicità di radici di *Hypoxis* ma in modo errato perché in realtà la parte utilizzata di queste piante è rappresentata dai rizomi, che sono i cauli ipogei-sotterranei, da cui si dipartono le radici.

Il genere botanico *Hypoxis* fu stabilito da Linneo nel 1759 e, dopo altalenanti assegnazioni alla famiglia delle Amarillidaceae, andò a dare il nome alla famiglia distinta delle Hypoxidaceae, come riportato nella 12^a edizione del "Syllabus der Pflanzenfamilien" del 1964 (12). Sono 9 i generi che per caratteri botanici simili entrano a far parte di questa famiglia delle Monocotiledoni (13; 14): *Hypoxis* L., insieme a *Curculigo* Gaert., *Campynema* Labill., *Campynemanthe* Baill., *Empodium* Salisb., *Molineria* Colla, *Pauridia* Harv., *Rhodohypoxis* Nel. e *Spiloxene* Salisb. Sono per lo più piante erbacee perenni con foglie basali alternate penninervie, lanceolate o lineari, ricoperte da peluria sui margini, caratteristica distintiva rispetto alle Amarillidaceae.

La parte ipogea del genere *Hypoxis* è in particolare rappresentata da rizomi tuberosi e radici avventizie (in inglese l'insieme è *corm*) che gli consentono di sopravvivere in condizioni climatiche avverse perché le specie di questo genere vivono per la maggior parte in Africa (96 specie), 16 in Amazzonia, 7 in Asia e in Australia (15). Sono anche tipici i loro fiori: piccoli a forma di stella e in genere di colore giallo lucente (Figura 1), tanto che le *hypoxis* in particolare sono note come *star grass*.



Figura 1. *Hypoxis obtusa* Burch. Pianta cresciuta in vaso presso il laboratorio di chimica delle sostanze naturali del Dipartimento del Farmaco dell'ISS da rizomi comprati nel 1997 al mercato di Shipamanina, Mabuto, Monzambico

Le indicazioni d'uso terapeutico tradizionali sono diverse a seconda della specie e della provenienza (16): dall'uso come tonico rigenerante dell'*Hypoxis aurea* Laurin in Hymalaya e nelle Filippine all'uso come emmenagogo per l'*H. scorzoneraefolia* Lam. nelle Antille, l'uso per il trattamento dei tumori testicolari dell'*H. decumbens* L. e l'*H. scuronera* L. nelle Indie occidentali. Per l'*H. rooperi* T. Moore (oggi *H. hemerocallidea*) in Sud Africa è riportata un'utilizzazione nelle malattie urinarie compresa l'ipertrofia prostatica benigna, così pure per l'*H. obtusa* Burch in Monzambico; l'*H. nyasica* Bak. è utilizzata in Malawi per i tumori interni e anche per il trattamento dell'ipertrofia prostatica benigna.

Le sostanze isolate

Lo studio fitochimico di diverse specie di *Hypoxis* ha portato a caratterizzare questo genere delle Hypoxidaceae anche da un punto di vista chimico. Gli estratti metanolici dei rizomi delle diverse specie studiate sono risultati per lo più miscele complesse di glicosidi norlignanici, che è stato possibile separare con relativa facilità presso il laboratorio di chimica delle sostanze naturali del Dipartimento del Farmaco di questo istituto con la tecnica della distribuzione in contro-corrente tramite l'apparecchio Craig-Post (17), utilizzando miscele bifasiche di solventi n-butanolo/etile acetato/acqua in proporzioni variabili.

Il primo di questi composti isolati e caratterizzati fu l'hypoxoside dall'*Hypoxis obtusa* Burch del Monzambico (18), un diglucoside con aglucone un norlignano polifenolico dalla struttura insolita di 1,5-difenil pentan-1-ene-4-ino. Poi altri composti norlignanici furono separati e purificati in questo istituto dalla stessa *Hypoxis obtusa* (Figura 2) (19) e da altre specie studiate (Figura 3): *H. nyasica* Bak del Malawi (20), *H. obtusa* Burch-complex dal Kenya e Zimbabwe (21), *H. interjecta* Nel. e *H. multiceps* Buching ex Krauss entrambe del Sud Africa (22), *H. angustifolia* Lam. dallo Zimbabwe (23) e *H. decumbens* L., Brasile.

La struttura base di 1,5- o 1,3-diarilpentani insaturi comune ai composti isolati da questo genere di Hypoxidaceae può senz'altro far ritenere questi norlignani un gruppo di markers caratteristici di queste piante.

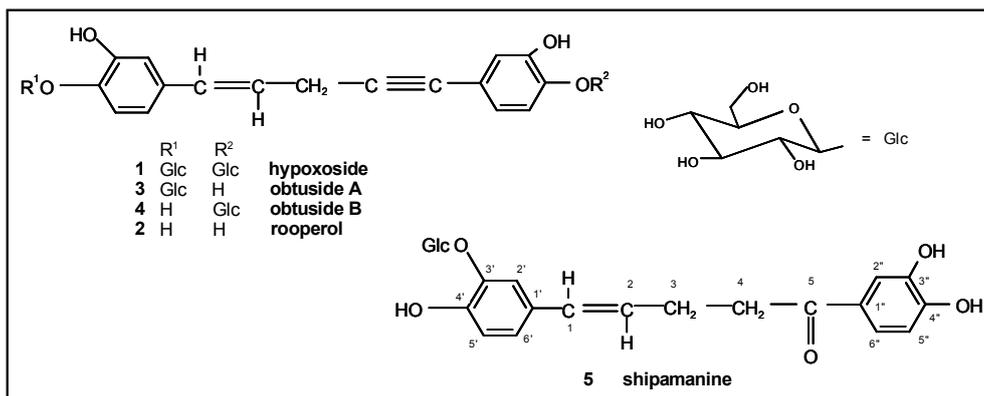


Figura 2. *Hypoxis obtusa* Burch. Composti isolati e caratterizzati da un estratto metanolico dei rizomi provenienti dal Mozambico e dal Kenya e Zimbabwe

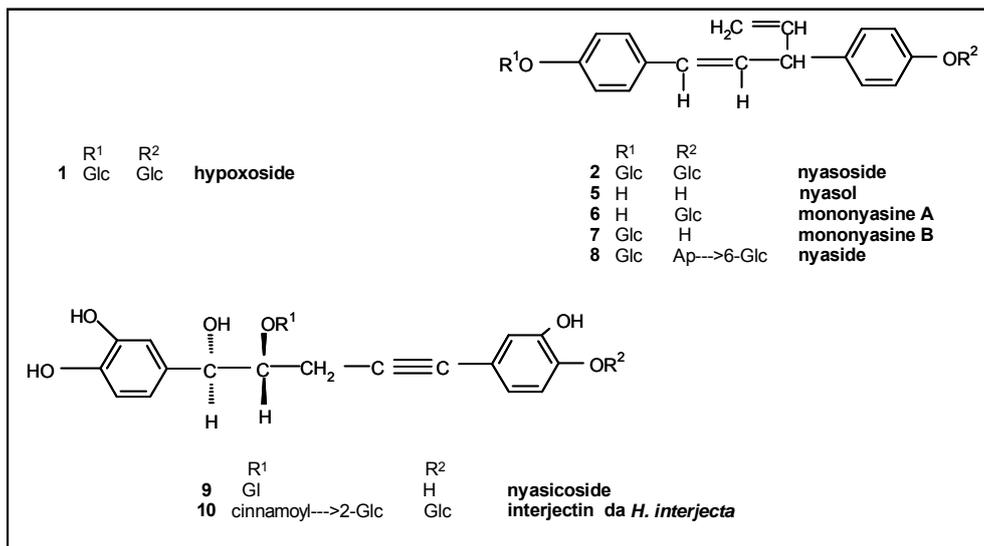


Figura 3. Norlignani isolati e caratterizzati da estratti metanolici dei rizomi di *Hypoxis nyasica* Bak del Malawi, *H. interjecta* Nel. del Sud Africa, *H. angustifolia* Lam. dallo Zimbabwe

In seguito all'isolamento di queste sostanze 'pure' è stato messo a punto anche un metodo di identificazione e quantificazione con la cromatografia ad alta prestazione, HPLC, in fase inversa utilizzando le sostanze purificate come standard di riferimento (24), nuovo sistema di analisi che ha dato inizio alla possibile standardizzazione degli estratti derivati dai rizomi anche di altre specie di *Hypoxis* e utilizzati effettivamente nella medicina tradizionale (25) e che ha consentito anche l'isolamento degli stessi e altri glucosidi norlignanici con il miglioramento delle tecniche separative nell'HPLC semipreparativa (26).

Le attività farmacologiche

Questi stessi composti norlignanici, isolati e identificati anche in altre specie di *Hypoxis* (25-27), si sono dimostrati essere anche i componenti attivi di queste piante medicinali.

Attività antitumorale è stata evidenziata e confermata da diversi studi *in vitro* e *in vivo* per l'hypoxoside e il suo aglucone rooperolo, a partire dal primo brevetto per gli estratti dei rizomi di *Hypoxis rooperi* del Sud Africa per il trattamento dei tumori (28) all'attività di inibizione della crescita in alcune linee cellulari cancerose (29), evidenziata in particolare per il rooperolo su fibroblasti formati da irradiazione γ di tessuti epidermici e polmonari (30). Hypoxoside e rooperolo si sono dimostrati anche promettenti *pro-drugs* per via orale quando somministrati a pazienti con tumori polmonari necrotizzanti non trattabili in altro modo durante studi clinici di fase I (31), senza dimostrare alcun effetto tossico (32).

Allo stesso modo il nyasoside isolato e caratterizzato dai rizomi di *Hypoxis nyasica* fu oggetto di un brevetto italiano per la sua attività citotossica su cellule KB (ID50=12 $\mu\text{g/mL}$) e P388 doxorubicina-resistenti (ID50=8 $\mu\text{g/mL}$) (33).

Per hypoxoside e rooperolo studi *in vitro* hanno evidenziato una buona attività su vari livelli dei processi infiammatori dall'inibizione dell'attività delle lipo-ossigenasi con conseguente blocco di formazione di leucotrieni ma non quella delle ciclo-ossigenasi che catalizzano la formazione delle prostaglandine (34), all'inibizione della produzione di citochine pro-infiammatorie come TNF- α , interleuchina 1- β e interleuchina-6 insieme anche alla soppressione della produzione di specie reattive dell'ossigeno che sono mediatori dell'infiammazione (35). A questo è da aggiungere la forte azione antiossidante del rooperolo in virtù della sua stretta somiglianza con l'acido nordiidroguaiaretico che è un ben noto antiossidante (34, 36).

Gli estratti lipofili di *Hypoxis rooperi* (poi *H. hemerocallidea*) entrano a far parte di preparazioni fitoterapiche per l'ipertrofia prostatica benigna fin dal 1969 (37) tanto che, attribuendo la sua attività al contenuto in fitosteroli (38), nel 2002 viene pubblicata nella Edizione 4.1 della Farmacopea Europea la monografia "Phytosterol" per una sostanza farmaceutica definita come 'miscela naturale di steroli ottenuti dai generi *Hypoxis*, *Pinus* e *Picea*' sulla base di risultati clinici ottenuti anche da estratti di altre piante (39).

Nel 1997 gli estratti di *Hypoxis spp.* vengono brevettati con il nome di VIROSTAT per la loro capacità di ridurre la velocità di caduta del contenuto ematico di linfociti T-CD4+ in pazienti HIV-positivi (40).

Un'attività analgesica viene dimostrata per l'hypoxoside, isolato da *Hypoxis obtusa* in questo istituto (18): alle dosi di 5 mg/kg, somministrate i.p. o s.c., riduce il dolore stimolato chimicamente nel test con formalina e nel writhing test nel topo (41) tramite un'azione anti-infiammatoria, dimostrata anche per il suo aglucone rooperolo (34, 35).

Il nyasolo, *algucone* del nyasoside diglucoside originato dalla *H. nyasica* (20), ma isolato come tale anche da un'altra pianta l'*Anemarrhena asphodeloides*, dimostra un'attività inibitrice della ialuronidasi, un enzima interessato nei processi infiammatori, ma ancora più interessante risulta la sua attività potenziante gli antimicotici azolici verso *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton mentagrophytes* (42).

Conclusioni

Nonostante queste molteplici attività riscontrate per le varie specie del genere *Hypoxis* un articolo *review* del 2009 pone un dubbio, in particolare sulla utilizzazione in Africa dell'*Hypoxis*

hemerocallidea (inizialmente riportata come *H. rooperi*), nota come *African potato*: “una pianta medicinale per le malattie moderne del 21° secolo?” (43).

Questo significa che ancora molto ci sarebbe da studiare nell’ambito di queste piante.

Bibliografia

1. Council of Europe. Vinblastine sulphate and Vincristine sulphate Monographs no. 0748 e no. 0749. *European Pharmacopoeia* 6.0 Edition, Strasbourg 2008:3189-3192.
2. Council of Europe. Paclitaxel, Monograph no. 1794. *European Pharmacopoeia* 6.0 Edition, Strasbourg 2008:2599-2602.
3. Council of Europe. Digoxina, Monograph no. 0079. *European Pharmacopoeia* 6.0 Edition, Strasbourg 2008:1701-1703.
4. Romeo JT. Integrative phytochemistry: from ethnobotany to molecular ecology. In: Recent advances in phytochemistry Series, Elsevier Science Ltd Pergamon Edition, Oxford UK; 2003: vol 37.
5. World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of Traditional Medicine. Geneva: WHO 2001; document WHO/EDM/TRM/2000.1.
6. World Health Organization. Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants. Geneva: WPRO Nonserial Publication 2003.
7. World Health Organization. Guidelines for Quality Assurance of Traditional Medicine Education in the Western Pacific Region. Geneva: WPRO Nonserial Publication 2005.
8. World Health Organization. Operational guidance: Information needed to support clinical trials of herbal products. In: World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, Geneva: WHO 2005; document TDR/GEN/Guidance/ 05.1.
9. World Health Organization. Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva: WHO 2002; document WHO/EDM/TRM/2002.1.
10. World Health Organization. WHO Medicines Strategy 2004-2007- Policy Component 2. Geneva: WHO 2004; document WHO/EDM/2004.5:45-55.
11. Unione Europea. Direttiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004, che modifica, per quanto riguarda i medicinali vegetali tradizionali, la direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea*, L.136/85, 30 aprile 2004.
12. Melchior H. *Engler’s Syllabus der Pflanzenfamilien*. Berlin, 12 th Edition, 1964;2:531.
13. Thompson MF. Studies in the Hypoxidaceae. Vegetative morphology and anatomy. *Botalia* 1976;12:111-7.
14. Dahlgreen RMT, Clifford HT, Yeo PF. *The Families of Monocotyledons: Structure, Evolution and Taxonomy*. New York: Springer Verlag; 1985:161-4.
15. Geerinck D. Considerations taxonomiques au sujet des Haemodoraceae et des Hypoxidaceae (Monocotyledones). *Bull Soc Roy Bo Belg* 1968;101:265-78.
16. Nicoletti M, Galeffi C, Messana I, Marini-Bettolo GB. Hypoxidaceae. Medicinal uses and the nor-lignan constituents. *J Ethnopharmacol* 1992;36:95-101.
17. Kresge N, Simoni RD, Hill RL. Lyman Creighton Craig: Developer of the Counter-current Distribution Method. *J Biol Chem* 2005;280(7):127-9.
18. Marini-Bettolo GB, Patamia M, Nicoletti M, Galeffi C, Messana I. Hypoxoside, a new glucoside of un common structure from *Hypoxis obtusa*. *Tetrahedron* 1982;38:1683-7.

19. Galeffi C, Federici E, Palazzino G, Nicoletti M. Further norlignans from *Hypoxis obtusa* Burch. *Gazz Chim Ital* 1997;127:501-4.
20. Marini-Bettolo GB, Nicoletti M, Messana I, Galeffi C, Msonthi JD, Chapya WA. Glucosides of *Hypoxis nyasica* Bak. The structure of nyasoside, a new glucoside biologically related to hypoxoside. *Tetrahedron* 1985;41:665-70.
21. Sibanda S, Nyandat E, Galeffi C, Nicoletti M. The co-occurrence of hypoxoside and nyasoside in *Hypoxis obtusa* Burch-complex. *Rev Latinoamer Quim* 1991;22:37-8.
22. Marini-Bettolo GB, Galeffi C, Multari G, Palazzino G, Messana I. Research on African medicinal plants. XXVII. Interjectin, a derivative of nyasicoside from *Hypoxis intjecta* and *Hypoxis multiceps*. *Tetrahedron* 1991;47: 6717-24.
23. Sibanda S, Ntabeni O, Nicoletti M, Galeffi C. Nyasol and 1,3(5)-diphenyl-1-pentene related glycosides from *Hypoxis angustifolia*. *Biochem Syst Ecol* 1990;18:481-3.
24. Betto P, Gabriele R, Galeffi C. Determination of nor-lignan glucosides by high performance liquid chromatography. *J Chromatography* 1992;59:131-5.
25. Kruger PB, Albrecht CF, Liebenberg RW, Van Jaarsveld PP. Studies on hypoxoside and rooperol analogues from *Hypoxis rooperi* and *Hypoxis latifolia* and their biotransformation in man using high performance liquid chromatography with inline sorption enrichment and diode array detection. *J Chromatogr B* 1994;662:71-8.
26. Laporta O, Pérez-Fons L, Mallavia R, Caturla N, Micol V. Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chem* 2007;10:1425-37.
27. Drewes SE, Hall AJ, Learmonth RA, Upfold UJ. Isolation of hypoxoside from *Hypoxis rooperi* and synthesis of (E)-1,5-bis(3',4'-dimethoxyphenyl)pent-4en-1-yne. *Phytochemistry* 1984;23:1313-6.
28. Drewes SE, Liebenberg RW. Extracts of plants of the Hypoxidaceae family for treatment of cancer. Roecar Holding, *Eur Patent Appl* 1983, EP 83103765.
29. Albrecht CF, Theron EJ, Kruger PB. Morphological characterisation of the cell-growth inhibitory activity of rooperol and pharmacokinetic aspects of hypoxoside as an oral prodrug for cancer therapy. *S Afr Med J* 1995;85:853-60.
30. Dietzsch E, Albrecht CF, Parker MI. Effect of rooperol on collagen synthesis and cell growth. *IUBMB Life* 1999;48:321-5.
31. Albrecht CF, Kruger PB, Smit B, Freestone M, Gouws L, Koch HP, Miller R, Van Jaarsveld PP. The pharmacokinetic behaviour of hypoxoside taken orally by patients with lung cancer in a phase I trial. *S Afr Med J* 1995; 85:861-865.
32. Smit BJ, Albrecht CF, Liebenberg RW, Kruger PB, Freestone M, Gouws L, Theron E, Bouic PJ, Etsebeth S, van Jaarsveld PP. A phase I trial of hypoxoside as an oral prodrug for cancer therapy – absence of toxicity. *S Afr Med J* 1995;85:865-870.
33. Marini-Bettolo GB, Msonthi JD, Galeffi C, Messana I, Nicoletti M. Procedimento per l'estrazione di un nuovo glucoside ad attività antitumorale da *Hypoxis nyasica* e preparati farmaceutici che lo contengono. *Ital Patent* 1983:Appl. A/8349561.
34. Van der Merwe MJ, Jenkins K, Theron E, Van der Walt BJ. Interaction of the di-catechols rooperol and dihydroguaiaretin acid with oxidative systems in human blood. *Biochem Pharmacol* 1993;45:303-11.
35. Guzek A, Nizankowska E, Allison AC, Kruger PB, Koj A. Cytokine production in human and rat macrophages and dicatechol rooperol and esters. *Biochem Pharmacol* 1996;52:991-8.
36. Nair VPD, Dairam A, Agbonon A, Arnason JT, Foster BC, Kanfer I. Investigation of the antioxidant activity of African Potato (*Hypoxis hemerocallidea* corm). *J Agric Food Chem* 2007;55:1707-11.

37. Liebenberg, RW. Pharmaceutical corm extract of Hypoxis, antiinflammatory and for the treatment of prostate gland hypertrophy. *German Offenlegungsschrift Patent* 1969 no.2015877.
38. Klipper KF, Hiltl DM, Schipp B. A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Br J Urol* 1997;80:427-43.
39. Lowe FC. Phytotherapy in the management of benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2001;58(6 suppl.1):71-6.
40. Liebenberg R, Kruger PB, Bouic PJD, De Vos Albrecht CF. Method of treating viral infections. *U.S. Patent* 1997 no.5609874.
41. Nicoletti M, Pieretti S, Capasso A, Galeffi C. Analgesic effects induced by hypoxoside, a nor-lignan glucoside from *Hypoxis spp.* *Phytother Res* 1996;10:398-401.
42. Iida Y, Oh K-B, Saito M, Matsuoka H, Kurata H. *In vitro* synergism between nyasol, an active compound isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, andazole agents against *Candida albicans*. *Planta Med* 2000;66:435-8.
43. Owira PMO, Ojewole JAO. 'African Potato' (*Hypoxis hemerocallidea* corm): a plant-medicine for modern and 21st century diseases of mankind? – A review. *Phytother Res* 2009;23:147-52.

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

Francesca Romana Gallo
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae), comunemente conosciuta come Hennè, è una pianta originaria delle regioni dell'Africa centro-orientale, che viene coltivata in diversi paesi come Egitto, Iran, Tunisia, India, Cina e in tempi più recenti anche in Florida.

Da millenni viene usata per tingere capelli, unghie e per fare tatuaggi in varie parti del corpo, contiene resine, tannini, glucosidi primari dell'hennoside A B e C il cui prodotto di idrolisi e di autoossidazione è il lawsone, acido gallico, glucosio, mannitolo, grassi, mucillagini (1).

Tale pianta è inoltre utilizzata nella medicina tradizionale per diverse patologie quali infiammazioni, micosi ed eruzioni della pelle, emicrania, calcolosi e malattie dell'apparato digerente (2).

Le foglie essiccate e polverizzate, emulsionate con acqua calda danno una pasta che, applicata sui capelli per 30-40 minuti, cambia il loro colore (3).

L'azione colorante è dovuta al lawsone (2-idrossi-1,4-naftochinone), uno dei costituenti dichiarati della *Lawsonia inermis* L., il cui contenuto viene accuratamente controllato data la sua potenziale tossicità (anemia emolitica, antifertilità, dermatiti allergiche, genotossicità dimostrata *in vitro*) (4). Il lawsone si lega alle squame della cuticola (cheratina dei capelli, delle unghie e della pelle) colorandole attraverso la formazione di legami elettrostatici e covalenti. Grazie ai due gruppi chetonici può formare legami a idrogeno con le proteine che lo trattengono all'interno delle loro pieghe.

Altre piante erroneamente chiamate Hennè vengono utilizzate per tingere i capelli es: *Cassia obovata* Collad. e *Indigofera tinctoria* L.

La Commissione Scientifica Europea sui Prodotti Cosmetici e i Prodotti non alimentari destinati ai consumatori, con il documento SCCNFP/0798/04 fornisce una valutazione e caratterizzazione tossicologica del lawsone definendolo, (e classificandolo nell'annesso III della lista delle sostanze che possono essere utilizzate ma con alcune restrizioni), come un "agente colorante non ossidante" se presente nel prodotto cosmetico finito a concentrazioni inferiori all'1,5 % (concentrazione tipica 1,26 %) (5).

Recentemente la tecnica del *fingerprint* è diventata un valido metodo d'identificazione per le piante dove non è possibile, facilmente e rapidamente, 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 *fingerprint* (6).

Le linee guida sulla qualità degli *Herbal medicinal products* dell'EMEA (EMEA/HMPC/3626/2009; EMEA/HMPC/CHMP/CVMP/214869/2006) raccomandano la definizione delle sostanze caratteristiche (markers), quando non esistono delle indicazioni sulla loro composizione quali-quantitativa (7) (8).

Per markers, si intendono costituenti o gruppi di costituenti presenti negli *herbal* (intesi come sostanze vegetali, preparazioni vegetali, prodotti medicinali vegetali) che sono di interesse, al fine del controllo indipendentemente dal fatto che abbiano un'attività terapeutica.

Esistono due categorie di markers:

1. markers attivi: costituenti o gruppi di costituenti che contribuiscono all'attività terapeutica;
2. markers analitici: costituenti o gruppi di costituenti che servono unicamente per scopi analitici.

In Italia, l'approvvigionamento all'estero della maggior parte delle droghe vegetali e la progressiva globalizzazione dei mercati, ha messo a disposizione nuove sottospecie e specie non presenti in Farmacopea europea ma utilizzate come costituenti di molti preparati erboristici.

L'utilizzo, quindi, della tecnica del *fingerprint* sembra essere molto utile al fine diagnostico qualitativo e immediato di un preparato vegetale.

Grazie a questa tecnica è stato possibile delineare il *fingerprint* caratteristico della *Lawsonia inermis* L. e distinguerlo da quello della *Cassia obovata* Collad. e della *Indigofera tinctoria* L. erroneamente chiamate Hennè, alle quali per conferire il potere colorante rosso caratteristico, possono essere aggiunti coloranti di sintesi quali il picrammato di sodio, coloranti ad ossidazione o lo stesso lawsone (9).

Estrazione della *Lawsonia inermis* L.

Le foglie, polverizzate ed essiccate (20 g) sono state miscelate con *metanolo* R (100 mL) e sonicate per 45 min. Il soprannatante è stato filtrato su carta e concentrato sotto vuoto fino ad ottenere un residuo. Gli estratti essiccati sono stati trattati con *cicloesano* R: *etile acetato* R: *acqua* R: *etanolo* R (9:5:10:4) in un imbuto separatore. La fase superiore, contenente principalmente clorofille, è stata eliminata e la fase inferiore evaporata e portata a secco. Campioni di *C. obovata* Collad. e *I. tinctoria* L. sono stati trattati nello stesso modo.

Materiali e metodi HPLC

- colonna C18 (5 µm; 250 x 4.6 mm) con colonna di guardia (5 µm; 3.9 x 20 mm)
- temperatura 35 °C
- loop da 20 µL
- campione 10 mg di ciascun estratto sono stati sciolti in 1mL di *metanolo* R e filtrati
- volume di iniezione 20 µL
- fase mobile *acqua* R contenente lo 0,2% di *acido formico* R (solvente A) e *acetonitrile* R (solvente B)
- gradiente di eluizione: 0-10 min 15% B in A, 10-40 min 15-20% B in A, 40-45 min 15% B in A
- flusso 0,8 mL/min
- rivelatore a serie di fotiodiodi a 337 nm

Fingerprint in HPLC

Gli estratti metanolici dei campioni esaminati danno i cromatogrammi riportati in Figura 1 e rappresentano il profilo chimico dettagliato della *Lawsonia inermis* L. Questi cromatogrammi, possono essere utili tanto nella identificazione, che nella valutazione quali-quantitativa di *Lawsonia inermis* L. presente in commercio sia come foglia che come prodotto commerciale a base di questa pianta.

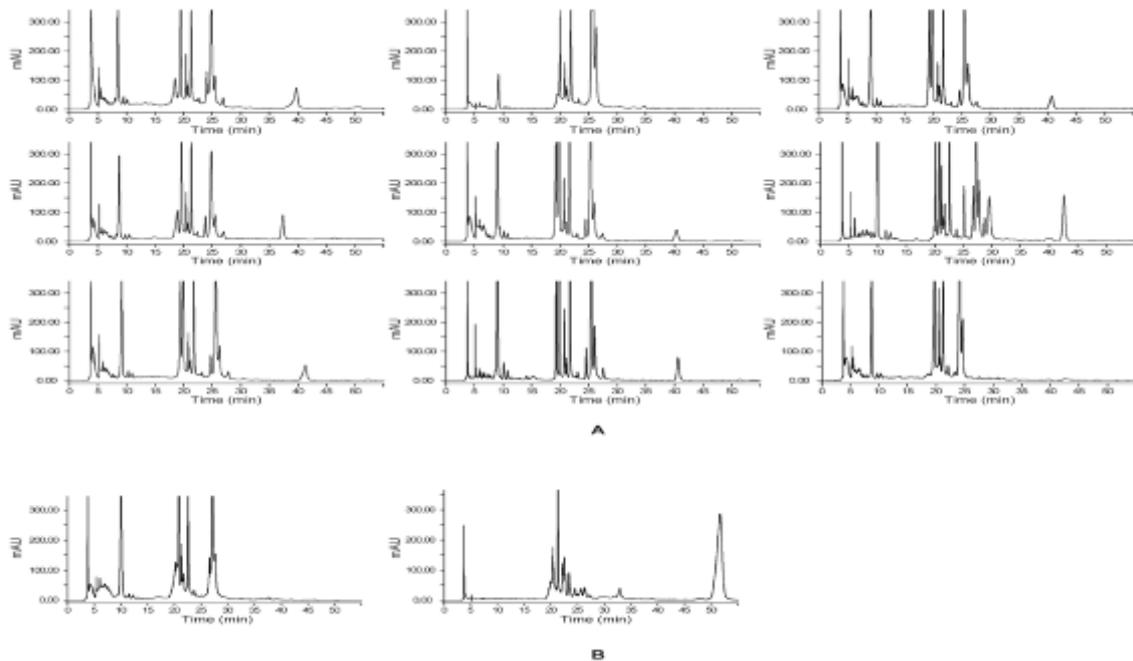


Figura 1. A) *Fingerprint* in HPLC di nove estratti metanolici di *Lawsonia inermis* L. foglie ottenute da differenti Paesi del medio Oriente. B) *fingerprint* di due significativi estratti di prodotti commerciali a base di *Lawsonia inermis* L.

Analisi Cromatografica dell'*Henné* con aggiunta di Lawsone

Questi *fingerprint* possono anche esser utili nell'individuare possibili adulteranti della pianta. Infatti uno dei problemi possibili esistenti nei prodotti naturali potrebbe essere quello dell'aggiunta di un costituente di sintesi, come per esempio lo stesso lawsone o di altre sostanze potenzialmente tossiche per esaltare il potere colorante (PPD parafenilendiamina, PTD paratoluendiamina, DDM diaminodifenilmetano, benzocaina, monobenziletere).

Materiali e metodi HPTLC

- lastra in gel di silice senza fluorescenza
- fase mobile *Etile acetato/Acido formico/Acqua* (82:9:9)
- tempo di eluizione 30 min
- otto macchie principali, che appaiono a: Rf 0,08; 0,26; 0,31; 0,46; 0,48; 0,62; 0,84; 0,91
- densitometro con rivelatore UV a 337 nm
- rivelatore spray derivatizzante NPR e *macrogol* (PEG 400)

Fingerprint in HPTLC

Gli estratti metanolici dei campioni esaminati danno i cromatogrammi riportati in Figura 2 e rappresentano il profilo chimico dettagliato della *Lawsonia inermis* L.

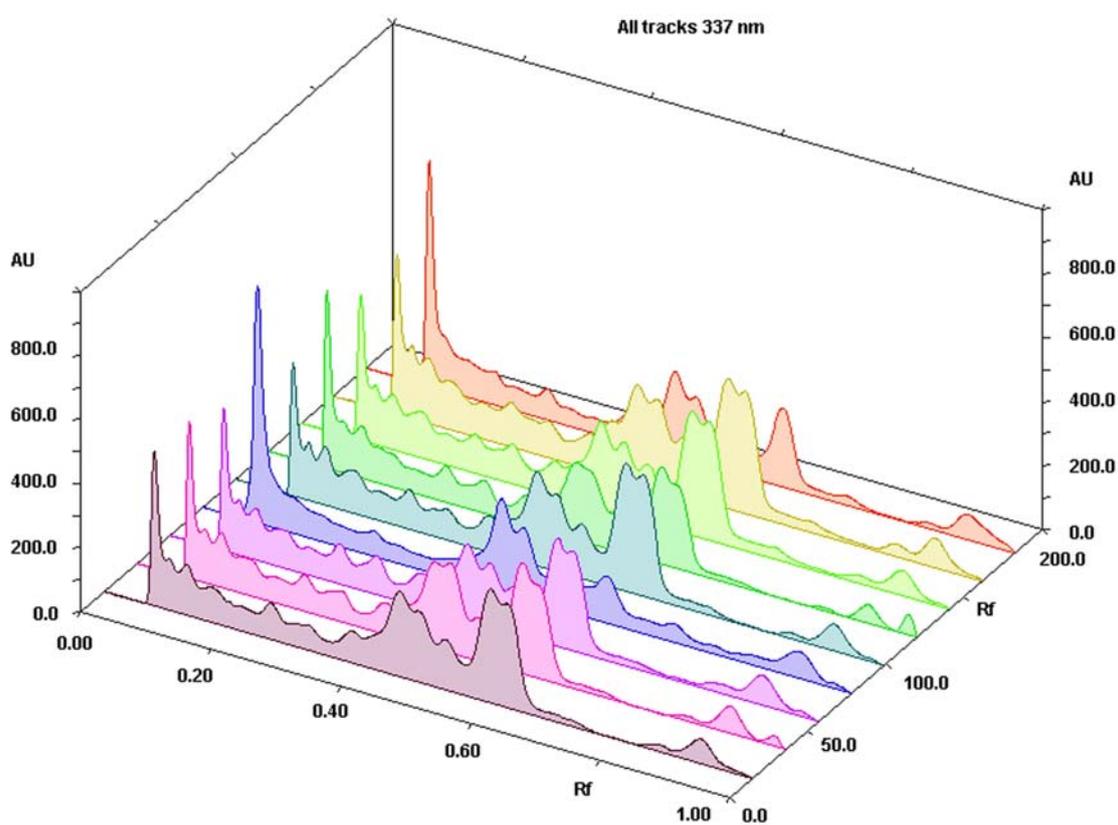


Figura 2. "Fingerprint" in HPTLC tridimensionale delle foglie di *Lawsonia inermis* L. proveniente da differenti Paesi del Medio Oriente a 337 nm

Questi cromatogrammi possono essere utili tanto nella identificazione, che nella valutazione quali-quantitativa della *Lawsonia inermis* L. presente in commercio sia come foglia che come prodotto commerciale a base di questa pianta vedi Figura 3.

Come complemento alle tecniche ufficialmente utilizzate in Farmacopea Europea, ultimamente anche la spettroscopia NMR rappresenta una tecnica utile per ottenere un veloce screening e fornire un complemento alle tecniche analitiche classiche quali HPLC, HPTLC, cromatografia gas-capillare ed elettroforesi. Numerosi lavori pubblicati negli ultimi anni prendono in considerazione la tecnica NMR come ulteriore metodo analitico per ottenere il *fingerprint* delle droghe vegetali e delle loro preparazioni e determinare quantitativamente i loro principi attivi mediante l'utilizzo di uno standard interno (10).

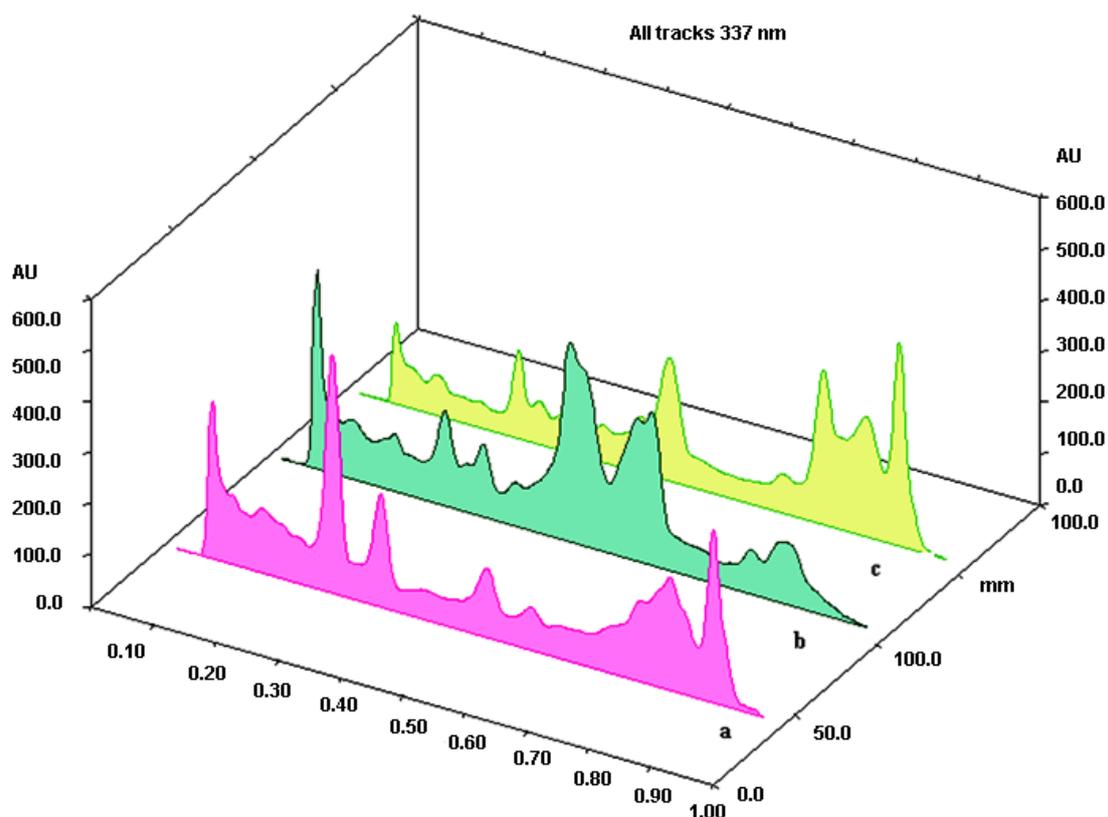


Figura 3. *Fingerprint* in HPTLC tridimensionale dei prodotti commerciali contenenti rispettivamente a) *Cassia obovata* Collad. b) *Lawsonia inermis* L. c) *Indigofera tinctoria* L.

Sulla base di tali presupposti, le nostre ricerche sono state finalizzate all'ottenimento del *fingerprint* tramite due differenti tecniche cromatografiche, entrambe efficienti e rapide, l'HPLC e l'HPTLC densitometrica.

Sono state mostrate e confrontate le due tecniche, applicate all'analisi di differenti piante di *Lawsonia inermis* L. e di prodotti commerciali che la contengono.

Il *fingerprint* in HPLC e HPTLC, sia della pianta che dei preparati commerciali, mostrano i picchi caratteristici della *Lawsonia inermis* L., utili per la valutazione della qualità della pianta (herbal drug) e per l'identificazione di eventuali adulterazioni e sofisticazioni degli stessi.

Tramite i differenti cromatogrammi in HPLC (Figura 1b) e in HPTLC (Figura 3) degli estratti metanolici dei prodotti commerciali, è possibile evidenziare chiaramente le eventuali adulterazioni e sofisticazioni della *L. inermis* L. con altre piante quali la *Indigofera tinctoria* L. e la *Cassia obovata* Collad.

In seguito verranno eseguiti spettri NMR, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Biologia Vegetale – Università “Sapienza” – Roma, ad ulteriore convalida dei risultati ottenuti con le sopradette tecniche cromatografiche impiegate.

Bibliografia

1. Lauchli S, Lautenschlager S. Contact dermatitis after temporary henna tattoos-an increasing phenomenon. *Swiss Med Wkly* 2001;131:199-202.
2. Ali BH, Bashir AK, Tanira MO. Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic effects of Lawsonia inermis L. (henna) in rats. *Pharmacology* 1995;51:356-63.
3. Kraeling ME, Bronaugh RL, Jung CT. Absorption of lawsone through human skin. *Cutan Ocul Toxicol* 2007;26(1):45-56.
4. Arranz Sánchez DM, Corral de la Calle M, Vidaurrázaga Díaz de Ancaya. Riesgos de los tatuajes de henna negra. *An Pediatr (Barc)* 2005;63(5):448-52.
5. The Scientific Committee on Cosmetic Product and Non-Food Products intended for consumers, Ref.: SCCNFP/0798/04; 2004.
6. Organizzazione Mondiale della Sanità. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Ref.: WHO/EDM/TRM/2000; Ginevra 2000.
7. Europa. European Medicines Agency. Reflection paper on stability testing of Herbal Medicinal Products and Traditional Herbal Medicinal Products. Ref.: EMEA/HMPC/3626/2009; London: 2009.
8. Europa. European Medicines Agency. Guideline on quality of combination Herbal Medicinal Products/traditional Herbal Medicinal Products. Ref.: EMEA/HMPC/CVMP/214869/2006; London 2008.
9. Gallo FR, Multari G, Giambenedetti M, Federici E. Chemical fingerprinting of Lawsonia inermis L. using HPLC, HPTLC and densitometry. *Phytochem Anal* 2008;19:550-9.
10. Bilia A R, Bergonzi MC, Lazari D, Vincieri FF. Characterization of commercial Kava- Kava herbal drug and herbal drug preparations by means of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem* 2002;50:5016-25.

SESSIONE II

Attività immunomodulanti e antinfiammatorie delle sostanze naturali

MOLTEPLICI RUOLI DEL SISTEMA VITAMINA D NELLA REGOLAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

Luciano Adorini
Intercept Pharmaceuticals, Corciano (PG)

Il sistema vitamina D

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] e in seguito nel rene, dando origine a 1,25-diidrossicolecalciferolo [1,25(OH)₂D₃], la forma biologicamente attiva dell'ormone (1).

1,25(OH)₂D₃ regola molteplici geni, oltre 1000, similmente ad un ormone, attivando o inattivando il DNA nucleare in vari tipi cellulari (2). 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 (3).

1,25(OH)₂D₃ regola in concerto con il paratormone il metabolismo del calcio, funzione indispensabile per sviluppo, formazione, accrescimento e stabilità dello scheletro e delle ossa (4). Questo ormone è infatti in grado di modulare l'assorbimento di calcio nell'intestino, il riassorbimento di calcio nei reni e la mobilizzazione/accumulo di calcio dalle/nelle ossa, di conseguenza 1,25(OH)₂D₃ è indispensabile per lo sviluppo, l'accrescimento, la formazione e la stabilità dello scheletro e delle ossa. La diminuita disponibilità di 1,25(OH)₂D₃ causa un ridotto apporto di calcio nell'organismo e una conseguente sottrazione del calcio dalle ossa. Ciò comporta malformazioni dello scheletro e rammollimento delle ossa che sfociano nel rachitismo se il disturbo colpisce individui nell'età di sviluppo. In età avanzata, la carenza di 1,25(OH)₂D₃ incrementa il rischio di osteoporosi. Lo sforzo dell'organismo per mantenere nella norma i livelli del calcio provoca un eccesso di produzione di paratormone con conseguente iperparatiroidismo secondario.

Oltre a queste funzioni classiche, molte altre attività della vitamina D sono state scoperte più di recente e sono attualmente in fase di studio, in particolare la sua capacità di modulare il sistema immunitario (5).

Effetti immunomodulatori di agonisti del VDR

Il sistema endocrino della vitamina D è coinvolto in una varietà di processi biologici in grado di modulare le risposte immunitarie, e svolge un ruolo importante nelle malattie autoimmuni. 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 (6).

Oltre ad esercitare effetti modulatori diretti su cellule T e B, gli agonisti VDR sono in grado di modellare fenotipo e funzione di cellule dendritiche (DC), promuovendo proprietà tolerogeniche che favoriscono l'induzione di cellule T regolatorie piuttosto che T effettrici (7). Questi effetti tolerogenici degli agonisti VDR sono stati dimostrati in vari modelli sperimentali e potrebbero essere sfruttati, in linea di principio, per il trattamento di una varietà di malattie autoimmuni, e altre patologie immuno-mediate caratterizzate da infiammazione cronica.

Il VDR è presente nei linfociti T e B e nelle cellule presentanti l'antigene (macrofagi e cellule dendritiche). 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 (8). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, prodotto da macrofagi, cellule dendritiche, linfociti T e B, contribuisce fisiologicamente, attraverso il VDR espresso in questi tipi cellulari, alla regolazione della risposta immunitaria (9).

Le cellule dendritiche sembrano essere il bersaglio principale di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a livello delle cellule del sistema immunitario. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induce in cellule dendritiche proprietà tolerogeniche che favoriscono l'induzione di cellule T regolatorie, capaci di sopprimere la risposta immunitaria (7). Inoltre, le cellule T possono essere inibite direttamente da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La modulazione della risposta immunitaria mediata da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 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.

Potenziamento dell'immunità innata

La capacità del sistema vitamina D di potenziare la risposta immunitaria innata è stata recentemente evidenziata da importanti studi. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rappresenta una importante connessione tra Toll-like receptors (TLR) e risposta innata anti-batterica contro la tubercolosi, attraverso l'induzione di peptidi antimicrobici quali catelicidina (10), codificato da un gene di risposta primaria a VDR che viene marcatamente indotto da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (11). Una correlazione clinica di questa importante connessione è fornita dalla osservazione che individui afro-americani, noti per avere una maggiore sensibilità alla tubercolosi, hanno ridotti livelli sierici di $25(\text{OH})\text{D}_3$, il precursore di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, e sono inefficaci nella induzione di catelicidina, suggerendo che una condizione di sufficienza di vitamina D contribuisca alla diminuita sensibilità ad tubercolosi (10). Tuttavia, la proprietà anti-batteriche del sistema vitamina D devono essere bilanciate con gli effetti inibitori sulla immunità adattiva.

Inoltre, i livelli di CYP27B1, l'enzima che converte $25(\text{OH})\text{D}_3$ in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sono aumentati nelle ferite e sono indotti in cheratinociti da TGF- β 1, che catalizza la loro produzione di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, che a sua volta aumenta l'espressione di catelicidina e induce TLR2 e CD14 (12). Questi dati mostrano un nuovo ruolo di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nella riparazione delle ferite, rendendo questo ormone una componente fondamentale dell'immunità innata nella risposta anti-microbica.

Un altro aspetto delle proprietà stimolatorie di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sulla immunità innata è fornito dalla osservazione che la vitamina D3 indotta dalla luce solare nella pelle viene idrossilata da cellule dendritiche locali in ormone attivo, che a sua volta fa aumentare su cellule T

l'espressione del recettore per chemiochine epidermiotropiche CCR10, consentendo loro di migrare in risposta a CCL27 (13).

Modulazione dell'immunità adattativa

Il sistema endocrino della vitamina D modula le risposte immunitarie di tipo adattativo attraverso molteplici meccanismi, che coinvolgono soprattutto cellule dendritiche e cellule T.

Induzione di proprietà pro-tolerogeniche in cellule dendritiche mieloidi

Agonisti VDR arrestano la differenziazione e la maturazione di cellule dendritiche mieloidi, con associata diminuita espressione delle molecole costimolatorie CD40, CD80, CD86, marcata inibizione della produzione di IL-12 e contemporaneo aumento della produzione di IL-10 (14). Inoltre, agonisti VDR aumentano in cellule dendritiche l'espressione di ILT3, una molecola inibitoria associata con l'induzione della tolleranza, anche se l'espressione ILT3 è indispensabile per la capacità di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ di indurre cellule T regolatorie (Treg) (15). Induzione di cellule dendritiche tolerogeniche da parte di agonisti VDR, a loro volta capaci di promuovere Treg, è stata dimostrata in modelli di rigetto allogenico (16) e di diabete autoimmune (17).

La differenziazione di cellule dendritiche è associata alla sintesi di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, che sembra esercitare un funzione autoregolatoria inibendo la differenziazione dei precursori monocitari immaturi in risposta a stimoli maturativi. Gli effetti immunomodulanti esercitati da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ su cellule dendritiche circolanti mieloidi (M-DC) e plasmacitoidi (P-DC) dimostrano una capacità differenziale di questo ormone a modulare la produzione di citochine e chemiochine, mostrando effetti marcati in M-DC e trascurabile in P-DC (18). Inoltre, la capacità di inibire lo sviluppo di cellule Th1 e la stimolazione di cellule Treg sono selettivamente indotte da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in M-DC, ma non in P-DC. Poiché P-DC rappresentano cellule tolerogeniche naturali, la mancanza della loro modulazione da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sembra quindi lasciare immutato il loro potenziale tolerogenico.

Modulazione di linfociti effettori

Gli agonisti VDR non solo modulano il fenotipo e la funzione di cellule dendritiche in senso tolerogenico, ma possono anche avere effetti diretti su cellule T e B. Gli agonisti VDR sono inibitori selettivi della differenziazione di cellule Th1 (19), e inibiscono direttamente citochine di tipo Th1, quali IL-2 (20) e IFN- γ (21). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha anche dimostrato la capacità di potenziare lo sviluppo di cellule Th2 attraverso un effetto diretto su cellule CD4^+ . Pertanto, sia cellule Th1 che Th2, a seconda del loro stato di attivazione e differenziazione, possono essere bersagli diretti di agonisti VDR (22).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ha anche potenti effetti diretti sulle cellule B, inducendo apoptosi e inibendo la proliferazione, la generazione di cellule B della memoria, la differenziazione di plasmacellule, e la produzione di immunoglobuline (23).

Il trattamento con agonisti VDR inibisce anche la differenziazione di cellule Th17, una popolazione di cellule T patogene caratterizzate dalla produzione di IL-17 (24). La produzione di IL-17 è sostenuta da IL-23, un membro della famiglia IL-12 formato da catene p40 e p19, che viene inibito da agonisti VDR.

In conclusione, VDR agonisti inibiscono cellule T patogene quali Th1 e Th17 e, in condizioni adeguate, possono favorire una deviazione verso il fenotipo Th2. Questi effetti sono

in parte direttamente indotti in cellule T, ma certamente la modulazione delle cellule dendritiche da parte di agonisti VDR svolge un ruolo importante nella modulazione di cellule T. Così, VDR agonisti inibiscono selettivamente, sia direttamente che indirettamente, sottopopolazioni di cellule T in grado di mediare infiammazione cronica e danno tissutale.

Aumento di cellule T regolatorie

Cellule dendritiche tolerogeniche indotte da un breve trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ o suoi analoghi possono indurre cellule Treg $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ \text{Foxp3}^+$ che sono in grado di mediare tolleranza ad allotrapianti e di arrestare lo sviluppo di diabete di tipo 1 (5). Agonisti VDR non solo favoriscono l'induzione di cellule Treg $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$, e rafforzano la loro attività soppressoria, ma possono anche promuovere la loro migrazione a siti infiammatori. M-DC producono costitutivamente alti livelli di CCL17 e CCL22, ulteriormente innalzati da stimolazione di CD40 (18). CCL22, un agonista selettivo di CCR4, recluta cellule Treg caratterizzate da espressione di CD4, CD25, Foxp3, e CCR4(25). La produzione di CCL22 è notevolmente innalzata, in M-DC circolanti, da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, indicando che VDR agonisti possono favorire il reclutamento di cellule Treg da parte di questa sottopopolazione di cellule dendritiche (18).

Bibliografia

1. DeLuca, H F. Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev* 2008;66:S73-87.
2. Wang, T T, Tavera-Mendoza L E, Laperriere D., Libby E, MacLeod N B, Nagai Y, Bourdeau V, Konstorum A, Lallemand B, Zhang R, Mader S, White JH. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct $1,25$ -dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 200;519:2685-95.
3. Carlberg C, Dunlop T W. An integrated biological approach to nuclear receptor signaling in physiological control and disease. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16:1-22.
4. Holick M F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006;116:2062-72.
5. Adorini L, Penna G.. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4:404-12.
6. Holick M F. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357:266-81.
7. Adorini L, Penna G.. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum Immunol* 2009;70:345-52.
8. Adams JS, Hewison M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:80-90.
9. Mora J R, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2008;8:685-98.
10. Liu, PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zugel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-3.
11. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JH, Mader S, White JH. Cutting edge: $1,25$ -dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909-12.

12. Schaubert JR, Dorschner A, Coda AB, Buchau AS, Liu PT, Kiken D, Helfrich JR, Kang S, Elalieh A, Steinmeyer HZ, Zugel U, Bikle DD, Modlin RL, Gallo RL. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2007;117: 803-811.
13. Sigmundsdottir H, Pan J, Debes GF, Alt C, Habtezion A, Soler D, Butcher EC. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol* 2007;8: 285-293.
14. Penna G, Adorini L. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164: 2405-2411.
15. Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, Adorini L. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood* 2005;106: 3490-3497.
16. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T cells induced by 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance. *J Immunol* 2001; 167: 1945-1953.
17. Gregori G, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ analog enhances regulatory T cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2002;51: 1367-1374.
18. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007;178: 145-153.
19. Mattner F, Smiroldo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, Martino G, Panina-Bordignon P, Adorini L. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol* 2000;30: 498-508.
20. Alroy I, Towers T, Freedman L. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D₃: direct inhibition NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. 1995; *Mol Cell Biol* 15: 5789-5799.
21. Cippitelli M, Santoni A. Vitamin D₃: a transcriptional modulator of the IFN- γ gene. *Eur J Immunol* 1998; 28: 3017-3030.
22. Mahon BD, Wittke A, Weaver V, Cantorna MT. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem* 2003;89: 922-932.
23. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol* 2007;179: 1634-1647.
24. Tang J, Zhou R, Luger D, Zhu W, Silver PB, Grajewski RS, Su SB, Chan CC, Adorini L, Caspi RR. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol* 2009; 182: 4624-4632.
25. Curiel T J, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10: 942-949.

IMPORTANZA DELLA LATTOFERRINA NELL'OMEOSTASI SISTEMICA DEL FERRO

Alessandra Frioni, Tiziana Natalizi, Melissa Tendini, Enrica Pacifici e Piera Valenti
Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, Sapienza Università di Roma

Introduzione

Il ferro è un elemento essenziale per gli esseri viventi grazie alla sua capacità di acquisire e cedere elettroni. Nell'uomo è presente in forma emica nell'emoglobina e nella mioglobina, mentre in forma non-emica è riscontrabile in vari enzimi e proteine.

La riserva di ferro non-emico nelle cellule e nel sangue è garantita dalla ferritina, proteina capace di sequestrare più di 4500 ioni ferrici per molecola, e in misura minore dall'emosiderina, mentre il trasporto e il rilascio del ferro dal sangue ai tessuti è garantito dalla transferrina, una glicoproteina in grado di chelare due ioni ferrici per molecola (1).

La quantità totale di ferro disponibile nei tessuti è regolata da complessi meccanismi che ne impediscono l'accumulo in quantità eccessive. Infatti, se presente in eccesso, il ferro può essere tossico a causa della sua capacità di promuovere la formazione di specie reattive dell'ossigeno, la moltiplicazione microbica e l'attivazione dei mediatori dell'infiammazione. È questo il motivo per cui nell'uomo la quantità di ferro libero nei fluidi biologici e nei tessuti deve essere modulata in modo da non eccedere la concentrazione di 10^{-18} M, molto lontana da quella che indurrebbe la produzione di specie reattive dell'ossigeno, la moltiplicazione microbica e virale e i fenomeni infiammatori (2). La regolazione e il mantenimento dell'omeostasi sistemica del ferro sono fattori chiave per la salute dell'uomo.

Regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro

L'omeostasi sistemica del ferro avviene attraverso la regolazione della sua acquisizione con la dieta. Un'eccessiva esposizione ad elevate dosi di ferro induce il blocco dell'assorbimento (3, 4), mentre un incremento dell'assorbimento è osservato in risposta ad una inefficace eritropoiesi o ipossia.

Il trasporto del ferro dagli enterociti al sangue avviene attraverso la ferroportina (5), unica proteina in grado di trasportare il ferro dai tessuti al circolo. Nel sangue, il ferro viene complessato dalla transferrina e trasportato al fegato. Gli eritrociti senescenti (120 giorni di vita) vengono giornalmente fagocitati dai macrofagi che immagazzinano il ferro o lo rilasciano nel sangue sempre via ferroportina, secondo il fabbisogno (Figura 1).

L'assorbimento del ferro da parte degli enterociti e il suo riciclo da parte dei macrofagi sono quindi due fasi fondamentali e altamente regolate che, se rese nulle o danneggiate per molteplici cause, portano ad un difetto nell'omeostasi del ferro. In particolare, uno stato di ipoferrinemia (ID) può essere associato ad un sovraccarico di ferro principalmente nel fegato e nei macrofagi (6). È stato, inoltre, dimostrato che negli epatociti il ferro modula la sintesi di un piccolo peptide, l'epcidina che, escreto nel sangue, svolge un ruolo chiave nell'omeostasi del ferro (7-9). Questo peptide, la cui sintesi è indotta anche da stati infiammatori, negli enterociti e nei

macrofagi è in grado di legarsi alla ferroportina, che viene quindi internalizzata e degradata nelle cellule, rendendo così impossibile il trasporto del ferro dalle cellule al sangue (10, 11).

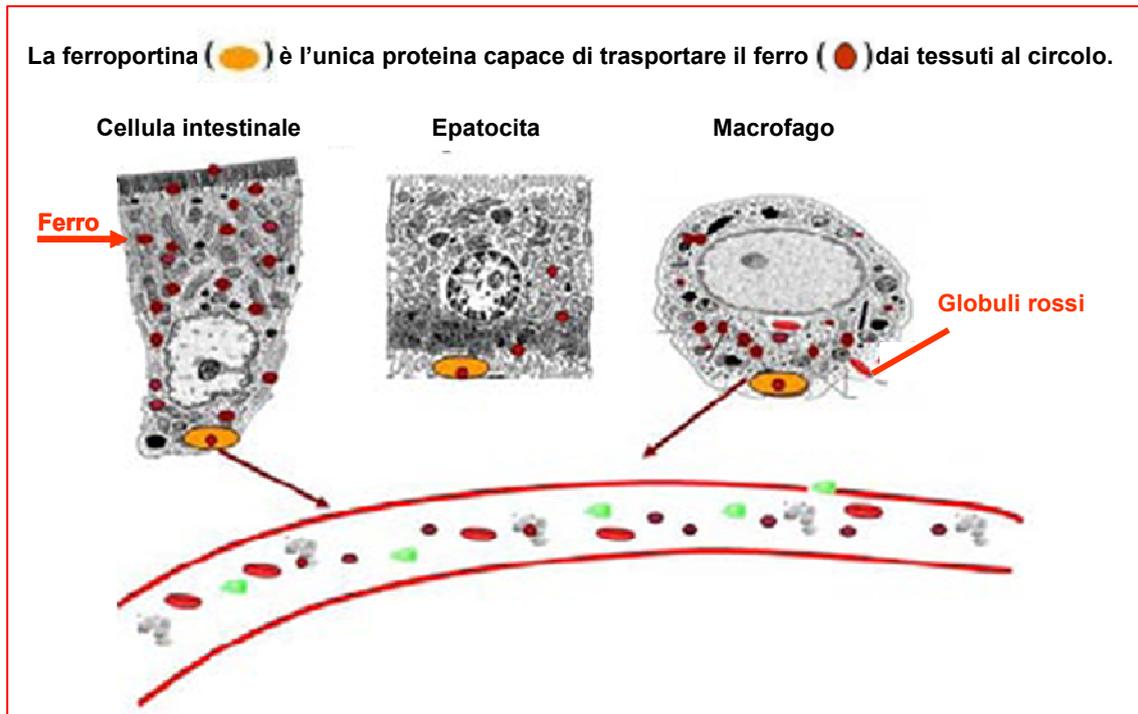


Figura 1. Trasporto del ferro dai tessuti al circolo attraverso la ferroportina

Ne consegue che l'incapacità degli enterociti e dei macrofagi di trasportare il ferro al sangue, a causa del legame tra la ferroportina e l'epcidina, può condurre a stati di carenza di ferro (12, 13).

Condizioni di ipossia, quali quelle che si possono verificare nei difetti di eritropoiesi, inducono invece una diminuzione dell'espressione dell'epcidina, e conseguentemente un aumento del trasporto del ferro dai tessuti al sangue (14).

Da quanto detto, si può dedurre che in stati di ID un'efficace terapia dovrebbe considerare anche la modulazione della espressione della ferroportina, unica proteina in grado di trasportare il ferro dai tessuti al circolo.

Ipoferremia e anemia da carenza di ferro in gravidanza

L'ipoferremia (ID) e l'anemia da carenza di ferro (IDA), oltre ad avere un significativo impatto sullo stato di salute degli individui, diventa un serio problema in gravidanza, in quanto contribuisce significativamente ad incrementare i rischi per la madre (parto prematuro e mortalità) e per il neonato (basso peso alla nascita e ritardo di crescita) (15). In particolare durante la gravidanza la richiesta di ferro aumenta a causa dell'espansione della massa dei globuli rossi materni e della crescita dell'unità feto-placentare.

Per prevenire e curare ID e IDA sono stati proposti diversi tipi di interventi:

- diete modificate e diversificate per aumentare la biodisponibilità di ferro;

- diete con cibi arricchiti di ferro (cibi fortificati);
- terapie con somministrazione di ferro.

La supplementazione di ferro in gravidanza, oltre a mostrare scarsi risultati in termini di efficacia, è spesso associata a scarsa tollerabilità che ne compromette la “compliance”.

Le nuove conoscenze sui complessi meccanismi dell'omeostasi cellulare e sistemica del ferro hanno stimolato la ricerca di nuovi composti in grado di modulare la concentrazione di ferro nei tessuti e nel circolo.

Lattoferrina e gravidanza

La lattoferrina, una glicoproteina dell'immunità naturale in grado di chelare ioni ferrici, presente in tutte le secrezioni mucose, è secreta dalle ghiandole esocrine e dai neutrofili nei siti di infezione e di infiammazione. Tra le molteplici funzioni ascritte a questa glicoproteina, vanno annoverate quelle relative all'attività antimicrobica (16), correlate o meno alla capacità di chelare il ferro, e quelle che influenzano direttamente o indirettamente la risposta cellulare in relazione o meno all'ingiuria microbica (17).

In vivo, come già riportato, la concentrazione di ioni ferrici liberi non deve eccedere 10^{-18} M. Nelle secrezioni, l'assenza di ferro disponibile è garantita dalla lattoferrina, mentre nel siero dalla transferrina. In situazioni fisiologiche, la lattoferrina è satura in ferro solo al 20% e pertanto è in grado di legare ancora ioni ferrici. In particolari situazioni patologiche (sanguinamento, danno cellulare, mancato trasporto del ferro dai tessuti al circolo) la concentrazione di ferro disponibile nelle secrezioni o nei tessuti aumenta e la lattoferrina, chelando l'eccesso di ferro libero, impedisce la formazione delle specie reattive dell'ossigeno e diminuisce la suscettibilità dell'ospite alle infezioni.

Tra le sue numerose funzioni, alla lattoferrina viene attribuita anche la capacità di diminuire la sintesi delle citochine pro-infiammatorie, inclusa l'interleuchina 6 (IL-6). In alcune situazioni patologiche, la quantità di ferro è così elevata (18) da attivare 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 meccanismi dell'omeostasi del ferro fanno supporre un ruolo chiave della lattoferrina nel ripristino della sintesi e della funzione della ferroportina e quindi, nella regolazione del trasporto del ferro dai tessuti al circolo.

Assunta per via orale (100 mg due volte al *die*), lontano dai pasti per evitare la sua degradazione a causa dell'elevata acidità gastrica, la lattoferrina raggiunge integra il duodeno in quantità pari a circa l'80% della dose somministrata. La lattoferrina viene quindi assorbita negli enterociti grazie a specifici recettori (19), per poi raggiungere il nucleo (20), dove modula con efficacia i fattori chiave dell'omeostasi sistemica del ferro. La lattoferrina, inoltre, non è immessa nel circolo sanguigno, dove la sua concentrazione, dopo somministrazione rimane bassa (<1 $\mu\text{g/mL}$) come nelle condizioni fisiologiche (21).

In Italia, la classica terapia per il trattamento della carenza di ferro e delle anemie da carenza di ferro in gravidanza è rappresentata dalla somministrazione orale di solfato ferroso, che, come già riportato, è poco efficace e determina numerosi effetti indesiderati quali irritabilità gastrica (crampi, nausea, vomito) e disturbi intestinali (dolori, costipazione e diarrea). Mentre i primi sembrano essere associati ad irritazione delle mucose e ad un'alterata motilità intestinale, dipendenti dalla disponibilità di ferro libero nel lume gastroenterico (22), i disturbi intestinali potrebbero correlarsi alle variazioni della flora batterica intestinale indotte dalla elevata concentrazione di ferro somministrata. Infatti, per ottenere risultati clinicamente accettabili nel trattamento dell'ID e IDA,

peraltro limitati al solo incremento della concentrazione dei globuli rossi e dell'emoglobina (23), si è costretti a somministrarne un'alta dose giornaliera, a causa della scarsa solubilità del ferro.

Trial clinici condotti da Paesano e coll (23-25) dimostrano come la lattoferrina possa rappresentare una valida alternativa terapeutica agli attuali trattamenti di supplementazione di ferro in stati di ID e IDA, mostrando una maggiore efficacia nell'aumentare la concentrazione di emoglobina ma soprattutto quella di ferro serico totale, senza alcun effetto indesiderato.

Lo schema dei "trias" clinici eseguiti include, come gruppo di controllo, donne in gravidanza affette da ipoferremia e anemia che rifiutavano ogni tipo di supplementazione di ferro, un secondo gruppo comprendeva donne in gravidanza trattate con una somministrazione orale di 520 mg di solfato ferroso al *die*, un terzo gruppo comprendeva donne in gravidanza trattate con una somministrazione orale di una capsula contenente 100 mg di lattoferrina, due volte al *die*, lontano dai pasti.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che nelle donne trattate per 30 giorni con la lattoferrina i valori dell'emoglobina, ma soprattutto quelli del ferro serico totale, aumentavano in modo significativo ($p < 0,001$) rispetto a quelli delle donne trattate con solfato ferroso, nonostante le pazienti trattate con solfato ferroso ricevessero giornalmente una concentrazione in ioni ferro (156 mg/*die*) maggiore rispetto a quella con lattoferrina (8,8 mg/*die*) (23, 24). Ovviamente, nelle donne che rifiutavano la terapia si assisteva ad una diminuzione sia dei valori dell'emoglobina sia di quelli del ferro serico totale, in misura maggiore con il procedere della gravidanza (Tabella 1).

Tabella 1. Concentrazione dell'emoglobina e del ferro serico totale prima e dopo 30 giorni in assenza di terapia o con terapia con solfato ferroso o lattoferrina in donne a differenti trimestri di gravidanza affette da ipoferremia e anemia da carenza di ferro (valori medi)

Terapia		Tempo 0		Dopo 30 giorni di terapia	
		Emoglobina g/dL	Ferro serico totale µg/dL	Emoglobina g/dL	Ferro serico totale µg/dL
Nessuna	I trimestre	11,2	40	11,2	35
	II trimestre	11,2	40	10,6	26
	III trimestre	11,0	37	10,2	23
Solfato ferroso	I trimestre	10,3	38	11,2	52
	II trimestre	10,8	40	11,9	63
	III trimestre	11,2	52	11,9	59
Lattoferrina	I trimestre	11,0	48	12,8	110
	II trimestre	11,2	44	12,5	93
	III trimestre	11,1	46	12,8	98

Nelle donne in gravidanza a cui era stata somministrata la lattoferrina *per os* dal momento dell'insorgenza dell'ID e IDA fino alla fine della gravidanza, si osservavano, al momento del parto, valori eccellenti sia per i globuli rossi, l'emoglobina, il ferro serico totale, la ferritina serica che per l'ematocrito, come riassunto nella Tabella 2.

Tabella 2. Valori ematici (intervalli e medie) al momento del parto in 90 donne in gravidanza trattate con lattoferrina 100 mg due volte al di lontano dai pasti

Globuli rossi X 10 ³	Emoglobina g/dL	Ferro serico totale µg/dL	Ferritina serica ng/dL	Ematocrito %
3860-4650	11,4-13,7	85-135	15-52	31-45%
4255	12,5	110	33,5	38%

I risultati ottenuti mostrano chiaramente la maggiore efficacia della lattoferrina rispetto alla classica terapia nel ripristino dei valori ematici. Va sottolineato che la maggior efficacia non può essere attribuita alla quantità di ferro totale somministrata con la lattoferrina (8,8 mg/die), circa venti volte inferiore a quella somministrata con solfato ferroso (154 mg/die), ma a più complesse funzioni della proteina. La lattoferrina, pertanto, sembra modulare l'omeostasi del ferro a livello sistemico (26).

Infatti, la potente attività della lattoferrina nella cura dell'ID e IDA in gravidanza è probabilmente dovuta al ripristino dell'espressione e della funzione della ferroportina come proposto nella Figura 2. La lattoferrina modula l'omeostasi sistemica del ferro ripristinando l'attività della ferroportina che è nuovamente in grado di trasportare il ferro dai tessuti al circolo, ristabilendo la concentrazione fisiologica del ferro serico totale e della ferritina serica nel sangue.

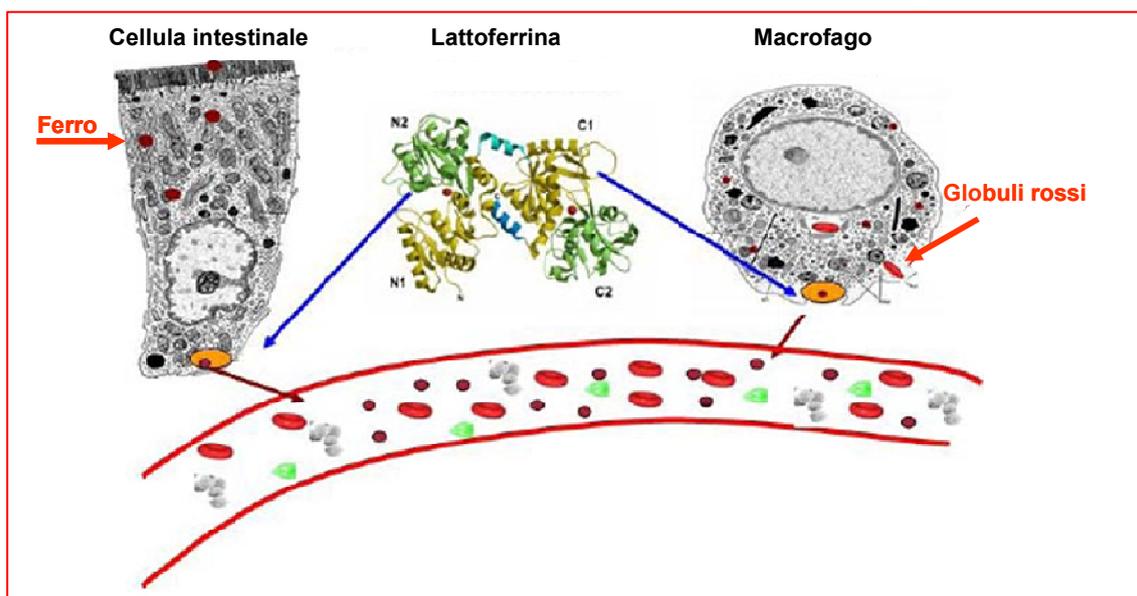


Figura 2. Meccanismo d'azione della lattoferrina

Bibliografia

1. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2137-3.
2. Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, Ward CG. Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43:325-0.
3. Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Murphy TL, Vulpe CD, McKie AT, Anderson GJ. A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Ireg1 or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut* 2003;52(3):340-6.
4. Frazer DM, Anderson GJ. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood Cells Mol Dis.* 2003;30:288-97.
5. Fleming RE, Bacon BR. Orchestration of iron homeostasis. *N Engl J Med* 2005;352:17-28.
6. Détivaud L, Nemeth E, Boudjema K, Turlin B, Troadec MB, Leroyer P, Ropert M, Jacquelinet S, Courselaud B, Ganz T, Brissot P, Loréal O. Hepcidin levels in humans are correlated with hepatic iron stores, haemoglobin levels, and hepatic function. *Blood* 2005;106(2):746-8.

7. Ganz T. Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab* 2005;1(3):155-7.
8. Loréal O, Haziza-Pigeon C, Troadec MB, Detivaud L, Turlin B, Courselaud B, Ilyin G, Brissot P. Hepcidin in iron metabolism. *Curr Protein Pept Sci* 2005;6(3):279-91.
9. Ganz T. Heparin - a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:171-82.
10. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004;306:2090-3.
11. De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, Kaplan J. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J* 2007;26(12):2823-31.
12. Chaston T, Chung B, Mascarenhas M, Marks J, Patel B, Srani SK, Sharp P. Evidence for differential effects of heparin in macrophages and intestinal epithelial cells. *Gut* 2008;57(3):374-82. Epub 2007 Oct 26.
13. Ganz T. Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(2):394-400.
14. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, Nizet V, Johnson RS. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest* 2007;117:1926-2.
15. School TO. Iron status during pregnancy: setting the stage for mother and infant. *Am J Clin Nutr* 2005;81:1218-2.
16. Valenti P, Antonini G. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2576-87.
17. Baker EN, Baker HM. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(22):2531-9.
18. Superti F, Berlutti F, Paesano R, Valenti P. Structure and activity of lactoferrin - A multi-functional protective agent for human health. In: Fuchs H. (Ed.). *Iron Metabolism and Disease*. 2008 p. 187-218.
19. Suzuki YA, Lopez V, Lönnnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(22):2560-75.
20. Ashida K, Sasaki H, Suzuki YA, Lönnnerdal B. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biomaterials* 2004;17(3):311-5.
21. Brock JH. The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell Biol* 2002;80(1):1-6.
22. Schumann K, Ertle T, Szegner B, Elsenhans B, Solomons NW. On risks and benefits of iron supplementation recommendations for iron intake revisited. *J Trace Elem Med Biol* 2007;21(3):147-68.
23. Paesano R, Torcia F, Berlutti F, Pacifici E, Ebano V, Moscarini M, Valenti P. Oral administration of lactoferrin increases hemoglobin and total serum iron in pregnant women. *Biochem Cell Biol* 2006 ;4:377-0.
24. Paesano R, Pietropaoli M, Gessani S, Valenti P. The influence of lactoferrin, orally administered, on systemic iron homeostasis in pregnant women suffering of iron deficiency and iron deficiency anaemia. *Biochimie* 2009;91(1):44-51.
25. Valenti P, Pacifici E, Pietropaoli M, Paesano R. La lattoferrina per os, un'importante alternativa priva di effetti indesiderati, nella prevenzione e trattamento dell'ipoferrremia e anemia da carenza di ferro in gravidanza. *Riv It Ost Gin* 2008;17:783-90.
26. De Domenico I, Ward MD, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:72-81.

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 (b), Noemi Moroni (a), Rossana Psaila (a), Pasquale Pierimarchi (a)
(a) Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare ARTOV, CNR, Roma
(b) Istituto di Astrofisica Spaziale e Fisica Cosmica (NAF-IASF), 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. Queste attività terapeutiche sono state riconosciute principalmente attraverso l'esperienza clinica ma esistono solo pochi studi scientifici sulle azioni biologiche di questi estratti naturali. In particolare, per quanto riguarda l'olio essenziale di eucalipto (*Eucalyptus Oil*, EO) e il suo componente principale eucaliptolo (1,8-cineolo), ne sono state descritte le proprietà antisettiche nei confronti di vari agenti microbici (1) e il potenziale anti-infiammatorio sia *in vitro* che *in vivo* (2-4). Relativamente poco si sa circa l'influenza di questo olio essenziale sui componenti cellulari del sistema immune, e in particolare sul sistema monocitico/macrofagico, uno dei principali effettori cellulari della risposta immune innata dell'organismo verso agenti allergenici e infezioni patogene.

In questo studio, 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) e *in vivo*, sui monociti/granulociti da sangue periferico di ratti in condizioni basali e in situazioni di immuno-soppressione indotta dal chemioterapico 5-fluorouracile (5-FU).

Materiali e metodi

Le colture di macrofagi umani aderenti (*monocyte-derived macrophages*, MDMs) sono state allestite a partire da sangue periferico eparinato, previa separazione con Lympholyte della frazione linfomonocitica. I macrofagi aderenti così ottenuti sono stati mantenuti a 37 °C in atmosfera contenente il 5% di CO₂ per 7 giorni, in terreno RPMI 1640 addizionato del 10% di siero bovino fetale (FCS). Le cellule sono state poi trattate con EO alle concentrazioni 0,008% e 0,016% (v/v), selezionate sulla base di esperimenti preliminari di dose-risposta. L'analisi morfologica è stata effettuata mediante microscopia ottica in contrasto di fase e microscopia elettronica a scansione (SEM). L'effetto di EO sull'attività fagocitaria è stata valutata a) *in vitro* sui macrofagi umani, mediante somministrazione di microsfele di polistirene fluorescenti (Molecular Probes) e analisi al microscopio confocale; b) *in vivo*, dopo somministrazione di EO per os (4mg/Kg/die per 15gg), sulla frazione monocitica/granulocitica da sangue periferico di ratti BDIX immuno-competenti od immuno-soppressi con il chemoterapico 5-fluorouracile (5-FU – 100mg/Kg in unica dose i.p.), mediante analisi citofluorimetrica dell'*uptake* di *E. coli* fluorescenti (fagotest kit, ORPEGEN Pharma). 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". Per l'analisi statistica dei dati è stato usato il test t di Student, considerando significativi valori di $P < 0,01$.

Risultati *in vitro*

Effetto dell'EO sulla morfologia e la capacità fagocitaria di MDMs umani

L'osservazione al microscopio ottico in contrasto di fase e al SEM (Figura 1) ha mostrato che dopo 24 ore di trattamento con 0,008% o 0,016% EO, le cellule assumono caratteristiche morfologiche tipiche dei macrofagi attivati, mostrate anche dagli MDMs attivati con LPS: il trattamento con LPS rappresenta il controllo positivo di attivazione macrofagica (5). Sono infatti più grandi di dimensioni rispetto al controllo non trattato, hanno una maggiore adesività al substrato e presentano più estese strutture microvillose sulla superficie cellulare con evidenti filopodi.

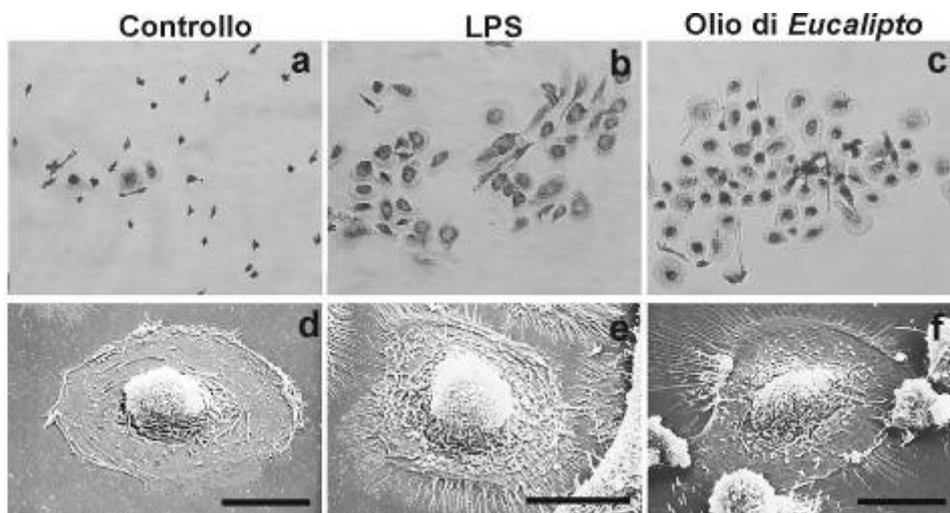


Figura 1. Effetto di EO sulla morfologia di MDMs umani. Osservazione al microscopio ottico in contrasto di fase (a-c) e al microscopio elettronico a scansione (d-f) dell'attivazione indotta dal trattamento con EO, su macrofagi umani aderenti, ottenuti da sangue periferico

L'osservazione al microscopio confocale, dopo somministrazione di microsferi di polistirene fluorescenti (*beads*), ha mostrato che il trattamento con EO aumenta drasticamente, in modo dose-dipendente, la capacità fagocitaria degli MDMs, molto di più di quanto si osserva dopo trattamento con LPS. L'analisi quantitativa dell'avvenuta fagocitosi è stata effettuata valutando sia il numero medio di *beads* fagocitate/cellula che la percentuale di cellule fagocitanti (Figura 2).

In particolare, i valori di *uptake* ottenuti risultavano essere:

- Controllo non trattato: 11 *beads*/cellula, percentuale di cellule fagocitanti pari al 13,7%.
- LPS: 11 *beads*/cellula, percentuale di cellule fagocitanti pari al 18,26%
- EO 0,008%: 24 *beads*/cellula, percentuale di cellule fagocitanti pari al 27,1%
- EO 0,016% v/v: 64,8 *beads*/cellula, percentuale di cellule fagocitanti pari al 10% (la bassa percentuale di cellule fagocitanti registrata è dovuto al fatto che in questo campione il numero di *beads* fagocitate, costituite da polistirene indigeribile, è talmente alto, che porta a morte le cellule fagocitanti).

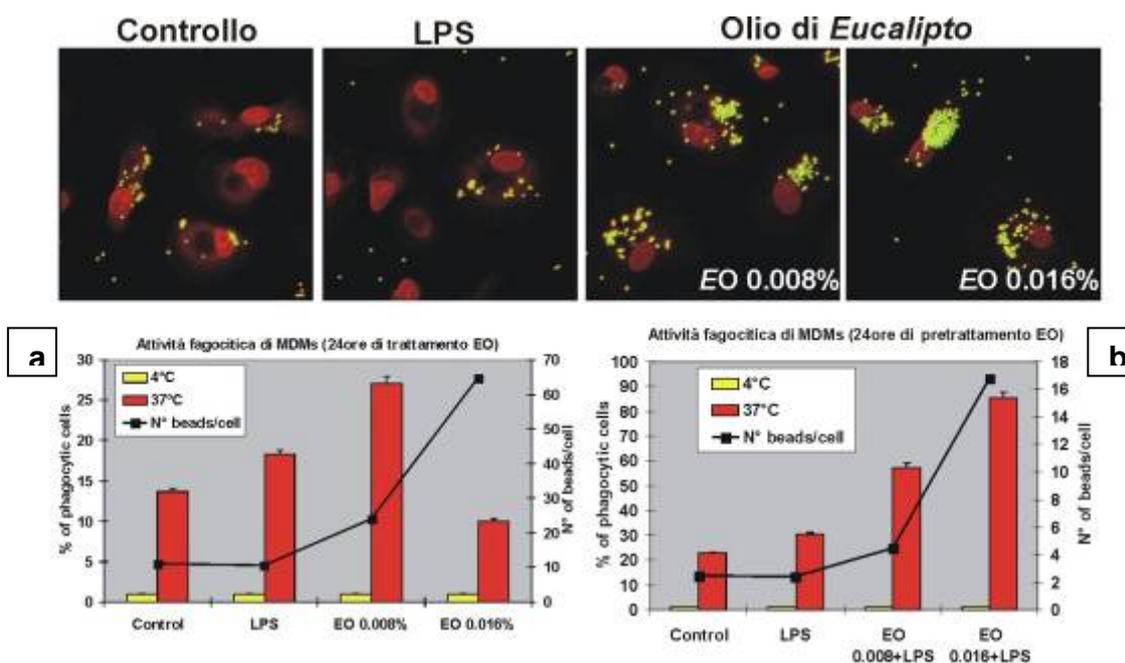


Figura 2. Effetto di EO sulla capacit  fagocitaria di MDMs umani

Inoltre, il pre-trattamento con EO 24 ore prima dell'aggiunta di LPS alle colture cellulari   in grado di incrementare, senza alcuna tossicit  e sempre in modo dose-dipendente, l'attivit  fagocitaria dei macrofagi in confronto al trattamento con il solo LPS (Figura 2b). Questi dati indicano chiaramente che l'implementazione della capacit  fagocitaria   indotta da EO sia in assenza che in presenza di uno stimolo di natura batterica.

Lo stimolo della fagocitosi indotto da EO, richiede l'integrit  del network tubulinico, come dimostrato dal fatto che agenti destabilizzanti il citoscheletro quali il nocodazolo, che depolimerizza la tubulina, inibiscono drasticamente la fagocitosi EO-indotta, ma non quella LPS-indotta (5).

Effetto dell'EO sulla produzione citochinica da parte degli MDMs umani

Nonostante l'attivazione morfologica e la stimolazione della capacit  fagocitaria indotte dal trattamento con EO,   stato registrato un rilascio di citochine pro-infiammatorie e immunostimolatorie nel mezzo di coltura significativamente pi  basso rispetto ai campioni trattati con il solo LPS (Figura 3). Ci    particolarmente evidente per le citochine cospicuamente prodotte dai macrofagi attivati con LPS e in particolare per IL-4, IL-6 e TNF- α . Inoltre, in accordo con la propriet  anti-infiammatoria attribuita all'EO, il pre-trattamento con EO 24 ore prima dell'aggiunta di LPS al mezzo di coltura   in grado di diminuire significativamente la produzione citochinica LPS-indotta.

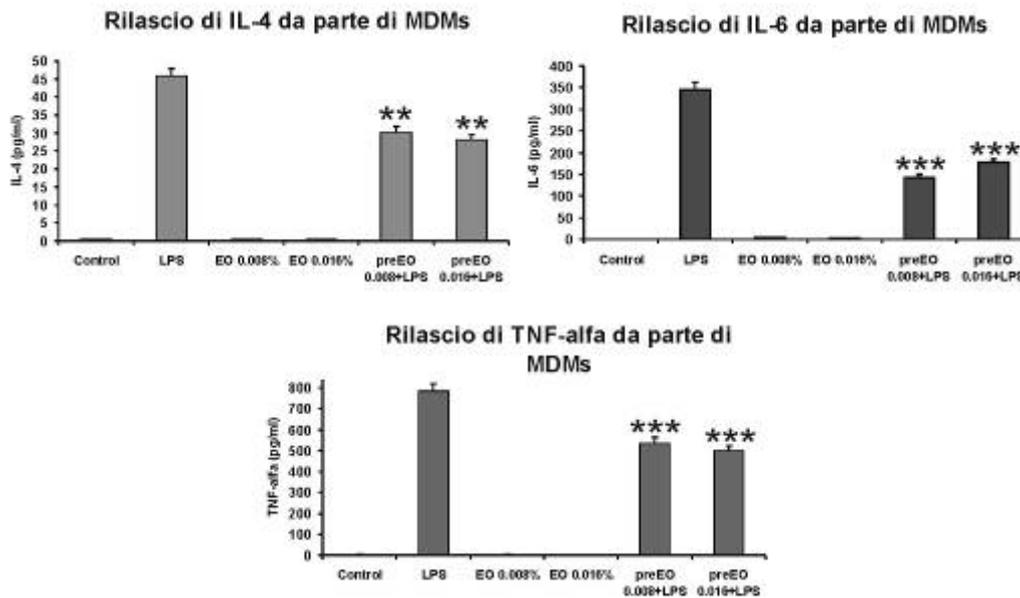


Figura 3. Effetto del trattamento con EO sul rilascio di IL-4, IL-6 e TNF- α da parte di MDMs umani; * $P < 0,01$ vs controllo, ** $P < 0,001$ vs controllo, *** $P < 0,0001$ vs controllo (5)

Risultati *in vivo*

Effetto dell'EO sull'attivazione delle cellule mononucleate del sangue periferico di ratti in condizioni di immuno-competenza o di immuno-soppressione

L'effetto *in vivo* di EO è stato valutato su ratti BDIX immuno-competenti (verifica dell'effetto in condizioni basali) od immuno-soppressi in seguito a somministrazione di 5-FU (effetto sulla mielosoppressione da chemioterapici), secondo gli schemi di trattamento riportati in Figura 4.

La valutazione dei parametri ematologici in condizioni di immuno-competenza ha mostrato che EO è in grado di aumentare significativamente la percentuale dei monociti circolanti e di incrementare, parallelamente, l'attività fagocitaria sia dei granulociti che, in misura maggiore, dei monociti circolanti (Figura 5a).

Infine, negli animali immuno-soppressi mediante somministrazione di 5-FU, un chemioterapico ampiamente usato nel trattamento di diversi tipi di cancro (6) e che produce mielotossicità come principale effetto collaterale (7), il trattamento con EO è in grado di ripristinare la percentuale di granulociti circolanti, a livelli paragonabili a quelli riscontrati negli animali non sottoposti ad immuno-soppressione (Figura 5b). Inoltre, mentre il trattamento con 5-FU induce un decremento della capacità fagocitaria della frazione monocitica/granulocitica del sangue periferico, negli animali sottoposti al trattamento combinato EO/5-FU tale capacità è riportata a livelli paragonabili a quelli registrati negli animali immuno-competenti.

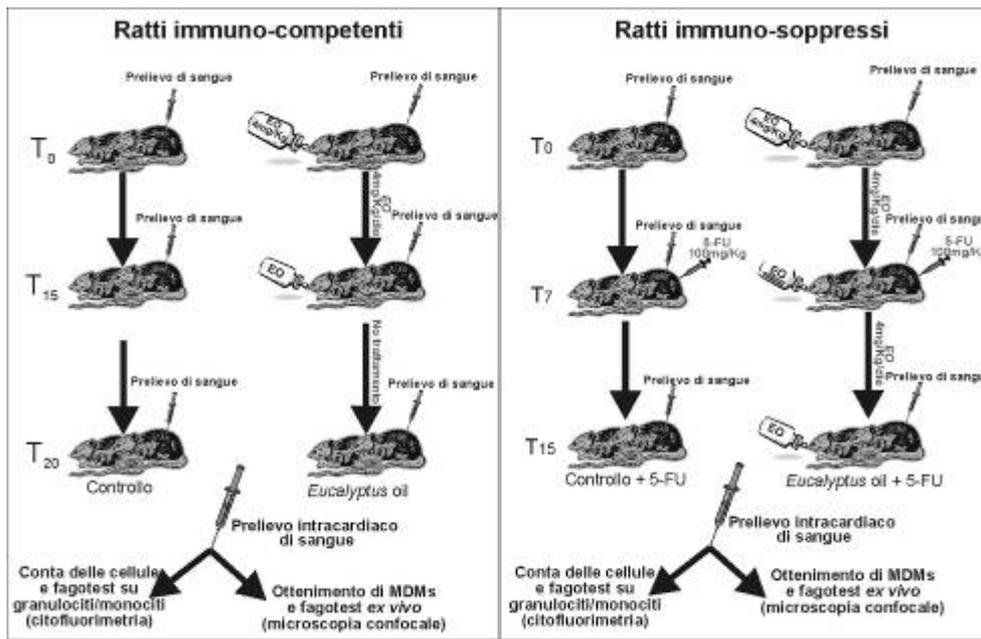


Figura 4. Schema dei trattamenti *in vivo* con EO su ratti BDIX immuno-competenti e immuno-soppressi con 5-FU (5)

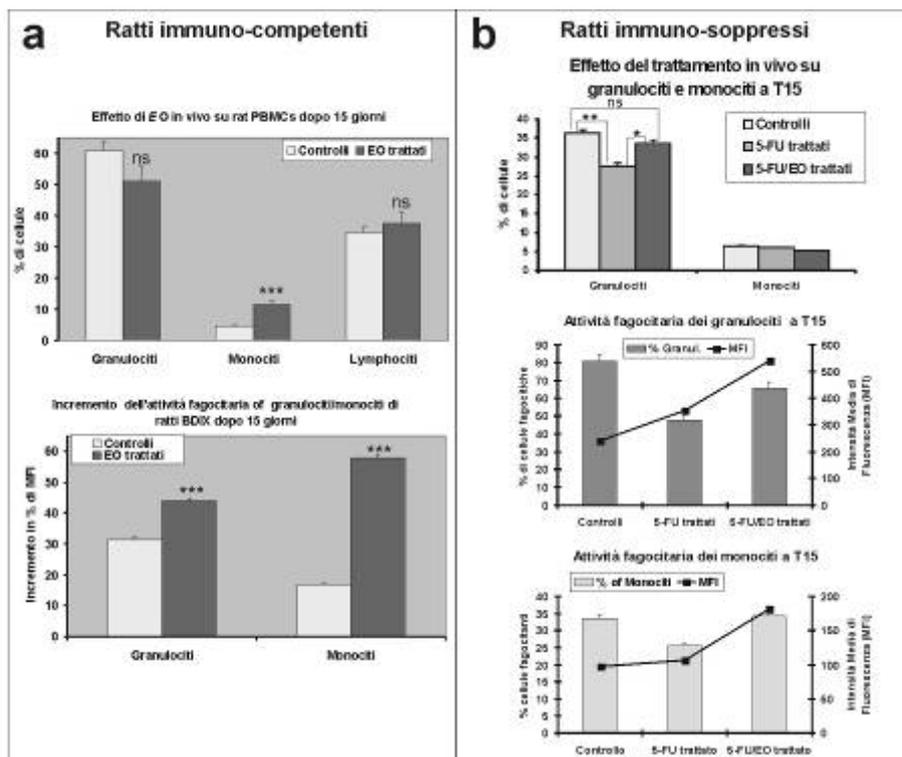


Figura 5. Effetto dei trattamenti *in vivo* con EO sull'attività della frazione monocitica/granulocitica del sangue periferico di ratti BDIX immuno-competenti (a) e immuno-soppressi con 5-FU (b); * $P < 0,01$ vs controllo, ** $P < 0,001$ vs controllo, *** $P < 0,0001$ vs controllo, ns = P non significativo (5)

Conclusioni

I nostri dati dimostrano che:

- a) Il trattamento *in vitro* con EO è in grado di attivare gli MDMs umani stimolando fortemente la loro capacità fagocitaria.
- b) 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.
- c) 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.
- d) Il trattamento combinato 5-FU/EO è in grado di inibire la mielotossicità indotta dal 5-FU.

Questi risultati forniscono un supporto scientifico per un uso addizionale di tale estratto naturale oltre a quelli già noti di antisettico e anti-infiammatorio. Un approfondimento delle proprietà dei singoli componenti di questo olio essenziale potrebbe portare allo sviluppo di una nuova famiglia di agenti immuno-regolatori, da utilizzare come adiuvanti nelle patologie immuno-soppressive, nelle malattie infettive e nella chemioterapia.

Bibliografia

1. Schelz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 2006; 77:279–285.
2. Juergens UR, Stober M, Vetter H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. *Eur J Med Res* 1998; 3:508-510.
3. Juergens UR, Stober M, Schmidt-Schilling L, Kleuver T, Vetter H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes *ex vivo*. *Eur J Med Res* 1998; 3:407-412.
4. Juergens UR, Dethlefsen U, Steinkamp G, Gillissen A, Repges R, Vetter H. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med* 2003; 97:250-256.
5. Serafino A, Sinibaldi Vallebbona P, Andreola F, Zonfrillo M, Mercuri L, Federici M, Rasi G, Garaci E, Pierimarchi P. Stimulatory effect of Eucalyptus essential oil on innate cell-mediated immune response. *BMC Immunol* 2008; 9:17.
6. Seifert P, Baker HL, Reed ML. Comparison of continuously infused 5-fluorouracil with bolus injection in treatment of patients with colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1975; 36:123-128.
7. Schetz JD, Wallace HJ, Diasio RB: 5-Fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cells as a possible mechanism of toxicity. *Cancer Res* 1984; 44:1358-1363.

IL CNF1 DI *ESCHERICHIA COLI*: UNA SOSTANZA NATURALE DI ORIGINE BATTERICA CON POTENZIALI PROPRIETÀ TERAPEUTICHE

Alessia Fabbri, Sara Travaglione, Carla Fiorentini
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione: tossine batteriche usate in terapia

La produzione di tossine batteriche di natura proteica rappresenta una delle principali strategie molecolari messe in atto dai batteri patogeni per interagire con le cellule di mammifero.

Tali fattori di virulenza manipolano, attraverso molteplici e sofisticati meccanismi, le funzioni della cellula ospite in maniera tale da favorire la sopravvivenza e la diffusione dei microorganismi. La comprensione dei meccanismi molecolari attraverso cui agisce una tossina batterica è di fondamentale importanza per convertire una proprietà della tossina stessa, normalmente dannosa per l'organismo ospite, in uno strumento farmacologico utile per modulare, in maniera controllata, *pathway* cellulari alterati in diverse patologie.

Ecco una lista di alcune tossine batteriche usate in terapia o potenzialmente impiegabili come farmaci:

- Neurotossina botulinica (BoNt), dal *Clostridium botulinum* (distonia, disordini del tono muscolare, disordini del Sistema Nervoso Autonomo, cosmesi).
- Tossina Letale (LF) dal *Bacillus anthracis* (potenziale trattamento del cancro).
- Tossina della pertosse (PXT) dalla *Bordetella pertussis* (potenziale impiego nel controllo della replicazione di HIV).
- Fattore Citotossico Necrotizzante 1 (CNF1) da *Escherichia coli* (potenziale impiego nel miglioramento dell'apprendimento e della memoria, adiuvante mucosale).
- Tossina del colera (CT) e Zonula occludens toxin (ZOT) da *Vibrio cholerae* (adiuvante mucosale, veicolo per il rilascio di farmaci).
- Tossina della pertosse (PXT) e Adenilato ciclasi (AC) da *B. pertussis* (adiuvante mucosale).
- Immunotossine (terapia del cancro).

Tra le tossine elencate, il CNF1 rappresenta il principale oggetto dei nostri studi da molti anni (1).

Il Fattore Citotossico Necrotizzante 1 (CNF1) di *Escherichia coli*

E. coli è una delle principali cause di infezioni intestinali. Questo batterio, che fa parte della normale flora dell'intestino, diventa altamente patogeno in seguito all'acquisizione di geni codificanti fattori di virulenza, tra i quali il CNF1. I ceppi di *E. coli* produttori di CNF1 rappresentano i più comuni patogeni in molte infezioni extraintestinali, tra cui le infezioni del tratto urinario (2, 3) e, occasionalmente, vengono ritrovati nelle feci di bambini affetti da diarrea (4-6).

Il CNF1 è una proteina monomerica di circa 113 kDa che interagisce, sulla superficie delle cellule eucariotiche, con il suo recettore, recentemente identificato con il recettore della laminina (7). La tossina viene successivamente endocitata e rilasciata nel citoplasma mediante un meccanismo dipendente dall'acidificazione della vescicola endocitica (8). Una volta nel citoplasma, il CNF1 agisce sul suo bersaglio cellulare, rappresentato dalle piccole proteine G della famiglia Rho (Rho, Rac, Cdc42), una classe di proteine regolatorie altamente conservata (9). In particolare, la tossina deamida uno specifico residuo di glutammina, situato nello *switch 2* della proteina e cruciale nell'idrolisi del GTP [glutammina 63 in Rho (10, 11) e glutammina 61 (12) in Rac e Cdc42]. Modificando tale aminoacido in acido glutammico (9-12), il CNF1 stabilizza la proteina G nella forma attiva legata al GTP. L'attivazione sostenuta delle Rho GTPasi rende tali molecole, che normalmente sono stabili, molto più sensibili all'ubiquitinazione e alla degradazione attraverso la via del proteasoma, riducendo pertanto la loro quantità e attività all'interno della cellula (13). Mediante l'attivazione delle Rho GTPasi, il CNF1 è in grado di modulare numerose funzioni cellulari, quali il differenziamento (14), la trascrizione genica (15), la progressione del ciclo cellulare (16) e l'organizzazione del citoscheletro di actina (17). Inoltre, è stato dimostrato come il CNF1 non sia in realtà citotossico, come indica il nome, bensì favorisca la sopravvivenza cellulare rendendo le cellule resistenti a stimoli apoptotici (18). L'attività del CNF1 sulle Rho GTPasi, che rappresentano regolatori cruciali di molteplici funzioni cellulari (9) rende questa tossina un potenziale strumento farmacologico per diversi scopi terapeutici.

Applicazioni terapeutiche

Adiuvante dei vaccini

Studi passati hanno dimostrato come il CNF1, attivando le Rho GTPasi, induca la secrezione di citochine pro-infiammatorie e immunomodulanti (19, 20). L'analisi degli effetti immunomodulanti in un modello murino di somministrazione orale ha mostrato che, in maniera assimilabile alla tossina del colera, il CNF1 stimola una risposta adiuvante anti-ovoalbumina (OVA), sia sistemica che mucosale (21). Animali immunizzati per via orale con OVA, un prototipo di antigene solubile, e trattati contemporaneamente con CNF1 mostravano una risposta anticorpale IgG anti-OVA comparabile a quella stimolata dalla tossina del colera. Questo tipo di risposta non si osservava con il CNF1 C866S, un mutante della tossina reso enzimaticamente inattivo in seguito alla sostituzione della serina in posizione 866 con una cisteina, a dimostrazione del fatto che l'attività catalitica del CNF1 è essenziale per le proprietà adiuvanti della tossina. Allo stesso modo, la tossina dermonecrotica di Bordetella (DNT), una tossina attivante le Rho GTPasi strettamente correlata al CNF1, mostrava proprietà adiuvanti. Tali evidenze suggeriscono fortemente come il CNF1, oltre ad attivare effettori e regolatori della risposta immunitaria innata, possa anche stimolare il sistema immunitario adattativo. La modulazione delle proteine Rho fornisce pertanto un possibile approccio per lo sviluppo di nuovi immunoadiuvanti mucosali efficaci.

Apprendimento e memoria

In questo contesto, abbiamo recentemente dimostrato come nel topo l'attivazione costitutiva delle Rho GTPasi, indotta da una singola iniezione intracerebroventricolare del CNF1, determini un riarrangiamento del citoscheletro di actina e un arricchimento dell'albero

dendritico nelle cellule neurali corticali, accompagnato dalla stimolazione della trasmissione sinaptica e da un miglioramento sostanziale dei processi di apprendimento e memoria (22). Tali effetti permangono per mesi e non si verificano in animali iniettati con il mutante enzimaticamente inattivo CNF1 C866S.

La plasticità sinaptica è il meccanismo neuronale alla base dell'apprendimento e della formazione delle memorie. È stato osservato, infatti, come le spine dendritiche possano cambiare forma in risposta all'esperienza ed essere eliminate o generate nel SNC dell'adulto (23). La morfologia delle spine dendritiche è determinata essenzialmente dall'organizzazione del citoscheletro di actina che, a sua volta, dipende dall'attività delle Rho GTPasi. Tali evidenze unite alle osservazioni da noi effettuate sulle cellule neuronali corticali primarie di topo suggeriscono come la modulazione farmacologica delle Rho GTPasi e del sistema citoscheletrico, potrebbe rappresentare una strategia efficace per migliorare la connettività neuronale associata ai processi di apprendimento e formazione delle memorie. Tali risultati sono stati oggetto di un brevetto (WO2006105998).

Il CNF1 può essere pertanto considerato un agente farmacologico con proprietà di stimolazione a lungo termine dell'apprendimento. Farmaci di questo tipo potrebbero essere potenzialmente impiegati non solo per migliorare l'apprendimento in pazienti sani, ma anche per correggere alterazioni della connettività della rete neurale in patologie caratterizzate da deterioramento delle facoltà cognitive, quali le diverse forme di ritardo mentale e la malattia di Alzheimer.

Dolore infiammatorio

Molto recentemente, abbiamo riportato la capacità del CNF1 di contrastare il dolore di tipo infiammatorio indotto dalla formalina nel topo (24). La risposta analgesica dovuta al CNF1 richiede sia l'attivazione della Rac GTPasi, con conseguente rimodellamento dell'actina citoscheletrica cerebrale, sia l'up-regolazione dei recettori μ per gli oppioidi (MOR). Questi ultimi, sono ritenuti i recettori più importanti nel controllo della percezione del dolore. Tali risultati sono stati oggetto di un brevetto (WO2007017914). Il ruolo cruciale di Rac è dimostrato dalla mancanza di attività analgesica nei topi trattati con la molecola del ricombinante inattivo CNF1 C866S, mentre l'importanza dei MOR è supportata dall'incapacità del CNF1 di indurre un effetto analgesico nei topi MOR-*knockout*. Inoltre, va sottolineato che l'effetto analgesico nei topi si ha sia in seguito a somministrazione periferica che centrale del CNF1. Quindi, considerati nel loro insieme, i nostri risultati forniscono un nuovo contributo alla comprensione dei meccanismi intracellulari coinvolti nella modulazione del dolore e indicano il CNF1 come un nuovo mezzo nel campo del controllo del dolore. È auspicabile che questo possa aprire la via a nuove strategie terapeutiche.

Conclusioni

Sebbene le tossine batteriche siano estremamente dannose per l'organismo ospite nel corso di un'infezione, l'attività di molte di esse può essere sfruttata per scopi medici. Come sopra riportato, derivati di alcune tossine sono stati incorporate in vaccini umani a causa delle loro proprietà adiuvanti mentre altre tossine possono essere trasformate, mediante tecniche di ingegneria genetica, nella componente "killer" delle immunotossine. Alcuni di questi "proiettili molecolari" sono attualmente approvati per il trattamento di diverse forme di tumore. Inoltre, la ricerca sulle tossine ha portato all'impiego di tali proteine nel campo della cosmesi per la

riduzione delle rughe. In conclusione, la ricerca scientifica ha permesso di convertire queste pericolose molecole batteriche in farmaci potenti ed efficaci da impiegare per il trattamento di diverse patologie umane.

Bibliografia

1. Fabbri A, Travaglione S, Falzano L, Fiorentini C. Bacterial protein toxins: current and potential clinical use. *Curr Med Chem* 2008;15(11):1116-25.
2. De Rycke J, Milon A, Oswald E. Necrotic Escherichia coli (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Vet Res* 1999;30(2-3):221-33.
3. Landraud L, Gauthier M, Fosse T, Boquet P. Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol* 2000;30(3):213-6.
4. Elliott SJ, Srinivas S, Albert MJ, Alam K, Robins-Browne RM, Gunzburg ST, Mee BJ, Chang BJ. Characterization of the roles of hemolysin and other toxins in enteropathy caused by alpha-hemolytic Escherichia coli linked to human diarrhea. *Infect Immun* 1998;66(5):2040-61.
5. Okeke IN, Fayinka ST, Lamikanra A. Antibiotic resistance in Escherichia coli from Nigerian students, 1986-1998. *Emerg Infect Dis* 2000;6(4):393-6.
6. Paciorek, J. Virulence properties of Escherichia coli faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2002;51(7):548-56.
7. Kim KJ, Chung JW, Kim KS. 67-kDa laminin receptor promotes internalization of cytotoxic necrotizing factor 1-expressing Escherichia coli K1 into human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2005;280(2):1360-8.
8. Contamin S, Galmiche A, Doye A, Flatau G, Benmerah A, Boquet P. The p21 Rho-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 is endocytosed by a clathrin-independent mechanism and enters the cytosol by an acidic-dependent membrane translocation step. *Mol Biol Cell* 2000;11(5):1775-87.
9. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420(6913):629-35.
10. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature* 1997;387(6634):729-33.
11. Schmidt G, Sher P, Wilm M, Selzer J, Mann M, Aktories K. Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. *Nature* 1997;387(6634):725-9.
12. Lerm M, Selzer J, Hoffmeyer A, Rapp UR, Aktories K, Schmidt G. Deamidation of Cdc42 and Rac by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: activation of the C-Jun N-terminal kinase in HeLa cells. *Infect Immun* 1999;67(2):496-503.
13. Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clément R, Buisson-Touati C, Flatau G, Gagnoux L, Piechaczyk M, Boquet P, Lemichez E. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 2002;111(4):553-64.
14. Travaglione S, Messina G, Fabbri A, Falzano L, Giammarioli AM, Grossi M, Rufini S, Fiorentini C. Cytotoxic necrotizing factor 1 hinders skeletal muscle differentiation in vitro by perturbing the activation/deactivation balance of Rho GTPases. *Cell Death Differ* 2005;12(1):78-86.
15. Boyer L, Travaglione S, Falzano L, Gauthier NC, Popoff MR, Lemichez E, Fiorentini C, Fabbri A. Rac GTPase instructs Nuclear Factor- κ B activating by conveying the SCF complex and I κ B- α to the ruffling membranes. *Mol Biol Cell* 2004;15(3):1124-33.
16. Falzano L, Filippini P, Travaglione S, Miraglia AG, Fabbri A, Fiorentini C. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G2/M transition in uroepithelial cells. *Infect Immun* 2006;74(7):3765-72.

17. Fiorentini C, Falzano L, Fabbri A, Stringaro A, Logozzi M, Travaglione S, Contamin S, Arancia G, Malorni W, Fais S. Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2001;12(7):2061-73.
18. Giamboi Miraglia A, Travaglione S, Meschini S, Falzano L, Matarrese P, Quaranta MG, Viora M, Fiorentini C, Fabbri A. Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway:role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol Biol Cell* 2007;18(7):2735-44.
19. Falzano L, Quaranta MG, Travaglione S, Filippini P, Fabbri A, Viora M, Donelli G, Fiorentini C. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect Immun* 2003;71 (7):4178-81.
20. Munro P, Flatau G, Doye A, Boyer L, Oregioni O, Mege JL, Landraud L, Lemichez E. Activation and proteasomal degradation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor-1 elicit a controlled inflammatory response. *J Biol Chem* 2004;279 (34):35849-57.
21. Munro P, Flatau G, Anjuère F, Hofman V, Czerkinsky C, Lemichez E. The Rho GTPase activators CNF1 and DNT bacterial toxins have mucosal adjuvant properties. *Vaccine* 2005;23(20):2551-6.
22. Diana G, Valentini G, Travaglione S, Falzano L, Pieri M, Zona C, Meschini S, Fabbri A, Fiorentini C. Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(2):636-41.
23. Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 2009;29(25):8206-14.
24. Pavone F, Luvisetto S, Marinelli S, Straface E, Fabbri A, Falzano L, Fiorentini C, Malorni W. The Rac GTPase-activating bacterial protein toxin CNF1 induces analgesia up-regulating mu-opioid receptors. *Pain* 2009;145(1-2):219-29.

PRODOTTI NATURALI AD ATTIVITÀ ANALGESICHE E ANTINFIAMMATORIE

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

Introduzione

La fitomedicina è la più antica forma di trattamento terapeutico basato sull'utilizzo di piante, ancora oggi ampiamente diffusa. Come in passato, anche oggi c'è un grande interesse intorno alla possibilità di identificare prodotti naturali farmacologicamente attivi, siano essi derivanti da piante, da microorganismi o da animali, terrestri o marini, potenzialmente utilizzabili come farmaci innovativi. Questo si riflette anche nel crescente numero di prodotti naturali e di farmaci ispirati a prodotti naturali che vengono approvati e immessi nel mercato farmaceutico (1).

Riportiamo di seguito alcuni dei più importanti prodotti naturali utilizzati come farmaci efficaci nel trattamento di sindromi algiche acute e croniche. Inoltre vengono riportati i risultati di un nostro studio sull'attività farmacologica del diglucoside ipoxoside, purificato dalla radice della pianta *Hypoxis hemerocallidea*. Infine, vengono riportati i risultati da noi condotti su un diterpene isolato dalle parti aeree di *Salvia cinnabarina* e denominato CMP1, potenzialmente efficace nel trattamento dell'ansia.

Prodotti naturali e trattamento del dolore

L'*International Association for the Study of Pain* (IASP) definisce il dolore come una spiacevole esperienza sensoriale ed emotiva associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di tale danno. Esso viene generalmente classificato come dolore acuto o cronico. Il dolore acuto si manifesta come la risposta fisiologica dell'organismo ad uno stimolo nocivo e normalmente scompare con la scomparsa dello stimolo stesso. Il dolore cronico invece insorge in seguito a danni persistenti o permanenti o in seguito a gravi malattie (diabete, cancro, neuropatie). Esso consiste in una persistente percezione di malessere dell'individuo, sino a produrre profonde modificazioni della personalità e dello stile di vita.

Molti dei farmaci più efficaci nel trattamento delle sindromi algiche sono di origine naturale. Gli oppiacei (morfina, codeina, tebaina), estratti dal *Papaver somniferum*, insieme ai loro derivati semi-sintetici (idromorfone, ossicodone, eroina, ecc.) e sintetici (fentanil, metadone, meperidina, tramadol e gli antagonisti naloxone, nalmefene e naltrexone), rappresentano la più utilizzata e la più antica classe di farmaci analgesici utilizzati dall'uomo. Gli oppioidi vengono utilizzati da molto tempo nel trattamento del dolore acuto (come il dolore post operatorio) e anche nelle cure palliative per alleviare il dolore cronico nei malati terminali di cancro o in condizioni degenerative come l'artrite reumatoide. Gli oppioidi (con questo termine si intendono sia molecole endogene quali encefaline, endorfine, dinorfine, che i composti esogeni, naturali e sintetici) svolgono la loro azione analgesica mediante l'attivazione di recettori accoppiati a proteine G, designati come MOP (mu oppioidi), DOP (delta oppioidi), KOP (kappa oppioidi) e NOP (N/OFQ), presenti nelle aree nervose deputate al controllo della percezione dolorosa (2).

Un altro composto il cui impiego antalgico è ampiamente diffuso è senz'altro l'aspirina. L'aspirina, derivata dall'acido salicilico estratto dalla corteccia di *Salix alba*, rappresenta il primo farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS) ad essere stato impiegato nel trattamento di forme lievi di dolore a base infiammatoria, grazie alla sua azione di inibizione dell'enzima cicloossigenasi e quindi della sintesi di eicosanoidi (3).

Un altro sistema coinvolto nei processi nocicettivi è rappresentato dai recettori dei cannabinoidi (4), attivati da composti naturali quali il D9-tetraidrocannabinolo (D9-THC) e il cannabidiolo, estratti dalla pianta *Cannabis sativa*. Sebbene efficaci nel trattamento del dolore, i derivati di *Cannabis* esercitano effetti psicoattivi mediante l'attivazione del recettore CB₁, abbondantemente presente nell'encefalo. Attualmente D9-THC è commercializzato in combinazione con il cannabidiolo sotto forma di spray orale (Sativex™) per i malati di sclerosi multipla e per alleviare il dolore neuropatico. Il corrispettivo farmaco sintetico dronabinolo, privo di effetti collaterali narcotizzanti o di dipendenza, è commercializzato con il nome di Marinol™ per il trattamento dell'anoressia o come antiemetico per i pazienti sottoposti a chemioterapia.

I capsaicinoidi comprendono una serie di molecole naturali in grado di attivare il recettore TRPV1 (*transient receptor potential cation channel vanilloid 1*), implicato nella percezione nocicettiva periferica (5). Tra i ligandi di TRPV1 più potenti ritroviamo la capsaicina (estratta da molte specie di *Capsicum*), la resiniferatossina (estratta da *Euphorbia resinifera*), lo scutigeral (isolato dal fungo *Albatrellus ovinus*).

Da ultimo, ma non da meno importante, citiamo lo ziconotide, ossia la forma sintetica della ω-conotossina MVIIA isolata dal veleno del mollusco marino *Conus magus*. Lo ziconotide, che agisce bloccando potentemente i recettori del calcio voltaggio-dipendenti di tipo N espressi sui neuroni delle corna dorsali del midollo spinale e sulle afferenze primarie periferiche, è stato approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*, organo competente negli Stati Uniti al rilascio delle autorizzazioni in commercio di nuovi farmaci) nella formulazione farmaceutica denominata Prialt™ per il trattamento del dolore severo cronico (6).

Benché queste molecole siano estremamente efficaci nel trattamento del dolore, il loro utilizzo è, in molti casi, condizionato dall'insorgenza, nei pazienti, di effetti avversi talora gravi. Per questa ragione, molti sforzi vengono compiuti dalla comunità scientifica allo scopo di identificare composti che abbiano un'elevata attività analgesica ed effetti collaterali trascurabili.

Due esempi di potenziale applicazione terapeutica dalle piante del genere *Hypoxis* e *Salvia*

Hypoxis hemerocallidea è una pianta diffusa nell'Africa del Sud ampiamente utilizzata nella medicina popolare. Tradizionalmente la radice di questa pianta, denominata anche patata africana, è impiegata sotto forma di decotti per il trattamento di numerose malattie quali infezioni urinarie, ipertensione, emicrania, parassitosi intestinali, ipertrofia prostatica, AIDS. Da essa è stato isolato un pro-farmaco inattivo denominato ipoxoside che, una volta ingerito, viene metabolizzato in un composto biologicamente attivo, il rooperolo. Questo diglucoside produce effetti antiossidanti, antineoplastici, battericidi e inibitori di alcune isoforme di enzimi appartenenti al complesso del citocromo P450 (7).

Esperimenti *in vivo* condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'ipoxoside produce effetti antinocicettivi al test della formalina ed effetti antinfiammatori in un modello di edema nella zampa del topo (8). Nel test della formalina, l'iniezione di una soluzione all'1% di formalina nel sottocute dorsale (sc.) della zampa posteriore del topo (20 µL/zampa) evoca una

risposta comportamentale nocifensiva espressa come leccamento e morsicamento da parte dell'animale della zampa trattata. Tale risposta presenta un tipico andamento bifasico, con una fase acuta (0-10 min) dovuta alla diretta stimolazione delle fibre nocicettive periferiche e una fase ritardata (10-40 min) dovuta all'insorgenza di dolore infiammatorio. La somministrazione intraperitoneale (ip.) di ipoxoside (1 mg/kg, 1 h prima della formalina), non altera la risposta allo stimolo nocicettivo, mentre ipoxoside alle dosi di 10 e 20 mg/kg (1 h prima), riduce l'attività di leccamento nella fase tardiva del test. Diversamente, ipoxoside (1-20 mg/kg, ip.) non altera la soglia nocicettiva agli stimoli termici al test della piastra calda. In un modello animale di infiammazione, la somministrazione di zymosan (1% w/v) nel sottocute dorsale della zampa posteriore del topo (50 µL/zampa) produce un aumento tempo-dipendente del volume della zampa, corrispondente allo sviluppo locale di edema. Ipoxoside, somministrato sc. alle dosi di 1, 10, 20 µg/zampa, 30 min prima di zymosan, produce una riduzione dose-dipendente dell'edema, con un picco dopo 2-3 h dall'iniezione di zymosan.

Questi risultati sembrano indicare che gli effetti analgesici prodotti da ipoxoside possano dipendere dall'attivazione di meccanismi antinfiammatori. Studi successivi condotti da altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che l'estratto acquoso della radice di *Hypoxis* induce aumento della soglia nocicettiva a stimoli nocicettivi termici e chimici quando somministrato per via intratecale nel topo e riduzione dell'infiammazione prodotta dalla somministrazione di albumina nella zampa posteriore di ratto, quando somministrato per via orale (9). È stato inoltre dimostrato che ipoxoside produce effetti ipoglicemizzanti in un modello di diabete mellito indotto dall'iniezione ip. di streptozotocina nel ratto (10). Gli effetti antinfiammatori e antidiabetici prodotti da ipoxoside sono mediati dall'inibizione della sintesi, produzione e/o rilascio di mediatori pro-infiammatori, quali le prostaglandine. È stato infatti dimostrato che proteine simil-lectina purificate dall'estratto acquoso della patata africana sono in grado di inibire l'enzima cicloossigenasi (COX) *in vitro* e che l'estratto etanologico produce effetti inibitori su COX-1 maggiori di quelli prodotti dall'estratto acquoso (11).

Salvia cinnabarina

Diverse specie appartenenti al genere *Salvia* (Famiglia *Lamiaceae*) contengono sostanze che presentano effetti farmacologici sistemici e/o centrali, quali flavonoidi, olii essenziali, diterpeni, triterpeni, polifenoli (12). Salvinorina A (isolata da *S. divinorum*), miltirone, tanshinone IIA e IIB, carnosolo e acido carnosico (da *S. officinalis*) sono alcuni esempi di diterpeni con proprietà allucinogene, neuroprotettive, sedative e ipnotiche.

Durante uno screening di composti farmacologicamente attivi dalle piante del genere *Salvia*, è stato riportato come l'estratto etanologico grezzo, ottenuto dalle parti aeree della pianta *Salvia cinnabarina* M. Martens et Galeotti, possieda attività antispasmodica *in vitro*. Tale effetto era prodotto da un nuovo diterpenoide isolato dall'estratto crudo, l'acido 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-triene-3-ico, denominato CMP1 (13, 14). Studi successivi hanno dimostrato che CMP1 è in grado di ridurre la motilità intestinale del topo *in vivo* (15), di ridurre la contrattilità della vescica di ratto *in vitro* con un meccanismo che coinvolge i canali del calcio (16) e di produrre una lieve attività ipotensiva nel ratto (17). In un recente studio abbiamo dimostrato che CMP1 possiede interessanti proprietà centrali nel topo, quali effetti sedativi e ansiolitici (18). In questo studio, sia CMP1 (10 mg/kg, ip.) che diazepam (2 mg/kg, ip.) aumentano il tempo speso nelle braccia aperte e il numero di ingressi nelle braccia aperte nel test del labirinto sopraelevato. Il diazepam, alla dose di 1 mg/kg ip., aumenta il numero di ingressi nelle braccia aperte, mentre CPM1, alla dose più bassa di 1 mg/kg non produce alcun effetto. CMP1 e diazepam potenziano inoltre il sonno indotto dalla somministrazione ip. di pentobarbital (50

mg/kg). Infatti, CMP1 (10 mg/kg, ip.) aumenta significativamente il tempo di sonno indotto da pentobarbital ($218,8 \pm 25,5\%$, t-test: $t_{18} = 3,968$, $p < 0,001$, $N = 10$). In maniera simile, diazepam (2 mg/kg, ip.) aumenta il tempo di sonno indotto dal barbiturico ($164,4 \pm 20,9\%$, t-test: $t_{26} = 3,968$, $p < 0,01$, $N = 15$). Al contrario, CMP1 non altera la soglia nocicettiva a stimoli termici nocivi nei test della piastra calda e dello scatto di coda. Infine, CMP1 non presenta attività antidepressiva, poiché inefficace nel test del nuoto forzato.

In conclusione, le nostre osservazioni permettono di delineare ulteriormente il profilo farmacologico dei diterpenoidi e suggeriscono che CMP1 possa rappresentare un composto di partenza per lo sviluppo di una nuova classe di ansiolitici.

Bibliografia

1. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:206-20.
2. Satoh M & Minami M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther* 1995;68:343-64.
3. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971;231:232-35.
4. Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinology Lett* 2004;25:14-23.
5. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-24.
6. Miljanich GP. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem* 2004;11:3029-40.
7. Drewes SE, Elliot E, Khan F, Dhlamini JTB, Gcumisa MSS. *Hypoxis hemerocallidea*-not merely a cure for benign prostate hyperplasia. *J Ethnopharmacol* 2008;119:593-8.
8. Nicoletti M, Pieretti S, Capasso A, Galeffi C. Analgesic effects induced by hypoxoside, a norlignan glucoside from *Hypoxis* spp. *Phytother Res* 1996;10:398-401.
9. Ojewole JAO. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Hypoxis hemerocallidea* Fisch. & C.A. Mey (Hypoxidaceae) corm 'African Potato' aqueous extracts in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2006;103:26-134.
10. Mahomed IM, Ojewole JAO. Hypoglycemic effect of *H. hemerocallidea* corm (African potato) aqueous extracts rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:617-23.
11. Gaidamashvili M, van Staden J. Prostaglandin inhibitory activity by lectin-like proteins from South African plants. *S Afr J Bot* 2006;71:661-3.
12. Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytother Res* 2006;20:427-37.
13. Romussi G, Ciarallo G, Bisio A, Fontana N, De Simone F, De Tommasi N, Mascolo N, Pinto L. A new diterpenoid with antispasmodic activity from *Salvia cinnabarina*. *Planta Medica* 2001;67:153-5.
14. Bisio A, Pagano B, Romussi A, Bruno O, De Tommasi N, Romussi G, Mattia CA. Relative stereochemistry of a diterpene from *Salvia cinnabarina*. *Molecules* 2007;12:2279-87.
15. Capasso R, Izzo AA, Capasso F, Romussi G, Bisio A, Mascolo N. A diterpenoid from *Salvia cinnabarina* inhibits mouse intestinal motility in vivo. *Planta Medica* 2004;70:375-7.
16. Capasso R, Izzo AA, Romussi G, Capasso F, De Tommasi N, Bisio A, Mascolo N. A secoisopimarane diterpenoid from *Salvia cinnabarina* inhibits rat urinary bladder contractility in vitro. *Planta Medica* 2004;70:185-8.

17. Alfieri A, Maione F, Bisio A, Romussi G, Mascolo N, Cicala C. Effect of a diterpenoid from *Salvia cinnabarina* on arterial blood pressure in rats. *Phytother Res* 2007;21:690-2.
18. Maione F, Bonito MC, Colucci M, Cozzolino V, Bisio A, Romussi G, Cicala C, Pieretti S, Mascolo N. First evidence for an anxiolytic effect of a diterpenoid from *Salvia cinnabarina*. *Nat Prod Comm* 2009;4:469-72.

ATTIVITÀ MODULATORIA DEL FLAVONOIDE NATURALE QUERCETINA SULLA FUNZIONE DI BASOFILI UMANI *IN VITRO*

Salvatore Chirumbolo (a), Anita Conforti (b), Antonio Vella (c), Riccardo Ortolani (c), Paolo Bellavite (a)
(a) Dipartimento di Patologia e Diagnostica, Ospedale Policlinico GB Rossi, Azienda Ospedaliera, Verona
(b) Dipartimento di Sanità Pubblica-Sezione di Farmacologia, Ospedale Policlinico GB Rossi, Azienda Ospedaliera, Verona
(c) Servizio di Immunopatologia, Ospedale Policlinico GB Rossi, Azienda Ospedaliera, Verona

Introduzione

I flavonoidi naturali comprendono un vasto gruppo di metaboliti polifenolici che sono largamente diffusi in tutti i derivati delle piante costituendo in tal modo un componente fondamentale della nutrizione quotidiana. Questi composti organici hanno di recente suscitato un notevole interesse per il loro ruolo come sostanze anti-ossidanti, anti-infiammatorie, anti-angiogeniche, analgesiche ed epatoprotettive, citostatiche, apoptotiche, estrogeniche e anche anti-allergiche (1). Fino ad oggi sono state identificati oltre 8000 metaboliti secondari dei vegetali classificabili come flavonoidi che in natura sono presenti come agliconi, glicosidi o derivati metilati. Da un punto di vista chimico questi idrocarburi aromatici derivano dalla sostituzione di due scheletri carboniosi eterociclici, il cromano o il flavano, dando origine a otto famiglie diverse: flavani, flavanoni e flavonoli, isoflavanoni, flavoni, isoflavoni, antocianidine, calconi e flavonolignani. Tra questi composti probabilmente il più noto e diffuso è la quercetina. La quercetina è la forma agliconica ben nota di un vasto numero di glicosidi flavonoidi come la rutina e la quercetina; è un composto naturale, classificato come IARC gruppo 3, quindi non cancerogeno, che appartiene, come il kemferolo, al sottogruppo dei flavonoli. La quercetina è diffusa in vegetali quali la cipolla rossa, i broccoli, il sedano, i capperi, le mele, le more e i mirtilli nei quali è presente in forma agliconica o come coniugato glicosidico.

Una vasta letteratura riguardante le proprietà farmacologiche della quercetina le attribuisce proprietà anti-ossidanti e di *scavenging* dei radicali liberi, anti-infiammatoria, modulatrice dell'attività di alcuni enzimi e dell'espressione genica (in particolare delle citochine) e anti-allergica. L'attività anti-allergica della quercetina è stata studiata sia su modelli cellulari che su modelli animali (1). L'efficacia clinica della quercetina è stata mostrata in alcuni modelli epidemiologici sulla prevenzione dell'asma e nelle dermatiti atopiche; malgrado questo flavonolo costituisca il principale flavonoide introdotto con la dieta nei paesi industrializzati, con un'assunzione media che va dagli 0,1 ai 5,9 mg/die, alcuni problemi circa l'efficacia delle forme glicosidiche rispetto a quelle agliconiche e circa i dati reali di biodisponibilità lasciano ancora aperto il campo di indagine sul reale ruolo anti-allergico della quercetina. C'è da dire, tuttavia, che l'azione della quercetina sulle cellule implicate nelle reazioni di ipersensibilità, come mastociti e basofili, non è stata ancora chiarita neanche dagli studi *in vitro*. Le recenti evidenze che mostrano come il basofilo costituisca una cellula chiave nella promozione dell'infiammazione allergica cronica, dell'anafilassi e nel ruolo delicato della B-memory e del rapporto tra immunità innata e acquisita, suggeriscono che un modello sperimentale interessante è proprio lo studio dell'effetto dei flavonoidi su questi granulociti. In realtà, i modelli cellulari si sono limitati a pochi studi riguardo la funzione dei basofili (2, 3) e usando criteri metodologici

oggi ampiamente superati. In questo studio è stato valutato l'effetto della quercetina sull'attivazione di basofili umani attraverso una recente metodica citometrica.

Metodi

Lo studio è stato eseguito allo scopo di chiarire quale fosse l'effetto della quercetina pura sull'espressione di alcune molecole di membrana del basofilo, la tetraspanina CD63 ed l'ectoenzima CD203c, che vengono up-regolate successivamente ad un'attivazione infiammatoria o allergica della cellula. L'espressione di queste molecole è molto studiata nella letteratura del settore, soprattutto nel contesto diagnostico (4), e quindi rappresenta un ottimo modello sperimentale per comprendere l'azione anti-allergica *in vitro* di una sostanza come la quercetina. Leucociti umani da *pool* di minimo 4 *buffy coat* per esperimento (totale 30 soggetti) isolati da sangue venoso in K2-EDTA di donatori sani e risospesi in tampone HEPES, sono stati trattati a 37°C per 10 min con dosi di quercetina da 10 ng/mL a 10 µg/mL (range 0,03-33 µM) e attivati con 4 µg/mL di anti-IgE (protocollo 1) o 100 nmol/L formil peptidi (protocollo 2) per ulteriori 30 min a 37°C. Le cellule sono state perciò sottoposte a due tipologie di attivazione: con un peptide chemiotattico di derivazione batterica, il formil-Met-Leu-Phe (fMLP) o con un anticorpo monoclonale anti-IgE. Le due vie di attivazione, correlate in letteratura con i termini *piecemeal degranulation* (PMD) e *anaphylactic degranulation* (AND) possono in termini più semplici essere indicate come due modelli esemplificativi di due tipologie di attivazione dei basofili, quella infiammatoria (detta anche non-immunologica) e quella allergica (detta da alcuni autori immunologica). Successivamente i basofili sono stati catturati in citometria a flusso con *gating CD123 bright/HLADRnon 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 (5).

Risultati

Nel modello allergico o immunologico con anti-IgE, valutando l'MFI dei marcatori di attivazione, la quercetina si mostra un ottimo inibitore alle dosi già verificate da altri autori studiando il rilascio di istamina cioè intorno ai 5-50 µmol/L (2): il flavonoide inibisce del 95% (95,04 ±0,63) e dell'85% (85,47% ±3,80) l'espressione rispettivamente del CD63 e del CD203c già alla dose di 1 µg/mL (3 µM) e l'effetto inibitorio, anche se molto meno marcato, si verifica anche nel modello non immunologico con fMLP (Figura 1). Il protocollo che valuta l'effetto inibitorio della quercetina, misurando l'espressione dei marcatori di membrana, mostra una maggiore sensibilità rispetto ad altri test di attivazione poiché è capace di indicare un effetto inibitorio del bioflavonoide anche a 10 ng/mL (0,03 nM) con inibizioni del 26,41% e del 14,91% rispettivamente sul CD63 e sul CD203c (Figura 1). La curva dose-risposta della percentuale di cellule CD63 *express* conferma i dati del CD63 MFI. Sul modello infiammatorio non immunologico la quercetina esibisce un comportamento modulatore e di tipo ormetico: mentre alle dosi di 1-10 µg/mL inibisce l'attivazione cellulare, alle dosi più basse la quercetina stimola l'attivazione attraverso un meccanismo di *priming* dell'espressione delle molecole CD63 e CD203c (Figura 1).

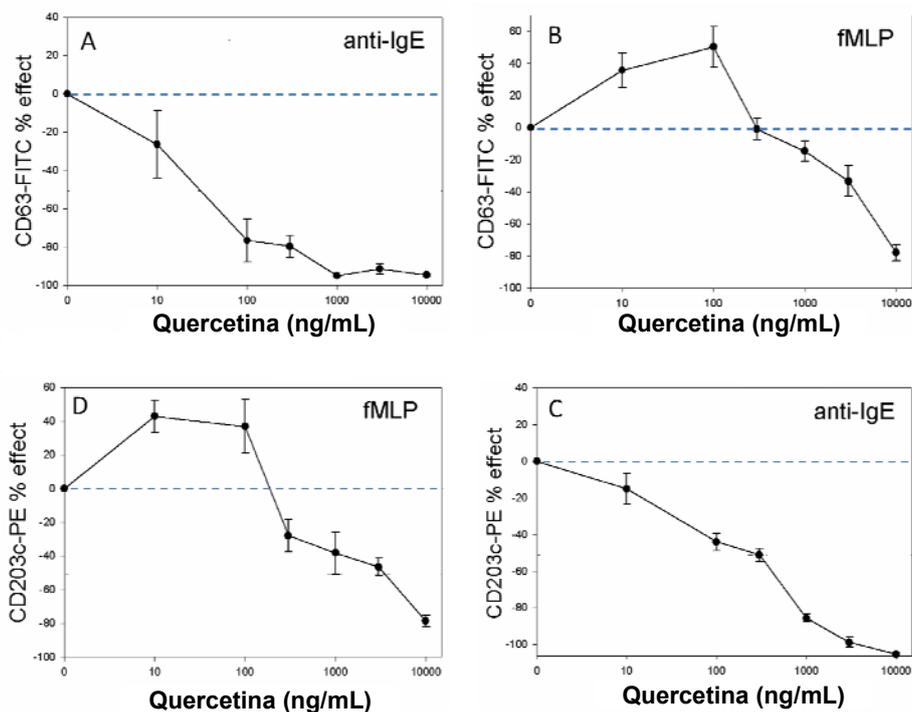


Figura 1. Dose-response di diverse concentrazioni di quercetina espressa come % di effetto sulla espressione dei marcatori CD63 (A e B) e CD203c (C e D) nei due diversi protocolli sperimentali (medie \pm SEM). A e C: effetto su cellule stimulate con anti-IgE (modello “allergico” o “anafilattico”), B e D: effetto su cellule stimulate con fMLP (modello “batterico” o “piecemeal”)

Discussione

La comprensione dei meccanismi con cui la quercetina svolge un ruolo inibitorio nell’attivazione dei basofili mediata da allergeni mentre funziona da *primer* dell’attivazione mediata da infiammazione batterica è ancora oggetto di studio; finora in letteratura non sono state pubblicate evidenze simili. Una ipotesi di lavoro potrebbe essere suggerita dai diversi meccanismi di trasduzione intracellulare del segnale e dalle evidenze recenti circa il ruolo che la quercetina svolge su alcune chinasi e proteasi cellulari come le MAP chinasi (6), la PKC (7) e PI3K (8). Recenti dati del nostro laboratorio confermano che gli effetti della quercetina qui descritti potrebbero essere legati al suo target biologico PI3K (9). Il dato che emerge da questi studi è che la quercetina inibisce l’attivazione allergene-mediata dei basofili a dosi molto basse, sensibilmente inferiori a quelle della letteratura, mentre alle stesse dosi esercita una funzione priming sulla risposta infiammatoria naturale, come può essere quella mediata da un peptide chemiotattico batterico. Non si sa ancora quale sia il ruolo funzionale di questi fenomeni evidenziati sul modello di laboratorio ma, visto che si tratta di effetti di dosi molto basse, è probabile che è probabile che siano sfruttabili anche nella modulazione nutraceutica dell’infiammazione e dell’immunità. In ogni caso, i fenomeni descritti sono di interesse notevole alla luce del rivalutato ruolo dei meccanismi di ormesi in medicina e del loro ruolo nell’azione bifasica dei medicinali naturali e omeopatici (10).

Conclusioni

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.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato eseguito nell'ambito di un accordo di collaborazione scientifica tra Università degli Studi di Verona e Laboratoires Boiron, s.r.l.-Milan-Lyon.

Bibliografia

1. Kawai M, Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Maruta M, Kuwahara Y, Ohkawara T, Hagihara K, Yamadori T, Shima Y, Ogata A, Kawase I, Tanaka T. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol Int* 2007;56:113-23.
2. Middleton E Jr, Drzewiecki G, Krishnarao D. Quercetin: an inhibitor of antigen-induced human basophil histamine release. *J Immunol* 1981;127:546-50.
3. Middleton E Jr, Drzewiecki G. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem Pharmacol* 1984; 33:3333-8.
4. de Weck AL, Sanz ML, Gamboa PM, Aberer W, Bienvenu J, Blanca M, Demoly P, Ebo D G, Mayorga L, Monneret G, Sainte-Laudy J. Diagnostic tests based on human basophils: more potentials and perspectives than pitfalls. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;146:177-89.
5. Chirumbolo S, Vella A, Ortolani R, De GM, Solero P, Tridente G, Bellavite P. Differential response of human basophil activation markers: a multi-parameter flow cytometry approach. *Clin Mol Allergy* 2008;6:12.
6. Ying B, Yang T, Song X, Hu X, Fan H, Lu X, Chen L, Cheng D, Wang T, Liu D, Xu D, Wei Y, Wen F. Quercetin inhibits IL-1 beta-induced ICAM-1 expression in pulmonary epithelial cell line A549 through the MAPK pathways. *Mol Biol Rep* 2008; 36(7):1825-32
7. Romero M, Jimenez R, Sanchez M, Lopez-Sepulveda R, Zarzuelo MJ, O'Valle F, Zarzuelo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J. Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis* 2009;202:58-67.
8. Gulati N, Laudet B, Zohrabian VM, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. *Anticancer Res* 2006;26:1177-81.
9. Chirumbolo S, Marzotto M, Conforti A, Vella A, Ortolani R, Bellavite P. Bimodal action of the flavonoid quercetin on basophil function: an investigation of the putative biochemical targets. *Clin Mol Allergy*. 2010 Sep 17;8:13.
10. Bellavite P, Chirumbolo S, Marzotto M. Hormesis and its relationship with homeopathy. *Hum Exp Toxicol*. 2010;29(7):573-9.

ATTIVITÀ IMMUNOMODULATORIA DELLA VITAMINA D3 IN CELLULE DENDRITICHE UMANE

Maria Cristina Gauzzi, Cristina Purificato, Isabella Sanseverino, Manuela Del Cornò, Filippo Belardelli, Sandra Gessani

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

Le cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DCs) sono “cellule presentanti l’antigene professioniste”, che svolgono un ruolo fondamentale nell’induzione e nella modulazione della risposta mediata dalle cellule T, indirizzandola verso l’immunità o la tolleranza immunologica. Sono localizzate in diversi tessuti nell’organismo, sia linfoidi che non linfoidi, e si muovono continuamente tra questi due compartimenti: le DC residenti nei tessuti periferici, come la pelle o le mucose, svolgono una funzione “sentinella”, e campionano l’ambiente circostante internalizzando e processando gli antigeni (Ag) presenti nel tessuto. A tale scopo, le DC sono dotate di un gran numero di recettori di superficie e intracellulari che riconoscono pattern molecolari associati a patogeni, tra i quali i *Toll-like receptors* (TLRs), che, se ingaggiati, innescano un complesso processo di attivazione, anche noto come “maturazione”. La capacità di captazione/internalizzazione dell’Ag diminuisce, mentre aumentano i complessi peptide/MHC esposti alla superficie, in concomitanza con un aumento dell’espressione di molecole co-stimolatorie e con l’espressione di diverse citochine e chemochine. Le DC acquisiscono anche la capacità di migrare nei linfonodi drenanti dove interagiscono con le cellule T *naïve*, stimolandole a differenziare in cellule T effettrici. La combinazione quali- e quantitativa dei tre segnali, complesso MHC-peptide, molecole co-stimolatorie/co-inibitorie, e citochine/chemochine prodotte, definirà il tipo di risposta innescata dalle DC. In particolare, i linfociti CD4+ T *helper* (Th) possono essere indirizzati a differenziare in cellule Th1, Th2 o Th17, esprimenti differenti profili di citochine, appropriati per eliminare diversi tipi di patogeni. Difetti nella regolazione del differenziamento e/o espansione di queste cellule sono anche stati associati allo sviluppo di patologie immunomediate. In particolare, la risposta Th17 svolge un ruolo importante nel promuovere malattie autoimmuni, mentre un’eccessiva risposta Th2 è coinvolta nello sviluppo di allergie. Anche cellule esprimenti solo Ag *self* possono raggiungere i linfonodi. Questa migrazione spontanea contribuisce all’instaurarsi della tolleranza periferica, e un fallimento delle DC nel mantenere questa tolleranza può essere alla base di malattie autoimmuni e/o infiammatorie (1, 2).

La vitamina D3: un ormone pleiotropico dotato di una potente attività immunomodulatoria

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. Gli effetti biologici di 1,25(OH)₂D₃ sono

mediati da un recettore, VDR, appartenente alla superfamiglia dei recettori degli ormoni nucleari, che lega specifiche sequenze di DNA nei geni bersaglio, e può funzionare sia da attivatore che da repressore trascrizionale (3, 4).

Diverse cellule del sistema immunitario, inclusi monociti, macrofagi, cellule dendritiche, e linfociti B e T, esprimono VDR e sono dunque bersagli di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e dei suoi agonisti. L'attività immunomodulatoria di queste molecole è attualmente oggetto di un'intensa attività di ricerca, anche in considerazione del loro potenziale utilizzo clinico nel trattamento malattie autoimmuni. Infatti studi in modelli animali hanno dimostrato che agonisti del VDR sono efficaci nel prevenire e curare diverse malattie autoimmuni, e nel prolungare la sopravvivenza di trapianti. Queste molecole sono effettivamente entrate nella pratica clinica per il trattamento di malattie autoimmunitarie, come la psoriasi e l'iperparatiroidismo, e il loro potenziale terapeutico è in rapida espansione (5). Il ruolo fisiologico dell'attività immunomodulatoria della vitamina D3 è confermato da studi epidemiologici che hanno messo in luce un'associazione tra insufficienza e/o deficienza di vitamina D3 e suscettibilità a numerose malattie, inclusi alcuni tipi di cancro e patologie infiammatorie e/o immunomediatae.

Le DC come bersagli cellulari della vitamina D3: interferenze e sinergie con l'IFN di tipo I

Le DC del *lineage* mieloidi sono ormai riconosciute come uno tra i più importanti bersagli cellulari dell' $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nel sistema immunitario. Le DC mieloidi esprimono il recettore VDR, e diversi studi hanno dimostrato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e i suoi analoghi modificano profondamente sia il differenziamento che l'attivazione delle DC, indirizzandole verso l'induzione di tolleranza. Infatti $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inibisce la produzione di IL-12 e IL-23 e l'espressione di molecole costimolatorie delle DC, mentre aumenta la loro capacità di produrre IL-10. Questi effetti sono almeno in parte responsabili dell'induzione di cellule T $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ con attività soppressoria/regolatoria, a scapito dell'induzione di cellule Th1 e Th17, mentre la risposta Th2 appare leggermente aumentata o non influenzata, a seconda del contesto sperimentale analizzato (6).

Le DC e i loro precursori sono anche bersagli chiave dell'attività immunomodulatoria degli interferoni (IFN) di tipo I, una famiglia di citochine espresse spontaneamente a bassi livelli in condizioni fisiologiche, la cui produzione è fortemente aumentata in seguito ad esposizione della cellula a virus o altri stimoli. Sebbene inizialmente caratterizzati come potenti molecole antivirali, gli IFN di tipo I sono anche dotati di attività immunomodulatoria e svolgono un ruolo importante nel collegare la risposta immunitaria innata con quella acquisita (7), in parte anche grazie alla loro capacità di regolare il differenziamento, la maturazione e la sopravvivenza delle DC (8). In particolare, è stato dimostrato che il trattamento di monociti con l'IFN di tipo I, insieme con il GM-CSF aggiunto come fattore di sopravvivenza, risulta nella rapida generazione di DC (IFN-DC), fortemente immunostimolatorie (9). Le IFN-DC inducono infatti una risposta proliferativa di cellule T allogeneiche, e, in seguito a *priming* virale, anche di linfociti autologhi, e sono in grado di polarizzare la risposta T *helper* verso il tipo Th1, sia *in vitro* che *in vivo* nel modello hu-PBL-SCID. IFN-DC, pulstate con virus, sono inoltre potenti induttrici sia di una risposta umorale che di una risposta citotossica mediata dai linfociti T CD8 (8, 10).

Ci è sembrato quindi interessante studiare, in diversi modelli di DC, le possibili interferenze e/o sinergie tra l'attività tollerogena della vitamina D3, e quella immunostimolatoria dell'IFN di tipo I.

Abbiamo inizialmente investigato gli effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sul differenziamento dei monociti in DC indotto dall'IFN- β , e abbiamo osservato che $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ previene la generazione di IFN-DC

quando aggiunta a monociti subito dopo l'isolamento, ed è capace di "ridirigere" IFN-DC già differenziate verso uno stadio più immaturo, come dimostrato dal loro immunofenotipo, dalla loro ridotta capacità allostimolatoria, e da una diminuita capacità di produrre citochine responsabili della polarizzazione delle cellule T in cellule T *helper* 1. L'effetto soppressivo è associato ad una potente diminuzione della capacità migratoria delle IFN-DC in risposta sia a chemochine infiammatorie che a chemochine che mediano il loro reclutamento nei linfonodi (11). Questo studio ci ha permesso dunque di descrivere un nuovo meccanismo implicato nella modulazione delle attività funzionali delle DC da parte di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, – l'inibizione della loro attività chemiotattica – successivamente confermato *in vivo* nel modello murino (12), e in DC mieloidi circolanti (13). La capacità della vitamina D3 di interferire con il *trafficking* delle DC, può essere di beneficio in condizioni in cui un reclutamento eccessivo di DC attivate risulta deleterio, come ad esempio in patologie infiammatorie o immunomediate, e sarà quindi importante estendere questi studi a cellule isolate da pazienti affetti da queste malattie.

Oltre che rispondere alle chemochine, le DC sono anche importanti produttrici di queste molecole. Abbiamo quindi recentemente esteso i nostri studi alla capacità della vitamina D3 di modulare la produzione di chemochine, e in particolare di CCL2, in risposta a ligandi dei TLRs e/o all'IFN- β .

CCL2 è un potente fattore chemiotattico per i monociti, prodotto da diversi tipi di cellule, incluse le cellule endoteliali e i monociti in risposta a stimoli infiammatori, e recluta, oltre che i monociti/macrofagi, anche i basofili, le cellule T e NK. Sono state attribuite a questa chemochina numerose altre funzioni, oltre a quella squisitamente chemiotattica, tra cui la modulazione della risposta immunitaria, della crescita tumorale e dell'infezione da HIV. Elevati livelli di CCL2 sono stati inoltre riscontrati in alcune patologie autoimmuni. Sulla base di dati molto recenti, ottenuti dal nostro gruppo nell'ambito di uno studio focalizzato sulla risposta delle DC a diverse combinazioni di agonisti dei TLR, abbiamo proposto che la polarizzazione Th1 della risposta immune sia associata ad una diminuzione/soppressione della produzione di CCL2 (14).

Nell'ambito dei nostri studi sull'azione della $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, abbiamo osservato che il trattamento di DC con questo ormone induce una significativa produzione di CCL2, in assenza di altri stimoli. Questa produzione è fortemente aumentata se le DC vengono pretrattate con IFN- β , o se il trattamento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ è concomitante con il trattamento con pI:C, un ligando del TLR3, e uno dei principali induttori di IFN di tipo I (dati non pubblicati). Sulla base di questi risultati è possibile ipotizzare uno scenario in cui l'induzione di CCL2 contribuisca, almeno in parte, all'inibizione della risposta Th1 da parte della vitamina D3, e quindi alla sua attività antinfiammatoria. In questo scenario, la presenza di una sinergia tra l'IFN- β e la vitamina D3 riveste un particolare interesse non solo da un punto di vista dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della polarizzazione della risposta T *helper*, ma anche per il potenziale terapeutico di una eventuale associazione tra queste due molecole. L'IFN- β è infatti al momento una delle principali opzioni terapeutiche per la cura della sclerosi multipla (15), una malattia in cui l'infiammazione immuno-mediata nel sistema nervoso centrale ha un importante ruolo patogenetico, e numerose evidenze sperimentali, cliniche ed epidemiologiche suggeriscono un ruolo protettivo della vitamina D3 in questa malattia (16).

Bibliografia

1. Kadowaki N. Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergol Int* 2007;56(3):193-9.
2. Manuel SL, Rahman S, Wigdahl B, Khan ZK, Jain P. Dendritic cells in autoimmune diseases and neuroinflammatory disorders. *Front Biosci* 2007;12:4315-35.

3. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *Faseb J* 2001;15(14):2579-85. Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006;147(12):5542-8.
4. Cannell JJ, Hollis BW. Use of vitamin D in clinical practice. *Altern Med Rev* 2008;13(1):6-20.
5. Adorini L, Penna G. Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008;4(8):404-12.
6. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark Gr. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6(12):975-90.
7. Santini SM, Di Pucchio T, Lapenta C, Parlato S, Logozzi M, Belardelli F. A new type I IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells. *Stem Cells* 2003;21(3):357-62.
8. Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Parlato S, Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 2000;191(10):1777-88.
9. Lapenta C, Santini SM, Spada M, Donati S, Urbani F, Accapezzato D, Franceschini D, Andreotti M, Barnaba V, Belardelli F. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur J Immunol* 2006;36(8):2046-60.
10. Gauzzi MC, Purificato C, Donato K, Jin Y, Wang L, Daniel KC, Maghazachi AA, Belardelli F, Adorini L, Gessani S. Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol* 2005;174(1):270-6.
11. Enioutina EY, Bareyan D, Daynes RA. Vitamin D3-mediated alterations to myeloid dendritic cell trafficking in vivo expand the scope of their antigen presenting properties. *Vaccine* 2007;25(7):1236-49.
12. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N, Daniel KC, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2007;178(1):145-53.
13. Del Corno M, Michienzi A, Masotti A, Da Sacco L, Bottazzo GF, Belardelli F, Gessani S. CCL2 down-modulation by selected TLR agonist combinations contributes to Th1 polarization in human dendritic cells. *Blood* 2009;114(4):796-806.
14. Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Zivadinov R. Interferon-beta treatment for relapsing multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8(9):1435-47.
15. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol* 2008;194(1-2):7-17.

SESSIONE III

Sostanze naturali e attività antitumorale *in vitro*

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

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

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

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

Introduzione

Il resveratrolo (*trans*-3, 4', 5 -tri-idrossi-stilbene) è un composto fenolico oligomerico appartenente alla famiglia degli stilbeni. Esso è stato identificato in un centinaio di spermatofite, in particolare nella vite (di cui è un componente essenziale delle radici, del fusto, delle foglie e del frutto), in alcune bacche come ribes e mirtilli, in semi oleosi come le arachidi e nel *Polygonum cuspidatum*, il vegetale contenente la più elevata quantità di questo stilbene.

Il resveratrolo si è evoluto come molecola segnale capace di interagire con diverse strutture biologiche e di attivare una serie di processi di riparo e di meccanismi difensivi in risposta a stress come l'irradiazione da raggi UV. Inoltre, poiché il resveratrolo sembra essere strettamente correlato al controllo delle infezioni fungine nella pianta, è stato incluso tra le fitoalessine, una classe di antibiotici vegetali. Il resveratrolo esiste in due forme isomeriche: il *trans*-resveratrolo e il *cis*-resveratrolo, delle quali la forma *trans* è la più stabile. Entrambe le forme possono essere convertite l'una nell'altra in relazione alla luce, alla temperatura e al pH. Il resveratrolo può esistere anche nelle forme glicosilate come il Piceide e il Resveratrolside. Le forme glicosilate risultano essere più resistenti del resveratrolo alla degradazione ossidativa. Inoltre la glicosilazione, pur mantenendo le proprietà biologiche del resveratrolo, conferisce alla molecola una maggiore stabilità e solubilità favorendone inoltre l'assorbimento intestinale.

Nell'uomo, il resveratrolo è assorbito principalmente nel duodeno e studi in modelli animali hanno dimostrato che approssimativamente il 10-20% del resveratrolo disponibile viene assorbito e distribuito in tutti gli organi.

Nella medicina asiatica questa molecola è stata adoperata inconsapevolmente per secoli come radice polverizzata di *Polygonum cuspidatum*, chiamata Ko-jo-kon o Itadori, e usata empiricamente come sostanza curativa in un'ampia varietà di patologie tra cui infezioni fungine, infiammazioni della pelle, malattie cardiache, epatiche e dei vasi sanguigni.

L'uva è probabilmente la più importante sorgente naturale di resveratrolo assunto con la dieta. Il resveratrolo raggiunge elevati livelli nelle bucce delle uve ed è quindi presente nei vini rossi e nei succhi d'uva in concentrazioni di mg/L. In generale, si è osservato che i vini rossi hanno valori di resveratrolo più elevati dei vini bianchi poiché, essendo presente nella buccia dell'uva e non nella polpa, quando avviene la vinificazione dei vini rossi, con fermentazione sulla buccia, il resveratrolo viene estratto e passa nel vino.

La presenza nel vino di molte sostanze aventi effetti benefici sulla salute dell'uomo, e tra queste in particolare il resveratrolo, è stata evidenziata nel cosiddetto *paradosso francese*. Con esso si intende il fenomeno per il quale in Francia, nonostante il relativamente alto consumo di alimenti ricchi in acidi grassi saturi, l'incidenza di mortalità per malattie cardiovascolari è inferiore rispetto ad altri paesi dieteticamente comparabili. La correlazione tra bassa mortalità per malattie coronariche, consumo di vino e presenza di resveratrolo risale agli anni '90, da quel momento numerosissimi studi scientifici hanno messo in evidenza le grandi potenzialità terapeutiche del resveratrolo.

L'attenzione per questa molecola è stata inoltre incrementata da un sempre crescente interesse verso quei fattori nutrizionali coinvolti nella prevenzione di numerose patologie e verso l'utilizzo prodotti d'origine naturale nella terapia di malattie degenerative nell'uomo.

Il resveratrolo è in grado di promuovere molte attività biologiche, sia *in vitro* che *in vivo*, e dai dati presenti in letteratura si osserva che esso funziona attraverso molteplici meccanismi d'azione in cui vengono coinvolti numerosi target molecolari (1, 5).

Numerosi dati sperimentali indicano che il resveratrolo è un potente antiossidante, esso previene l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) e protegge dai radicali liberi. Studi preliminari ipotizzano che il resveratrolo protegga il cervello da stress ossidativi coinvolti in alcune malattie neurodegenerative. Il resveratrolo 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 piastrinica. Promuove inoltre la produzione di ossido nitrico, riduce il livello dei trigliceridi e del colesterolo nel sangue e agisce sull'agente ipertensivo intrinseco endotelina-1. Nel suo insieme, costituisce una sostanza di rilievo nella riduzione dei rischi cardiovascolari. Il resveratrolo ha inoltre proprietà antivirali, neuroprotettive, anti-invecchiamento e agisce come un fitoestrogeno. In generale il resveratrolo blocca l'attivazione dell'NF-KB, fattore fortemente associato ai meccanismi dell'infiammazione. È stato inoltre dimostrato che esso ha effetti antiangiogenetici, regolando la proliferazione e la chemiotassi a livello delle cellule endoteliali (1, 6).

Il resveratrolo mostra proprietà immunomodulanti e in particolare, come dimostrato nel nostro laboratorio, ha sui linfociti umani un effetto dose-dipendente, stimolante o depressivo sulle risposte immunologiche cellulo-mediate. Nel nostro studio abbiamo dimostrato che l'attività citotossica naturale delle *Natural Killer* (NK) e l'attività citotossica antigene-indotta (CTL) possono essere stimolate o inibite secondo la dose di resveratrolo utilizzata: basse dosi mostrano effetti stimolanti mentre alte dosi hanno effetti inibitori. Inoltre, il resveratrolo con un analogo andamento bifasico stimola o sopprime la produzione di citochine come gamma IFN, IL2, e IL4 in linfociti CD8⁺ e CD4⁺ stimolati sperimentalmente *in vitro* (7).

Il resveratrolo possiede attività chemiopreventive e antitumorali e sembra inibire l'insorgenza, la promozione e la progressione di alcuni tipi di cancro. Esso ha un effetto inibitorio sulla carcinogenesi, come dimostrato in diversi modelli sperimentali. Numerosi meccanismi molecolari sono potenzialmente implicati nell'attività antitumorale del resveratrolo; essi coinvolgono componenti del ciclo cellulare, molecole che regolano le vie dell'apoptosi, molecole che regolano l'angiogenesi e la progressione metastatica (3, 4, 6).

Resveratrolo e melanoma

Il nostro gruppo studia da anni gli effetti antitumorali del resveratrolo su linee cellulari tumorali umane e murine di diversa istologia. La sua capacità antiproliferativa è principalmente correlata a meccanismi che riguardano l'inibizione della crescita cellulare, l'induzione dell'apoptosi, il blocco del ciclo cellulare e l'inibizione dell'attività telomerasica (8, 9).

Il melanoma maligno è uno dei tumori che presenta maggiori difficoltà nel trattamento chemioterapico poiché le cellule di melanoma possiedono un'intrinseca o un'acquisita resistenza ai farmaci antitumorali convenzionali. Esiste pertanto una pressante esigenza di identificare nuovi composti che possano essere efficaci contro questa neoplasia.

In lavori precedenti e nel lavoro pubblicato dal nostro gruppo, (3, 4, 10) è stato dimostrato che il resveratrolo è in grado di inibire la crescita cellulare del melanoma *in vitro*. Nel lavoro precedentemente pubblicato (10) abbiamo selezionato tre linee di melanoma umano con differenti livelli di resistenza alla temozolomide (TMZ), un triazeno-composto usato correntemente nella chemioterapia antitumorale e nel melanoma. Le tre linee di melanoma selezionate PR-Mel, M14 e

SK-Mel 28 sono state trattate con resveratrolo ed esaminate per studiare l'inibizione della crescita tumorale, la perturbazione del ciclo cellulare e l'induzione di apoptosi in seguito a trattamento con resveratrolo. I risultati ottenuti dimostrano che il resveratrolo inibisce marcatamente la proliferazione cellulare in tutte le linee esaminate sia TMZ-sensibili come M14, sia TMZ-resistenti come SK-Mel28 e PR-Mel. Inoltre, i risultati hanno mostrato che, in tutte le linee testate, il resveratrolo agisce in modo dose-dipendente e che l'inibizione della proliferazione cellulare si osserva precocemente dopo le prime 24 ore di trattamento. Mediante la marcatura del DNA con ioduro di propidio e la tecnica della citometria a flusso si è rilevato che nelle prime 24 ore di trattamento delle linee cellulari studiate si determina un accumulo delle cellule in fase S e un blocco nella progressione verso la fase G2 del ciclo cellulare. L'effetto di blocco è stato osservato anche a dosi molto basse di resveratrolo inferiori a quelle necessarie per avere un'inibizione della crescita cellulare pari al 50% (IC 50). Nelle cellule trattate con dosi crescenti di resveratrolo per 72 ore si è osservata induzione di apoptosi, strettamente correlata alla dose di resveratrolo utilizzata e presente in tutte le linee esaminate. In accordo con i risultati ottenuti sull'inibizione della proliferazione cellulare, la linea M14 è risultata la più sensibile. L'apoptosi è stata inoltre confermata tramite lo studio del clivaggio di PARP mediante Western Blot (10).

Dai risultati di diversi studi è possibile pensare che molteplici meccanismi e diverse vie di attivazione siano coinvolte nell'arresto del ciclo cellulare e nell'induzione di apoptosi da parte del resveratrolo. L'induzione di apoptosi è stata correlata alla stabilizzazione e fosforilazione di p53, al *breakdown* del potenziale mitocondriale transmembrana e all'attivazione della via Fas/Fas ligand (5, 6). Poiché i risultati presenti in letteratura non sono sempre in accordo e in parte dipendono dal modello cellulare studiato, risulta evidente che i meccanismi responsabili degli effetti antiproliferativi e proapoptotici del resveratrolo siano ancora da chiarire. Uno studio, condotto dal nostro gruppo sugli effetti del resveratrolo sull'attività telomerasica in cellule di melanoma, è in fase di pubblicazione.

Per ciò che concerne gli effetti antitumorali del resveratrolo sul melanoma, suscita considerevole interesse la selezione di molecole appartenenti alla stessa classe chimica che possano agire con maggiore potenza e avere dal punto di vista biochimico una sempre maggiore stabilità e biodisponibilità.

A questo scopo abbiamo saggiato e confrontato l'attività di molecole analoghe al resveratrolo, quali la sua forma isomerica *cis* e due derivati glucosidici, il piceide e il resveratrolside, sulla linea cellulare di melanoma PR-MEL più resistente ai farmaci convenzionali, come precedentemente dimostrato. La crescita cellulare è stata valutata seminando le cellule in piastre da 96 pozzetti in presenza di dosi crescenti di *trans*-resveratrolo, *cis*-resveratrolo, piceide e resveratrolside (da 0,3 mcg/mL a 40 mcg/mL). L'inibizione della crescita cellulare è stata valutata dopo il trattamento con i composti per 24, 48 e 72 ore mediante il test del *trypan blue* che sfrutta la capacità del colorante di penetrare in maniera selettiva all'interno di cellule necrotiche e l'MTT, test biochimico basato sulla capacità di enzimi mitocondriali, attivi solo nelle cellule vitali, di convertire i sali di tetrazolio in sali di formazano. L'inibizione della crescita cellulare, riferita al test MTT, valutata a 72 h, espressa come IC₅₀ è stata riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Concentrazione del resveratrolo e dei glucosidi del resveratrolo capace di inibire del 50% (ic 50) la replicazione di cellule del melanoma maligno PR-MEL

Composto	IC50 (mcg/mL) PR - MEL
Trans-resveratrolo	23,5
Cis-resveratrolo	19,5
Piceide	3,3
Resveratrolside	8,7

I risultati hanno dimostrato che l'attività antitumorale del Piceide, saggiata su una linea particolarmente chemioresistente, è significativamente superiore rispetto all'attività svolta dagli altri composti.

Inoltre, anche lo studio comparativo degli effetti antiproliferativi dei due glucosidi rispetto al tempo di incubazione conferma, a parità di concentrazione, la maggiore attività antiproliferativa del Piceide (dati non mostrati).

I risultati, sebbene preliminari, dimostrano che i glucosidi del resveratrolo da noi saggiati hanno, a parità di concentrazione, una maggiore efficacia rispetto al trans- e cis-resveratrolo nell'inibire la replicazione cellulare di cellule tumorali di melanoma maligno. Essi possono quindi costituire una valida alternativa al resveratrolo, anche in considerazione della loro maggiore solubilità e facilità di assorbimento. Attualmente, nel nostro laboratorio sono in corso ricerche allo scopo sia di definire ulteriormente l'attività antitumorale *in vitro* e di analizzarne i meccanismi d'azione coinvolti a livello molecolare.

Bibliografia

1. Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F. Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle* 2007;6(20):2495-510.
2. Das S, Das DK. Resveratrol: a therapeutic promise for cardiovascular diseases. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2007;2(2):133-8.
3. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2004;24(5A):2783-840.
4. Bishayee A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 2009;2(5):409-18.
5. Shakibaei M, Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res* 2009;53(1):115-28.
6. Kundu JK, Surh YJ. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett* 2008;269(2):243-61.
7. Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci* 2001;70(1):81-96.
8. Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Cottarelli A, Falchetti R, Ravagnan G, Bonmassar E. Effect of resveratrol on proliferation and telomerase activity of human colon cancer cells *in vitro*. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(2):189-93.
9. Lanzilli G, Fuggetta MP, Tricarico M, Cottarelli A, Serafino A, Falchetti R, Ravagnan G, Turriziani M, Adamo R, Franzese O, Bonmassar E. Resveratrol down-regulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells *in vitro*. *Int J Oncol* 2006;28(3):641-8.
10. Fuggetta MP, D'Atri S, Lanzilli G, Tricarico M, Cannavò E, Zambruno G, Falchetti R, Ravagnan G. *In vitro* antitumour activity of resveratrol in human melanoma cells sensitive or resistant to temozolomide. *Melanoma Res* 2004;14(3):189-96.

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), Maurizio Paci (a)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università "Tor Vergata", Roma

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

Introduzione

L'*Allium sativum* è una pianta originaria delle regioni desertiche dell'Asia Centrale, l'uso in medicina risale ai tempi degli Egizi. Infatti, diverse incisioni e disegni raffiguranti i bulbi di questa pianta sono stati ritrovati su tombe egizie del 3700 a.C. e inoltre nel *Codice Ebers*, datato 1550 a.C., nel quale sono descritte più di 800 formule terapeutiche, di queste circa ventidue menzionano l'aglio come rimedio efficace per numerose malattie, tra cui quelle cardiache. Nel tempo, sono state scoperte nuove proprietà terapeutiche dell'aglio ed è stato utilizzato in passato per la cura della lebbra, dell'asma e della tosse e per ridurre il rischio di contagio della peste. La relazione nel 1858 di Louis Pasteur, nella quale si mettevano in luce le proprietà antibatteriche dell'aglio, portò al suo utilizzo durante la Prima e la Seconda Guerra Mondiale per la prevenzione della gangrena.

Nell'ultimo decennio lo studio delle proprietà medicamentose dell'aglio ha suscitato elevato interesse nella comunità scientifica e molte delle proprietà terapeutiche attribuitegli dalla tradizione hanno riscontrato una validità scientifica. Le proprietà di questo alimento, molto in uso nella Medicina Tradizionale Cinese e indiana, sono state riscoperte e riapplicate sia nella medicina tradizionale che in quella omeopatica. Sono riconosciuti all'aglio effetti ipotensivi e ipocolesterolemizzanti, effetti cardioprotettivi e antitrombotici (1, 2), attività antibatteriche (3, 4), antiparassitarie, antimicotiche (5) e anche antivirali (6). Il principio attivo dell'aglio è fondamentalmente l'allicina che è prodotta durante il taglio e la triturazione a partire dalla allicina mediante una reazione chimica catalizzata dall'enzima allinasi (Figura 1).

Il composto allicina possiede attività antiossidanti e antimicrobiche contro un ampio spettro di batteri sia Gram-negativi che Gram-positivi. L'effetto antimicrobico è dovuto principalmente all'azione dell'allicina su vari enzimi coinvolti nel metabolismo dei microrganismi. Negli ultimi anni grande interesse ha suscitato lo studio delle proprietà dei composti organici con zolfo derivanti dall'allicina nella cura e nella prevenzione del cancro. Studi epidemiologici hanno messo in risalto l'azione antitumorale preventiva derivante dal consumo di questo alimento, correlandolo ad una ridotto rischio di cancro gastrico e del colon (7, 9). In generale i composti con zolfo solfanico possiedono funzioni antiossidanti e chemiopreventive. L'attività antiossidante è dovuta sia alla loro capacità di fungere da *scavenger* di specie reattive dell'ossigeno (ROS, *reactive oxygen species*), che alla loro capacità di potenziare l'attività di molti enzimi antiossidanti come: glutatione perossidasi, glutatione reduttasi e perossido dismutasi. Molti composti organici naturali contenenti zolfo (OSCs) inibiscono la proliferazione delle cellule tumorali *in vitro* mediante induzione della morte cellulare programmata. L'induzione dell'apoptosi da parte di OSC naturali pone quindi una rilevante questione riguardo al loro ruolo nella cellula e degli enzimi coinvolti nel loro metabolismo nel processo di

cancerogenesi. Sebbene i meccanismi biochimici alla base degli effetti antiproliferativi 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 e all'apoptosi (10). Non tutte le cellule sono ugualmente suscettibili agli effetti deleteri degli OSCs presenti nell'aglio e in particolare, le cellule normali sembrano essere meno suscettibili a tali composti rispetto a quelle tumorali. Questo potrebbe far pensare che l'incontrollata 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 tiosolfato:cianuro:solfotrasferasi, è ridotta nelle cellule tumorali colon-rettali (11). Un recente studio condotto da Chang e coll. (12) ha posto in luce, tra i composti estratti dall'aglio il 2-propeniltiosolfato di sodio (2-PTS) (Figura 2), e l'N-propiltiosolfato di sodio (NPTS), isolati entrambi dalla fase idrosolubile dell'aglio e della cipolla; tali composti hanno dimostrato di possedere proprietà che potrebbero risultare rilevanti nella prevenzione da malattie cardiovascolari e dallo sviluppo di degenerazioni neoplastiche.

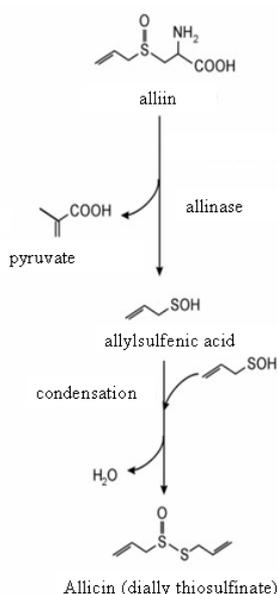


Figura 1. Reazione per la produzione dell'allicina

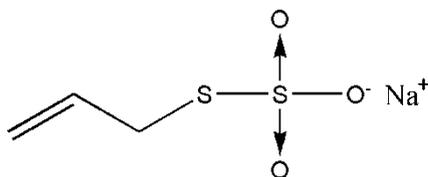


Figura 2. 2-Propenil-tiosolfato di sodio (2-PTS)

In questi studi è stata inoltre messa in evidenza una capacità antiproliferativa del 2-PTS su alcune linee tumorali, simile a quella osservata per il cisplatino. I nostri studi effettuati sia *in vitro*, mediante saggi d'attività e studi d'interazione, che su linee cellulari di linfoblastoma umano HuT-78, sono stati volti a valutare i possibili effetti del 2-PTS sia sul sistema antiossidante che di detossificazione della cellula, al fine di comprendere il meccanismo d'azione anti-tumorale di questo composto contenente zolfo solfanico (13). Questi 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.

Studi sugli effetti del 2-pts sul sistema di detossificazione e sul sistema redox della cellula

Il risultati da noi ottenuti hanno messo in evidenza la capacità di tale composto di determinare l'inibizione dell'attività tiosolfato:cianuro-solfotrasferasica (TST) sia *in vitro* che *in vivo*, con formazione di una forma tioalchenilata, modificata quindi covalentemente a livello della cisteina catalitica, dell'enzima TST, anche noto come rodanese (13). Nei nostri studi ci siamo avvalsi della possibilità di utilizzare la TST espressa da *A. vinelandii* (RhdA), il cui gene era stato clonato in precedenza per l'espressione in *E. coli* (14), e che rappresenta un buon modello nello studio di questa classe di enzimi (15, 17). Sebbene non sia ancora ben chiarito il ruolo fisiologico dell'enzima mitocondriale TST, è nota la sua implicazione nel processo di detossificazione dal cianuro, nel metabolismo dei composti contenenti zolfo solfanico e nella biogenesi dei complessi Fe-S (18) e, recentemente, una riduzione dell'espressione della rodanese è stata anche osservata in malattie degenerative come l'ataxia di Friedrich (19). Il possibile coinvolgimento delle TST nel sistema di detossificazione da OSC accresce l'interesse riguardo al ruolo biologico di questa famiglia di enzimi. Nei nostri studi abbiamo valutato la possibilità che l'eccesso di composti con zolfo solfanico nella cellula, che induce stati degenerativi e apoptosi, potesse essere correlato anche ad una ridotta o incorretta funzionalità delle solfotrasferasi. Recenti studi mediante analisi *microarray* di cellule tumorali colon-rettali hanno evidenziato che il gene della TST è uno dei tre geni mitocondriali insieme a quello della tioredoxina (Trx), che presenta una significativa decrescita dell'espressione passando dallo stato normale allo stato tumorale (11) e, proprio sulla base di questi risultati, è stato ipotizzato che la possibile causa della carcinogenesi colon-rettale sia localizzata nei mitocondri. L'associazione tra l'espressione della TST e alcuni stati degenerativi potrebbe, quindi, fare di quest'enzima un potenziale biomarker tumorale e target del trattamento antitumorale. I risultati da noi ottenuti hanno, inoltre, rivelato un'alterazione dell'equilibrio redox della cellula dopo trattamento con 2-PTS permettendo, inoltre, di correlare l'azione del sistema TST-tioredoxina-tioredoxina riduttasi con induzione apoptotica da trattamento con OSC (13). I risultati ottenuti nei nostri studi hanno, inoltre, permesso di evidenziare un'elevata capacità del 2-PTS di reagire direttamente con il glutatione, rendendo ragione dello squilibrio redox osservato negli studi con le cellule tumorali HuT-78. Ulteriori studi da noi condotti sul derivato glutationico del 2-PTS rivelano la possibilità di utilizzo di questo composto in associazione con altri chemioterapici al fine di potenziarne gli effetti. Attualmente, sono in corso, presso il nostro laboratorio, ulteriori studi volti a definire in dettaglio il meccanismo d'azione del 2-PTS e dei suoi derivati nel determinare l'arresto della crescita cellulare e valutare quali siano gli effetti *in vivo* di tali composti sull'espressione e l'attività degli enzimi coinvolti nel processo di detossificazione cellulare.

Bibliografia

1. Neil H, Sigali C. Garlic, its cardioprotective properties. *Curr Top Lipidol* 1994;5:6-10.
2. Block E. The chemistry of garlic and onion. *Sci Am* 1985;252:114-9.
3. Nishino H, Iwashima A, Itakura Y, Matsuura H, Fuwa T. Antitumor-promoting activity of garlic extracts. *Oncology* 1989; 46:277-80.
4. Cañizares P, Gracia I, Gómez LA, Martín de Argila C, Boixeda D, García A, de Rafael L. Allylthiosulfinates, the bacteriostatic compounds of garlic against *Helicobacter pylori*. *Biotechnol Prog* 2004;20(1):397-401.
5. Lemar KM, Passa O, Aon MA, Cortassa S, Muller CT, Plummer S, O'Rourke B, Lloyd D. Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. *Microbiology* 2005;151:3257-65.
6. Zhen H, Fang F, Ye DY, Shu SN, Zhou YF, Dong YS, Nie XC, Li G. Experimental study on the action of allitridin against human cytomegalovirus *in vitro*: Inhibitory effects on immediate-early genes. *Antiviral Res.* 2006;72(1):68-74.
7. Amagase H, Milner JA. Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-DMBA binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis* 1993;14:1627-31.
8. Milner JA. Garlic: its anticarcinogenic and antimutagenic properties. *Nutr Rev* 1996;54:S82-S86.
9. Steinmetz KA, Kushi LH, Bostick RM, Folsom AR, Potter JD. Vegetables, fruit and colon cancer in the Iowa Woman's Study. *J Epidemiol* 1994;139:1-5.
10. Toohey JJ. Persulfide sulfur is a growth factor for cells defective in sulfur metabolism. *Biochem Cell Biol* 1986;64:758-65.
11. Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, Laurberg S, Sorensen FB, Hagemann R, T.F. OR. Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62:4352-63.
12. Chang HS, Yamato O, Yamasaki M, Ko M, Maede Y. Growth inhibitory effect of alk(en)yl thiosulfates derived from onion and garlic in human immortalized and tumor cell lines. *Cancer Lett* 2005;223:47-55.
13. Sabelli R, Iorio E, De Martino A., Podo F, Ricci A, Viticchie G, Rotilio G, Paci M, Melino S. Rhodanese-thioredoxin system and allyl sulfur compounds. *Febs J.* 2008;275:3884-99.
14. Colnaghi R, Pagani S, Kennedy C, Drummond M. Cloning, sequence analysis and overexpression of the rhodanese gene of *Azotobacter vinelandii*. *Eur J Biochem* 1996;236:240-8.
15. Melino S, Cicero DO, Orsale M, Forlani F, Pagani S, Paci M. *Azotobacter vinelandii* rhodanese: selenium loading and ion interaction studies. *Eur J Biochem* 2003;270:4208-15.
16. Gallo M, Melino S, Melis R, Paci M & Cicero DO Backbone NMR assignment of the 29.6 kDa rhodanese protein from *Azotobacter vinelandii*. *J Biomol NMR* 2006;36 Suppl 1:73.
17. Melino S, Cicero DO, Forlani F, Pagani S, Paci M. The N-terminal rhodanese domain from *Azotobacter vinelandii* has a stable and folded structure independently of the C-terminal domain. *FEBS Lett* 2004;577:403-8.
18. Bonomi F, Pagani S, Kurtz DM. Enzymic synthesis of the 4Fe-4S clusters of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. *Eur J Biochem* 1985;148:67-73.
19. Tan G, Napoli E, Taroni F, Cortopassi G. Decreased expression of genes involved in sulfur amino acid metabolism in frataxin-deficient cells. *Hum Mol Genet* 2003;12:1699-1711.

EFFETTO DEL *TEA TREE OIL* E DEL SUO COMPONENTE ATTIVO TERPINEN-4-OLO SULLA MIGRAZIONE E L'INVASIONE DELLE CELLULE DI MELANOMA UMANO

Giuseppina Bozzuto, Marisa Colone, Laura Toccaceli, Annarita Stringaro, Agnese Molinari
Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il melanoma umano è un tumore altamente invasivo e metastatico e, a tutt'oggi, rappresenta una delle neoplasie più difficilmente aggredibili con i correnti trattamenti, data la sua resistenza intrinseca sia alla chemio- che alla radioterapia. Numerosi dati sperimentali e diversi studi clinico-patologici hanno evidenziato come il fenotipo farmacoresistente è spesso associato ad un comportamento maggiormente aggressivo in tumori di diversa derivazione istologica. In particolare, la sovraespressione del trasportatore di xenobiotici P-glicoproteina (P-gp) spesso correla con un fenotipo dotato di un elevato potenziale invasivo e metastatico.

Studi precedentemente condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che cellule di melanoma umano (M14 WT) coltivate in presenza di farmaco (M14 ADR), presentano un'elevata espressione di P-gp. Tale sovraespressione conferisce alle cellule M14 ADR una maggiore resistenza all'apoptosi caspasi-dipendente (Fas-mediata, deprivazione di siero), quando confrontate con le cellule parentali M14 WT (1). Tale risultato apre nuove e interessanti prospettive circa il ruolo esercitato dalla P-gp nei meccanismi di sopravvivenza del melanoma.

In tale ambito, era stato precedentemente dimostrato nel nostro laboratorio come una sostanza naturale, l'olio essenziale estratto dalla *Melaleuca alternifolia* (*tea tree oil*, TTO) fosse in grado di sovvertire la resistenza delle cellule M14 ADR, mediata dalla P-gp, all'apoptosi caspasi dipendente. L'effetto del TTO sulle cellule di melanoma appariva mediato da una sua interazione con la membrana plasmatica, ma non direttamente con la P-gp, suggerendo una sua possibile interferenza con i meccanismi di sopravvivenza, direttamente o indirettamente attivati, o semplicemente associati ad una sovraespressione del trasportatore di farmaci (2). In questo studio è stato quindi valutato l'effetto del TTO e del terpinen-4-olo sul potenziale migratorio e invasivo delle cellule di melanoma umano farmacosensibili (M14 WT) e farmacoresistenti (M14 ADR).

Risultati

Saggi di migrazione e d'invasione condotti mediante la tecnica del “*transwell chamber invasion assay*” hanno dimostrato come le cellule della linea farmacoresistente M14 ADR, che presentano la sovraespressione della Pgp siano molto più motili (17.8 ± 5.0 vs 11.3 ± 4.9) e invasive ($22,7 \pm 5,4$ vs $10,9 \pm 7,7$) delle cellule della linea parentale M14 WT.

Osservazioni in microscopia elettronica a scansione (SEM) sostanzialmente hanno confermato questi risultati. Infatti, dopo 24 ore di migrazione sul lato invertito degli inserti le cellule M14 ADR erano molto più numerose quando confrontate con la controparte sensibile (Figure 1 a e 1 b). Inoltre, lo studio condotto mediante SEM ha dimostrato che le cellule di melanoma umano farmacosensibili, e le loro varianti farmacoresistenti, impiegano strategie migratorie e invasive differenti che riflettono il loro potenziale invasivo (3).

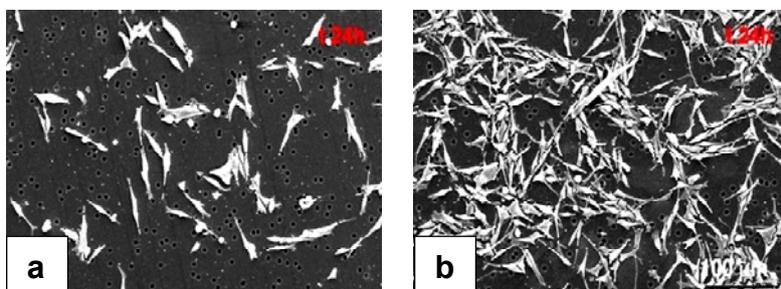


Figura 1. SEM. Cellule M14 WT (a) ed M14 ADR (b) migrate attraverso i pori della membrana forata

Sono stati quindi analizzati gli effetti del TTO e del terpinen-4-olo sui processi di migrazione e invasione ed è stato osservato un decremento significativo della percentuale dell'area occupata dalle cellule resistenti M14 ADR migrate in presenza del TTO e del componente attivo. L'effetto maggiore veniva riscontrato dopo trattamento con terpinen-4-olo allo 0,01% che riduceva la percentuale dell'area occupata di circa il 60% nel processo di migrazione e del 50% nel processo di invasione (Figura 2).

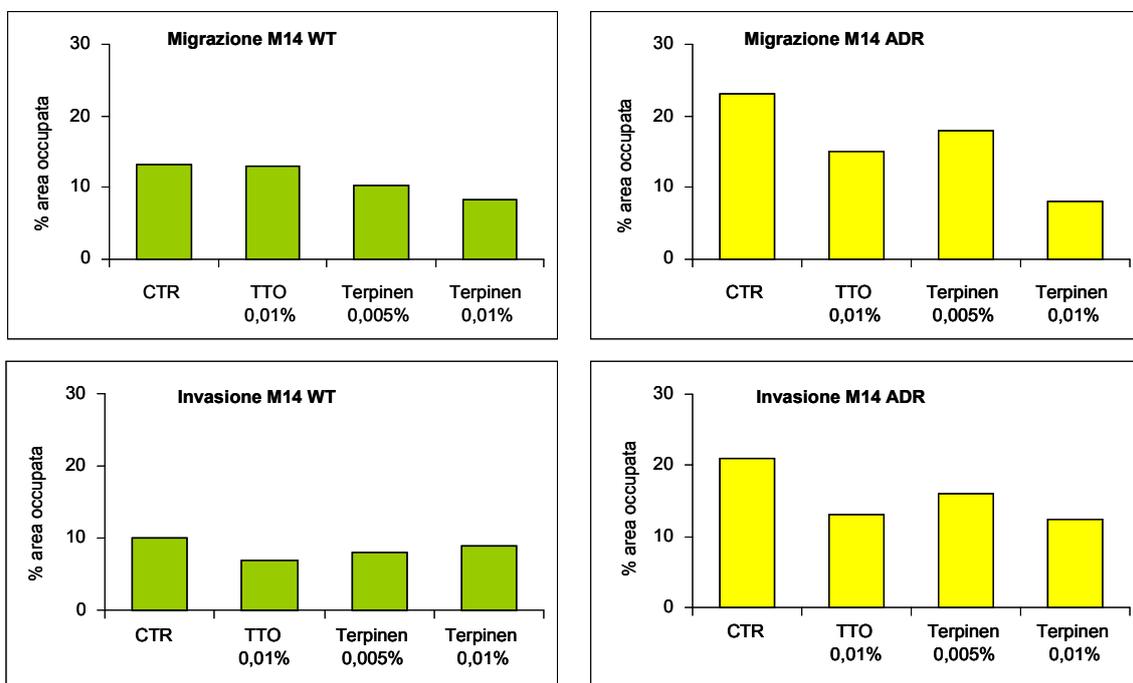


Figura 2. Effetto del TTO e del Terpinen-4-olo sul potenziale migratorio e invasivo delle cellule di melanoma M14 WT e ADR

Gli effetti del terpinen-4-olo sui processi di migrazione delle cellule di melanoma sono stati anche analizzati mediante SEM. Le osservazioni sono state effettuate sia sul lato superiore che inferiore delle membrane di migrazione (Figura 3).

Nelle cellule sensibili adese sulla membrana forata è stata evidenziata la formazione di tipiche *blebs* di superficie, indotte dall'interazione del terpinen-4-olo con la membrana plasmatica. Tale alterazione morfologica veniva rilevata anche nelle cellule migrate nella parte sottostante del filtro in prossimità del fronte di avanzamento cellulare. Gli effetti del terpinen-4-olo apparivano ancora più devastanti nelle cellule resistenti dove si osservano delle vere e proprie voragini a livello della membrana plasmatica (Figura 3).

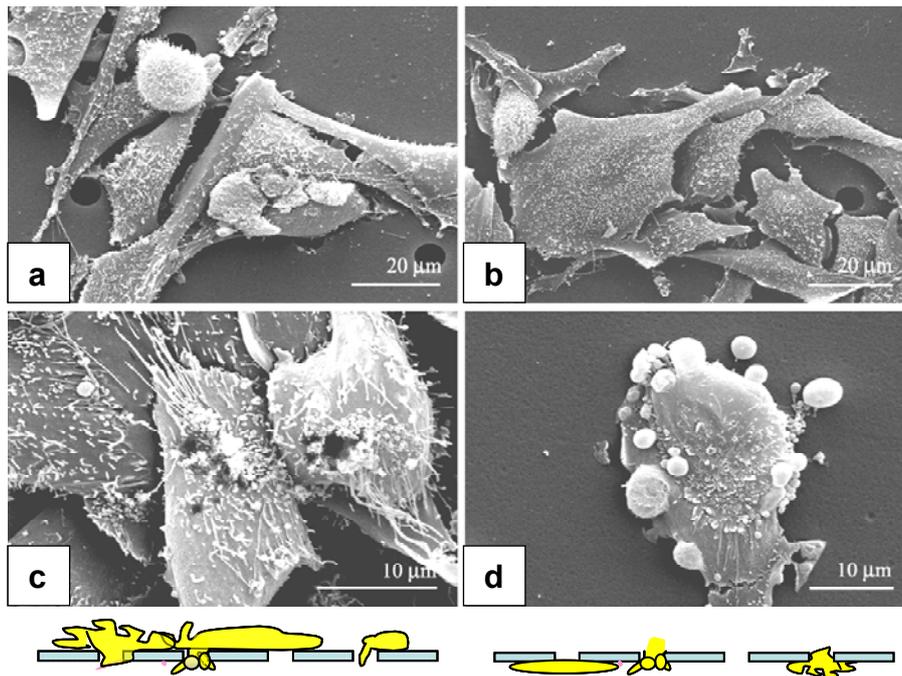


Figura 3. SEM. Effetto del Terpinen-4-olo sulle cellule di melanoma M14 ADR in migrazione. (a, b) Lato superiore della membrana. (c, d) Lato inferiore della membrana. (a, b) Controllo. (c, d) Terpinen-4-olo 0,01%

I risultati ottenuti da esperimenti in *western blotting* hanno, inoltre, chiaramente dimostrato l'esistenza di un segnale intracellulare (ERK 1/2 e p38 MAPK) stimolabile attraverso la P-gp. Tale segnale prevede l'attivazione delle proteine ezrina, radixina e moesina (ERM). Infatti, le cellule M14 ADR, ma non le cellule parentali, sotto lo stimolo migratorio presentano fosforilazione di ERM. È interessante osservare che se la migrazione viene effettuata in presenza del terpinen-4-olo tale attivazione viene inibita. Parimenti il terpinen-4-olo inibisce la fosforilazione di ERK nelle cellule resistenti messe sotto stimolo migratorio ma non nelle cellule sensibili (Figura 4).

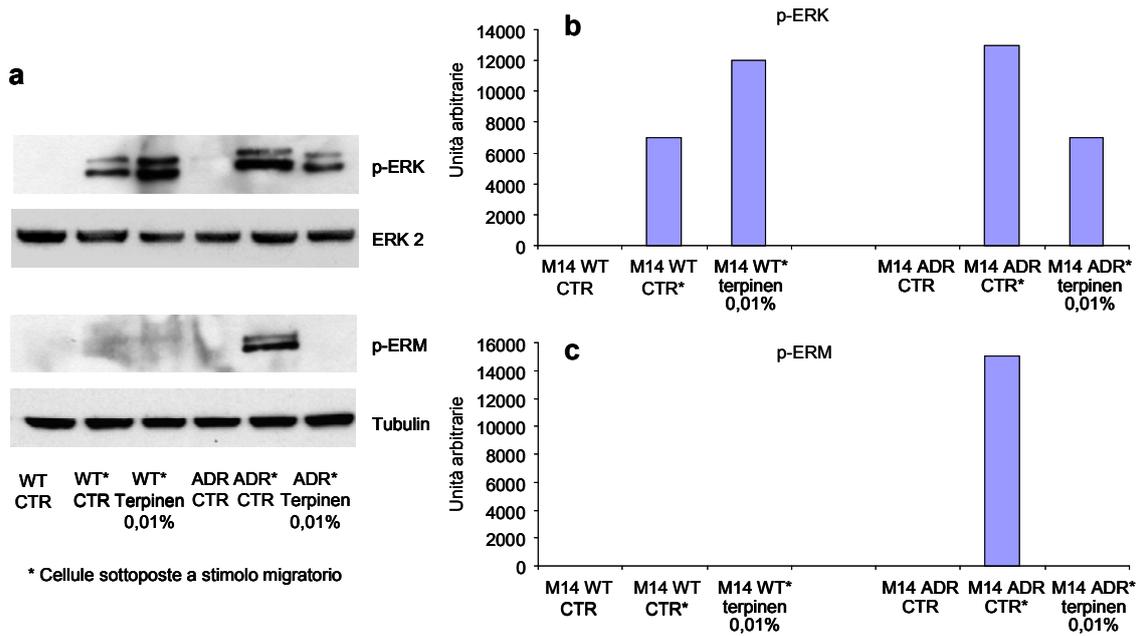


Figura 4. Effetto del TTO e del Terpinen-4-olo sulle vie di traduzione del segnale delle cellule di melanoma umano sotto stimolo migratorio

Conclusioni

Il TTO e il terpinen-4-olo sono in grado di interferire con il potenziale migratorio e invasivo delle cellule di melanoma umano e in modo più efficiente nelle cellule della linea farmacoresistente che overesprimono la P-glicoproteina.

I risultati di questo lavoro suggeriscono che il TTO e il terpinen-4-olo inducono un decremento della migrazione e dell'invasione delle cellule farmacoresistenti inibendo il segnale intracellulare stimolabile attraverso la P-glicoproteina.

Bibliografia

1. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G, Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004;122(2):349-60.
2. Giordani C, Molinari A, Toccaceli L, Calcabrini A, Stringaro A, Chistolini P, Arancia G, Diociaiuti M. Interaction of *tea tree oil* with model and cellular membranes. *J Med Chem* 2006;49(15):4581-8.
3. Colone M, Calcabrini A, Toccaceli L, Bozzuto G, Stringaro A, Gentile M, Cianfriglia M, Ciervo A, Caraglia M, Budillon A, Meo G, Arancia G, Molinari A. The multidrug transporter P-glycoprotein: a mediator of melanoma invasion? *J Invest Dermatol* 2008;128(4):957-71.

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

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

Introduzione

Le cellule tumorali esposte ad agenti citotossici possono sviluppare resistenza ai chemioterapici tradizionali e assumere il fenotipo polifarmacoresistente (MDR: *multidrug resistance*). Negli ultimi anni, sono state proposte numerose soluzioni per superare la farmacoresistenza nei tumori. L'utilizzo di sostanze naturali a concentrazioni subcitotossiche, in combinazione con i farmaci convenzionali, potrebbe rappresentare un importante contributo alla terapia antitumorale. L'interesse verso i prodotti naturali vegetali è in costante aumento grazie alla possibilità di sensibilizzare, mediante sostanze non tossiche, la cellula tumorale al trattamento farmacologico. La Voacamina (VOA), un alcaloide bisindolico vegetale, isolato dalla pianta infestante brasiliana *Peschiera fuchsiaefolia*, presenta attività antimicrobica e antimalarica contro ceppi di *Plasmodium falciparum* cloroquina resistenti. La malaria e il cancro apparentemente sembrano non avere nulla in comune, ma in realtà entrambe le patologie possono risultare refrattarie alla terapia a causa dell'insorgenza del fenotipo resistente, caratterizzato dalla sovraespressione della P-glicoproteina (P-gp), nota proteina di membrana che permette l'estruzione dello xenobiotico, riducendone l'accumulo intracellulare nonché l'effetto citotossico. Abbiamo precedentemente dimostrato come la VOA fosse in grado di inibire in modo competitivo la P-gp espressa in diverse linee cellulari tumorali farmacoresistenti – osteosarcoma umano (U-2 OS/DX), carcinoma del colon (LoVo-R), linfoblastoidi (CEM-R) – favorendo così l'accumulo intracellulare della doxorubicina (DOX) (7). Il risultato più interessante è stato che l'effetto citotossico così ottenuto non era dovuto all'induzione dell'apoptosi, ma le cellule tumorali così trattate andavano incontro a un meccanismo di morte cellulare autofagica.

L'autofagia è un processo catabolico che si osserva in alcune condizioni sperimentali tra cui la mancanza di nutrienti e/o di fattori di crescita o in risposta a varie condizioni di stress quali l'esposizione alle radiazioni ionizzanti, sostanze citotossiche e ipossia. L'autofagia in primo luogo, rappresenta quindi un processo catabolico che garantisce il mantenimento omeostatico delle cellule attraverso l'eliminazione di proteine alterate e di organelli danneggiati, permettendo così il riutilizzo di componenti necessari per lo svolgimento di importanti funzioni vitali (3). Alcuni recenti studi hanno dimostrato però che in diversi modelli cellulari tumorali l'induzione del processo autofagico può portare alla morte cellulare (4).

Le cellule di osteosarcoma umano farmacoresistenti sono state trattate con una concentrazione di VOA e per un periodo di tempo tali da indurre circa il 50% di morte nella popolazione trattata. In seguito sono state effettuate analisi morfologiche mediante l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione (SEM), analisi dei markers tipici dell'apoptosi quali il test dell'Annexina V-FITC in citofluorimetria e il taglio della proteina PARP mediante tecnica di *western blotting* per confermare l'assenza di morte cellulare programmata.

Risultati e discussione

Studi recenti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato l'importanza della comprensione dei meccanismi molecolari che regolano l'attivazione o la repressione del fenomeno autofagico nei tumori (7). Abbiamo quindi voluto approfondire il meccanismo di morte cellulare indotto dalla VOA in modo tale da individuarne i target molecolari. Tale conoscenza ci permetterà di valutare l'effettiva possibilità di un trattamento efficace in combinazione con altri farmaci.

Una cellula in apoptosi mostra evidenti caratteristiche morfologiche meglio individuabili mediante sistemi di microscopia ottica ed elettronica: la cellula diventa sferica e perde contatto con le cellule adiacenti; la cromatina comincia ad essere degradata e condensata; la cromatina continua il processo di degradazione e condensazione in corpi addossati al nucleolemma (2). Le cellule che non sono in grado di andare in apoptosi muoiono o per necrosi, che porta alla lisi della cellula per inefficienza metabolica, o per autofagia, processo catabolico di autodigestione. All'inizio del processo autofagico, proteine e organelli che devono essere degradati per poi essere riutilizzati, sono avvolti da strutture vacuolari caratterizzate da una doppia membrana, dette autofagosomi. Successivamente gli autofagosomi fondono con i lisosomi per formare gli autolisosomi, dove il materiale viene digerito dagli enzimi lisosomiali (5).

In precedenti studi abbiamo dimostrato che le cellule U-2 OS/DX, dopo trattamento con VOA, presentano strutture molto simili a vacuoli autofagici; ciò è stato dimostrato mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a trasmissione (TEM); inoltre è stata evidenziata l'espressione della proteina LC3, noto marker degli autofagosomi, mediante microscopia confocale a scansione laser.

Questi dati preliminari ci hanno indotto a studiare meglio il meccanismo di morte cellulare indotto dalla VOA a concentrazioni citotossiche; pertanto la fase successiva del nostro studio ci ha portato ad escludere che si trattasse di apoptosi (morte cellulare programmata di tipo I).

Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) hanno evidenziato, nelle cellule U-2 OS/DX trattate con VOA, segni di danno cellulare, anche se la maggior parte delle cellule non mostrava segni morfologici tipici di cellule in apoptosi (Figura 1B). Le cellule di controllo (Figura 1A) mostrano una classica distribuzione uniforme dei microvilli e una forma abbastanza regolare, mentre in seguito a trattamento (Figura 1B) le cellule appaiono retratte e con forma irregolare seguita da una ridistribuzione dei microvilli di membrana. Paragonando le cellule trattate con VOA (Figura 1B) con quelle trattate con la Staurosporina (Figura 1C), noto induttore dell'apoptosi, si può escludere l'induzione di apoptosi da parte della VOA.

La valutazione dei parametri biochimici e morfologici ha confermato la non attivazione del *pathway* apoptotico (6). È stata analizzata l'esposizione superficiale della fosfatidilserina, evento primario del programma apoptotico. Le cellule trattate con VOA (5 µg/mL per 24 h), sono state marcate con ioduro di propidio (PI) e con Annessina V coniugata con FITC e analizzate in citofluorimetria (Figura 1D). Nell'esperimento rappresentativo riportato, i controlli delle U-2 OS/WT e delle U-2 OS/DX mostrano una percentuale di cellule Annessina V-negative e PI-negative (cellule vive) del 94,5% e del 96,2%, rispettivamente. Queste percentuali diminuiscono significativamente (47,6% e 50,8%) dopo trattamento con VOA. La percentuale totale delle cellule permeabili allo ioduro di propidio è del 45,9% per le U-2 OS/WT e del 40,1% per le U-2 OS/DX, mentre le annessina V-positive e PI-negative (cellule in apoptosi) è del 6,5% (U-2 OS/WT) e del 9,1% (U-2 OS/DX). Questi risultati sembrano suggerire che l'apoptosi avviene solo in una piccola percentuale di cellule. L'analisi tramite *Western blotting* del taglio della polimerasi ADP-ribosilasi (PARP), ampiamente accettato come marcatore dell'apoptosi (8), ha ulteriormente dimostrato l'assenza di tale fenomeno nelle cellule di osteosarcoma trattate con VOA (Figura 1E).

In conclusione i dati appena mostrati confermano che il trattamento di cellule di osteosarcoma umano trattate con VOA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per 24 ore) induce morte cellulare autofagica e non apoptosi, quindi si può ben sperare per un futuro e promettente utilizzo di tale sostanza in terapia clinica. Inoltre, una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nel *pathway* autofagico rappresentano oggi la chiave di volta per individuare nuovi target molecolari, al fine di migliorare l'efficacia della terapia antitumorale nei confronti di fenotipi tumorali farmacoresistenti e/o apoptosi resistenti.

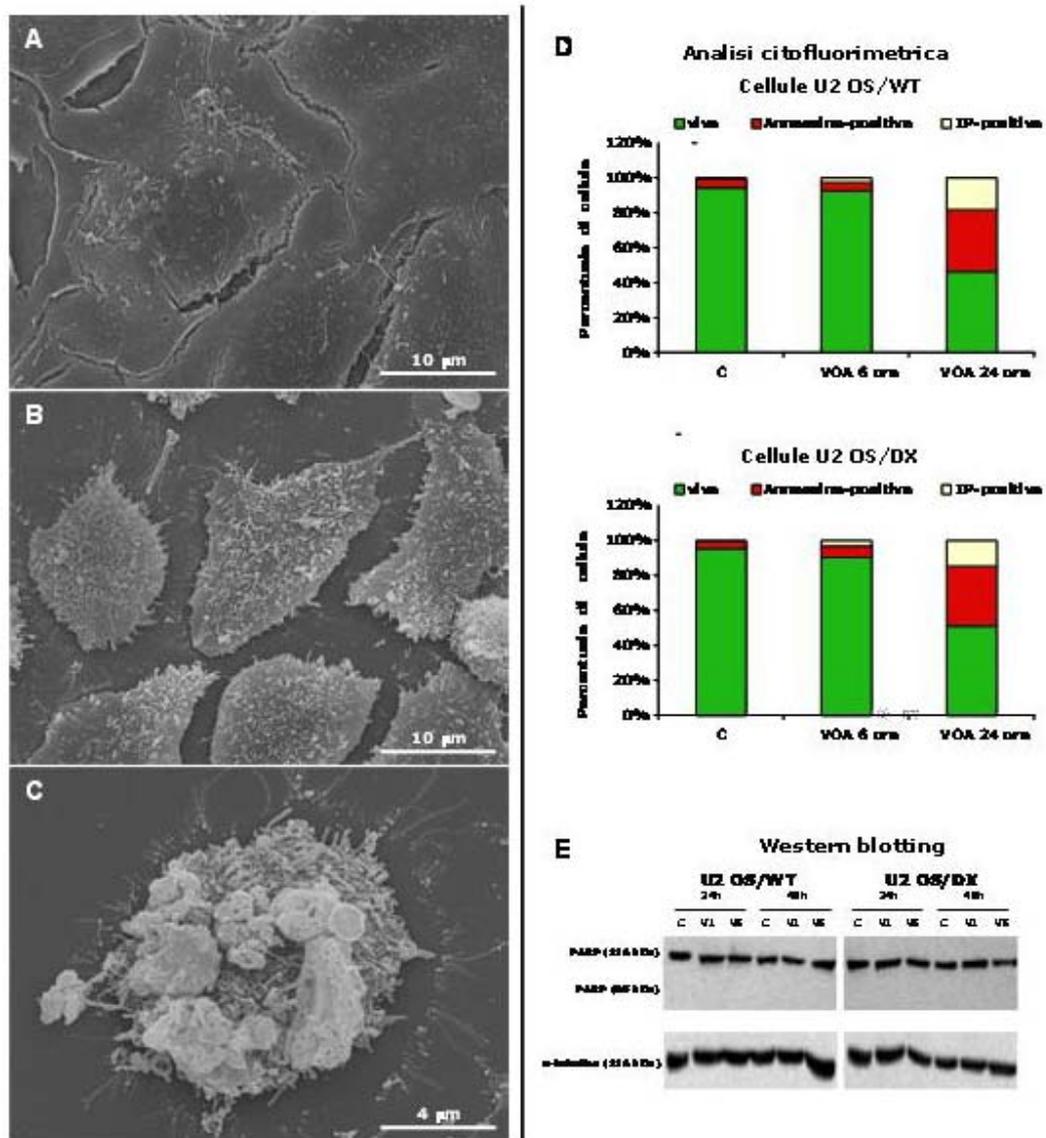


Figura 1. A) SEM - Controllo; B) SEM - trattamento con VOA; C) SEM - trattamento con Staurosporina; D) Analisi citofluorimetrica di cellule trattate con VOA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ per 6 ore e per 24 ore; sono state successivamente doppiamente marcate con ioduro di propidio (PI) e con Annessina V coniugata con FITC; E) Western blotting: analisi di PARP dopo trattamento con VOA tempo- e dose-dipendente delle linee cellulari U-2 OS/WT e U-2 OS/DX

Bibliografia

1. Jin S and White E. Role of autophagy in cancer. *Autophagy* 2007;3:28-31.
2. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181-182:471-4.
3. Klionsky DJ and Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000;290:1717-21.
4. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Natur Rev Cancer* 2005;5:726-34.
5. Kroemer G, Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005;5:886-97.
6. Lecoeur H, Gougeon ML. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexinV/propidium iodide assay. *Cytometry* 2001;44:65-72.
7. Meschini S, Marra M, Condello M, Calcabrini A, Federici E, Dupuis ML, Cianfriglia M, Arancia G. Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaeifolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug resistant tumor cells. *Int J Onc* 2005;27:1597-603.
8. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996;10:587-97.

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, Facoltà di Scienze della Nutrizione e della Salute, Università
della Calabria, Rende (CS), Italy*

Introduzione

Il mondo vegetale rappresenta una 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 (1). Il genere *Salvia* (Lamiaceae) comprende circa 700 specie, caratterizzate da elevata diversità sia nella produzione di metaboliti secondari sia negli effetti farmacologici dimostrati da tali prodotti (2). Numerose specie di *Salvia* sono utilizzate come agenti aromatizzanti nell'industria alimentare o cosmetica (3). *S. acetabulosa* L. è una specie che cresce nel sud est dell'Asia (4). L'attività antimicrobica, antiossidante, e inibitoria dell'attività sull'ACE e sugli enzimi α -amilase e α -glucosidase è stata precedentemente riportata (5-7). Oggi, nell'area di ricerca volta alla scoperta di agenti antitumorali, i prodotti di origine naturale rappresentano un soggetto di grande interesse. Numerose pubblicazioni scientifiche riportano l'attività citotossica attraverso differenti meccanismi d'azione (induzione dell'apoptosi, inibizione dell'angiogenesi) di oli essenziali ottenuti da differenti specie di *Salvia* o di composti isolati da queste (8-16).

Scopo del presente lavoro è stata la valutazione della composizione fitochimica e dell'attività citotossica dell'olio essenziale di *S. acetabulosa*, raccolta sul territorio Libanese.

Materiali e metodi

Le parti aeree di *S. acetabulosa* sono state raccolte sul monte Baskinta in Libano nel Novembre 2003 e autenticate dal Prof. S. Safi, Dipartimento di Biologia, Facoltà di Scienze II, Università del Libano. Le parti aeree (620g) di *S. acetabulosa* sono state sottoposte a idrodistillazione (3 ore) utilizzando l'apparecchiatura di Clevenger (17). L'olio ottenuto è stato conservato a 4-8 °C in bottiglia scura per prevenire gli effetti negative della luce. L'analisi della composizione quali-quantitativa dell'olio mediante gas cromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS) è stata condotta utilizzando la metodica precedentemente descritta (18). L'identificazione dei composti è stata realizzata mediante confronto degli indici di ritenzione con i dati di letteratura di standard puri e dei dati di massa con quelli presenti nelle librerie dello strumento Wiley 138 e Wiley 275 (Tabella 1). L'olio essenziale è stato, quindi, testato per valutare la sua attività citotossica *in vitro* su nove linee cellulari di tumore umano: carcinoma polmonare a cellule larghe COR-L23 (ECACC No. 92031919), adenocarcinoma colon-rettale Caco-2 (ATCC No. HTB-37), melanoma amelanotico C32 (ATCC No. CRL-1585), adenocarcinoma renale ACHN (ATCC No. CRL-1611), melanoma maligno A375 (ECACC No.

88113005), adenocarcinoma polmonare epiteliale A549 (ECACC No. 86012804), carcinoma epatocellulare Huh-7D12 (ECACC No. 01042712), adenocarcinoma mammario MCF-7 (ATCC No: HTB-22D), adenocarcinoma prostatico LNCaP (ATCC No: CRL-1740), utilizzando come confronto la linea cellulare normale di fibroblasti 142BR (ECACC No. 90011806).

Tabella1. Principali componenti, analizzati mediante GC-MS, dell'olio essenziale di *S. acetabulosa*

Composto	R^a	Abbondanza % ^b	Metodo di riconoscimento ^c
Tuene	926	0,2	I, MS
α -Pinene	936	52,3	I, MS, Co-GC
Canfene	953	0,3	I, MS, Co-GC
Sabinene	973	tr	I, MS, Co-GC
β -Pinene	978	1,4	I, MS, Co-GC
β -Mircene	986	0,6	I, MS, Co-GC
α -Fellandrene	1005	0,1	I, MS
Limonene	1032	1,7	I, MS, Co-GC
1,8-Cineolo	1035	27,7	I, MS, Co-GC
Linalolo	1098	0,1	I, MS
Camfora	1147	6,7	I, MS
α -Terpineolo	1189	0,1	I, MS
β -Cariofillene	1418	1,7	I, MS, Co-GC
β -Guriunene	1432	tr	I, MS
α -Umulene	1454	0,1	I, MS, Co-GC
<i>allo</i> -Aromadendrene	1461	0,2	I, MS
γ -Cadinene	1515	0,1	I, MS, Co-GC
δ -Cadinene	1524	tr	I, MS, Co-GC
Viridiflorolo	1594	0,2	I, MS
Composti identificati		93,5	

^a Colonna non polare con fase stazionaria SE-30. ^b Valore medio \pm SD ($n=3$). tr: > 0,3%. ^c I, Indice di ritenzione; MS, spettro di massa; Co-GC: co iniezione con standard.

Le linee cellulari COR-L23, C32, LNCaP e ACHN sono state poste in coltura in RPMI 1640 medium, mentre le 142BR, Caco-2, A549, Huh-7D12, Caco-2, A375 e le MCF-7 in DMEM. Entrambi i mezzi presentano il 10% di siero fetale bovino, l'1% di L-glutamina e l'1% di penicillina/streptomycin. Le linee cellulari sono state mantenute a 37 °C e al 5% CO₂ con un 95% di umidità. L'attività antiproliferativa dell'olio è stata valutata tramite l'SRB test, che permette di valutare l'inibizione della crescita cellulare mediante l'utilizzo di un colorante aminoxantenico rosa vivace, la sulforodamina B (SRB). Questa è una proteina anionica, contenente due gruppi solfonici capaci di unirsi, in condizioni acide, ai residui amminoacidici basici delle proteine cellulari, attraverso legami elettrostatici. Si tratta, quindi, di un saggio colorimetrico, attraverso il quale si può stimare indirettamente il numero di cellule (18). L'attività antiproliferativa dell'olio è espressa in valori di IC₅₀ utilizzando il programma Prism Graphpad Prism versione 4.0 per Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA. La curva dose-risposta è stata ottenuta plottando la percentuale di inibizione verso la concentrazione. I dati ottenuti sono espressi come media \pm S.D. L'analisi statistica è stata condotta avvalendosi del programma Prism Graphpad Prism versione 4.0. Le differenze sono state valutate mediante one-way analysis of variance (ANOVA). Per completare l'analisi statistica dei dati è stato condotto il multicomparison Dunnet's test.

Risultati

L'idrodistillazione delle parti aeree di *S. acetabulosa* ha permesso l'ottenimento di un olio giallo chiaro (1,7% p/p). La composizione chimica analizzata attraverso GC/MS è riportata in Tabella 1 nella quale i composti sono elencati sulla base del loro indice di ritenzione. L'olio essenziale è caratterizzato da diciannove composti che rappresentano il 93,5% del totale. α -Pinene (52,3%), 1,8-cineolo (27,7%) e canfora (6,7%) sono i principi attivi maggiormente rappresentativi. La Tabella 2 presenta i dati di citotossicità dell'olio essenziale di *S. acetabulosa* sulle nove linee di carcinoma umano. La *S. acetabulosa* ha dimostrato di inibire la crescita cellulare sia delle C32 che delle COR-L23 con un valore di IC₅₀ di 6,3 e 6,5 $\mu\text{g/mL}$, rispettivamente. In particolare, l'attività antiproliferativa sulle CORL-23 è 7 volte superiore al controllo positivo vinblastina. Lo stesso olio evidenzia un valore di IC₅₀ di 12,3 $\mu\text{g/mL}$ sulla linea di melanoma A375. Tale valore risulta circa 2 volte inferiore a quello evidenziato sulla linea C32. Valori superiori di IC₅₀ sono stati riscontrati per le A549 e le ACHN con valori di IC₅₀ di 67,7 e 92,1 $\mu\text{g/mL}$, rispettivamente. Le linee cellulari di MCF-7, LNCaP e Huh-7D12 sono risultate non sensibili all'azione dell'olio di *S. acetabulosa*. Assenza di citotossicità è stata valutata anche sulla linea di controllo 142BR. Tale risultato suggerisce l'azione dell'olio e delle sue componenti su specifici meccanismi coinvolti nella proliferazione tumorale.

Tabella 2. Attività citotossica dell'olio di *S. acetabulosa* (IC₅₀ $\mu\text{g/mL}$)

Linea cellulare	<i>S. acetabulosa</i>	Vinblastina	Taxolo
COR-L23	6,5 \pm 0,7**	45,5 \pm 0,7	-
Caco-2	14,1 \pm 0,8**	69,0 \pm 0,9	-
A375	12,3 \pm 0,5	7,2 \pm 0,7	-
A549	67,70 \pm 1,3	67,3 \pm 2,0	-
ACHN	92,1 \pm 2,2**	22,7 \pm 1,6	-
C32	6,3 \pm 0,6	3,0 \pm 0,08	-
Huh-7D12	> 100	45,6 \pm 0,8	-
MCF-7	> 100	-	0,08 \pm 0,004
LNCaP	> 100	29,3 \pm 0,9	-
142BR	> 100	37,6 \pm 1,5	-

I dati sono espressi come media \pm SD ($n= 3$). Il taxolo è usato come controllo positivo per la linea cellulare MCF-7, mentre la vinblastina è usata per le linee ACHN, A375, C32, LNCaP, A549, Huh-7D12, COR-L23, Caco-2 e 142BR. ** $p < 0.01$ vs. controllo positivo.

Discussione

Numerosi studi hanno analizzato la composizione chimica di oli essenziali ottenuti da differenti specie di *Salvia*. Il β -cariofillene è il composto maggiormente rappresentato nell'olio ottenuto da *S. nemorosa*, *S. virgata*, *S. aethiopsis*, *S. verticillata*, *S. hypoleuca* e *S. atropatana* (19-23). Nell'olio essenziale ottenuto da *S. candidissima*, *S. tomentosa* and *S. leriifolia* il β -pinene è stato identificato quale composto maggiormente rappresentativo (24), a differenza di *S. santolinifolia* e *S. multicaulis* in cui predomina l' α -pinene (25, 26). La canfora domina la frazione aromatica dell'olio di *S. officinalis*, *S. clevelandii* e *S. aytachi* (27, 28). L'1,8-cineolo rappresenta circa il 15% della componente dell'olio di *S. fruticosa* e *S. aramiensis* (24, 29). Recenti studi hanno valutato l'attività citotossica di diverse specie di *Salvia*. Ad esempio, *S. fruticosa*, raccolta a Kalymnos e Creta, è risultata attiva nei confronti della linea cellulare COR-

L23 con valori di LC₅₀ di 60,4 e 40,1 µg/mL, rispettivamente. Nell'ambito della biodiversità è interessante sottolineare come solo la specie raccolta a Kalymnos sia risultata citotossica su cellule HepG2 (LC₅₀ 68,1 µg/mL) (8). Successivamente, Kaileh *et al.* (9) hanno chiarito il meccanismo attraverso il quale *S. fruticosa* esercitava attività citotossica. Bersaglio molecolare dell'olio è l'inibizione del fattore di trascrizione nucleare NFκB che regola l'espressione dei geni coinvolti nell'apoptosi e nel processo di immuno-modulazione.

La citotossicità di numerose specie di *Salvia*, quali *S. dominica*, *S. lanigera*, *S. menthaefolia*, *S. palaestina*, *S. sclarea* e *S. spinosa*, è stata valutata attraverso il saggio con MTT su differenti linee tumorali (DBTRG-05MG, T98G, U-87MG, WiDr e HT-29, MDA Pca2b, JEG-3, HEC-1A e CIR). I valori di IC₅₀ sono compresi nel range 90-400 µg/mL. Tra queste, *S. menthaefolia* ha esibito la più marcata attività citotossica (10). L'analisi della letteratura ha rivelato la presenza di soli due lavori su attività citotossica di olio essenziale di specie di *Salvia*. Nell'ambito di questi, un nostro precedente studio aveva evidenziato l'attività antiproliferativa dell'olio di *S. officinalis* sulle linee tumorali C32 e ACHN, con valori di IC₅₀ di 367.43 e 108.60 µg/mL, rispettivamente. L'olio di *S. przewalskii* è risultato citotossico sulla linea tumorale HL-60 (30).

Tra i costituenti dell'olio di *Salvia* l'1,8-cineolo è risultato inattivo su numerose linee cellulari utilizzate in questo screening, sebbene lo stesso monoterpene sia in grado di inibire le cellule K562 (IC₅₀ 117,3 µM) (31,32). Nella frazione sesquiterpenica è stato identificato il β-cariofillene, composto dalla potente attività citotossica su C32, ACHN, SK-MEL-28, MDA-MB-231, Hs 578T, 5637, MCF-7 e PC-3 (33,34). Nell'ambito dei sesquiterpeni identificati interessante è anche l'α-umulene che ha mostrato attività antiproliferativa sulle linee MCF-7, PC3, A-549, DLD-1, M4BEU, CT-26 e LNCaP (33,35).

Sulla base dei dati acquisiti in questo studio, non potendo attribuire l'attività dell'olio a nessuno delle componenti maggiormente rappresentativi, è possibile ipotizzare che a supportare l'azione antiproliferativa dell'olio di *S. acetabulosa* vi sia un sinergismo d'azione che coinvolge le componenti minoritarie come già precedentemente dimostrato e riportato in letteratura.

Bibliografia

1. Lu Y, Yeap FL. Polyphenolics of *Salvia* – a review. *Phytochemistry* 2002;59:117-140.
2. Sivropoulou A, Nikolaou C, Papanikolaou E, Kokkini S, Lanars T, Arsenakis M. Antimicrobial, cytotoxic and antiviral activity of *Salvia fruticosa* essential oil. *J Agr Food Chem* 1997;45:3197-201.
3. Tepe B, Donmez E, Unlu M, Candan F, Daferera D, Vardar-Unlu G, Polissiou M, Sokmen A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia multicaulis*, *Food Chem* 2004;84:519-25.
4. Holm LG, Pancho JV, Herberger JP, Plucknett DL. *A Geographical Atlas of World Weeds*. New York: John Wiley and Sons; 1979.
5. Nadir MT, Salih FM, Dhahir ABJ, Nori M, Hussain AM. Antimicrobial activity of *Salvia* species indigenous to Iraq. *J Biol Sci Res* 1986;17:109-17.
6. Couladis M, Tzakou O, Verykokidou E, Harvala C. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother Res* 2003;17:194-5.
7. Loizzo MR, Saab AM, Tundis R, Menichini F, Bonesi M, Piccolo V, Statti GA, de Cindio B, Houghton PJ, Menichini F. In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J Ethnopharmacol* 2008;119:109-16.
8. Clevenger JF. Apparatus for determination of volatile oil. *J Am Pharm Ass* 1928;17:341-6.

9. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream, (USA): Allured Publishing Co.; 1995.
10. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer Res* 2007;27:3293-9.
11. Mirza M, Sefidkon F. Essential oil composition of two *Salvia* species from Iran, *Salvia nemorosa* L. and *Salvia reuterana* Boiss. *Flavour Frag J* 1999;14:230-2.
12. Sefidkon F, Mirza M. Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran, *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia syriaca* L. *Flavour Frag J* 1999;14:45-6.
13. Sefidkon F, Khajavi MS, Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran: *Salvia verticillata* L and *Salvia santolinifolia* Boiss. *Flavour Frag J* 1999;14:77-8.
14. Mirza M, Ahmadi L. Composition of the essential oil of *Salvia atropatana* Bunge. *J Essent Oil Res* 2000;12:575-6.
15. Chalchat JC, Gorunovic MS, Petrovic SD, Maksimovic ZA. Chemical composition of two wild species of the genus *Salvia* L. from Yugoslavia: *Salvia aethiopsis* and *Salvia verticillata*. *J Essen Oil Res* 2001;13:416-8.
16. Bayrak A, Akgul A. Composition of essential oils from Turkish *Salvia* species. *Phytochemistry* 1987;26:846-7.
17. Clevenger JF. Apparatus for determination of volatile oil. *J Am Pharm Ass* 1928;17:341-6.
18. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against *in vitro* human tumor models. *Anticancer Res* 2007;27:3293-9.
19. Mirza M, Sefidkon F. Essential oil composition of two *Salvia* species from Iran, *Salvia nemorosa* L. and *Salvia reuterana* Boiss. *Flavour Frag J* 1999;14:230-2.
20. Sefidkon F, Mirza M. Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran, *Salvia virgata* Jacq. and *Salvia syriaca* L. *Flavour Frag J* 1999;14:45-6.
21. Sefidkon F, Khajavi MS, Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran: *Salvia verticillata* L. and *Salvia santolinifolia* Boiss, *Flavour Frag J* 1999;14:77-78.
22. Mirza M, Ahmadi L. Composition of the essential oil of *Salvia atropatana* Bunge. *J Essent Oil Res* 2000; 2:575-6.
23. Chalchat JC, Gorunovic MS, Petrovic SD, Maksimovic ZA. Chemical composition of two wild species of the genus *Salvia* L. from Yugoslavia: *Salvia aethiopsis* and *Salvia verticillata*. *J Essen Oil Res* 2001;13:416-8.
24. Bayrak A, Akgul A. Composition of essential oils from Turkish *Salvia* species. *Phytochemistry* 1987;26:846-7.
25. Rustaiyan A, Masoudi SH, Monfared A, Komeilizadeh H. Volatile constituents of three *Salvia* species grown wild in Iran. *Flavour Frag J* 1999;14:276-8.
26. Mohammadhosseini, M., Pazoki, A., & Akhlaghi, H. Chemical composition of the essential oils from flowers, stems, and roots of *Salvia multicaulis* growing wild in Iran. *Chem Nat Comp* 2008;44:127-28.
27. Baser KHC, Duman H, Vural M, Adiguzel N, Aytac Z. Essential oil of *Salvia aytachii* M. Vural et Adiguzel N. *J Essen Oil Res* 1997;9:489-90.
28. Chalchat JC, Michet A, Pasquier B. Study of clones of *Salvia officinalis* L. yields and chemical composition of essential oil. *Flavour Frag J* 1998;13:68-70.
29. Demirci B, Baser KHC, Tumen G. Composition of the essential oil of *Salvia aramiensis* Rech. Fil. growing in Turkey. *Flavour Frag J* 2002;17:23-5.

30. Skala E, Kalembe D, Wajs A, Rózalski M, Krajewska U, Rózalska B, Wieckowska-Szakiel M, Wysokińska H. *In vitro* propagation and chemical and biological studies of the essential oil of *Salvia przewalskii* Maxim. *Z Naturforsch [C]* 2007;62:839-48.
31. Loizzo MR, Tundis R, Statti GA, Menichini F. Jacaranone: a cytotoxic constituent from *Senecio ambiguus* subsp. *ambiguus* (biv.) DC. against renal adenocarcinoma ACHN and prostate carcinoma LNCaP cells. *Arch Pharm Res* 2007;30:701-7.
32. Lampronti I, Saab AM, Gambari R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int J Oncol* 2006;29:989-95.
33. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Prol* 2008;41:1002-12.
34. Sibanda S, Chigwada G, Poole M, Gwebu ET, Noletto JA, Schmidt JM, Reac AI, Setzer WN. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *J Ethnopharmacol* 2004;92:107-11.
35. Legault J, Dahl W, Debition E, Pichette A, Maldemont JC. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -Humulene as possible mechanism of action. *Planta Med* 2003;69:402-3.

SESSIONE IV

Sostanze naturali con attività antimicrobica

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

Sonia Melino (a), Ridvan Nepravishta (a), Francesca Mondello (b), Maurizio Petruzzelli (c), Maurizio Paci (a)

(a) Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università "Tor Vergata", Roma

(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Dipartimento di Scienze Biomediche, Università "G. D'Annunzio", Chieti

Introduzione

I peptidi antimicrobici naturali (AMP) fanno parte del sistema di difesa innato dell'ospite, hanno generalmente un ampio spettro d'azione e la loro attività si esplica nei confronti di batteri, funghi e virus. Diversi studi hanno dimostrato la possibilità di utilizzare i peptidi antimicrobici come agenti antinfettivi e nella profilassi delle malattie trasmesse per via sessuale (es. HIV, *Neisseria*, *Chlamidia*, ecc.). Attualmente si conoscono più di 500 differenti peptidi, isolati da vari organismi dagli insetti all'uomo. Molti organismi secernono diversi tipi di peptidi sulle loro superfici epiteliali creando "cocktail antimicrobici" ad ampio spettro (1). Nei vertebrati sono prodotti in abbondanza principalmente a livello della mucosa esterna (occhi, apparato genitourinario, pelle, polmoni) e dalle cellule di Paneth nel tratto intestinale del duodeno. Gli AMP hanno generalmente una natura cationica e vanno incontro a modifiche post-traduzionali prima della secrezione. Infatti sono sintetizzati in forma di precursori con una sequenza segnale e con sequenze che, neutralizzando la carica positiva del peptidi, ne riducono la tossicità all'interno della cellula che lo sintetizza. Tali sequenze vengono eliminate durante la secrezione, portando alla formazione del peptide biologicamente attivo. Sono peptidi prevalentemente di natura cationica e molti con caratteristiche anfipatiche, classificati in base alla struttura secondaria in 4 gruppi: 1) alfa eliche lineari di 20-30 aminoacidi (come la magainina, cecropine, ecc.); 2) peptidi ricchi di Pro-Arg (come le bactenecine bac 5 e 7); 4) peptidi ricchi di ponti disolfuro a struttura alfa o a struttura beta (es. le defensine). Molti AMP hanno caratteristiche anfipatiche e in genere, tali peptidi esplicano la loro attività antimicrobica agendo a livello della membrana cellulare dei microrganismi. Grazie alla regione cationica sono in grado di interagire con le membrane cariche negativamente, come quelle microbiche, mentre la regione idrofobica ne permette la penetrazione o la formazione di pori con strutture dette a "toroide" o a "barrel-stave", che destabilizzando la membrana inducono la morte del microrganismo (1). In generale i peptidi antimicrobici sono in grado di svolgere un'azione selettiva interagendo con le membrane batteriche caratterizzate dalla prevalenza di fosfolipidi acidi sul lato esterno della membrana. Pertanto questo meccanismo d'azione rende particolarmente difficile lo sviluppo di resistenza agli AMP da parte dei microrganismi, dato che l'insorgenza della resistenza sarebbe determinabile solo con un evento estremamente raro di riarrangiamento nell'organizzazione fosfolipidica della membrana. Il crescente problema dello sviluppo di resistenza ai convenzionali antibiotici pone quindi in primo piano lo studio relativo alla possibilità di utilizzare gli AMP nella terapia antimicrobica, inoltre, tali composti potrebbero potenziare l'azione dei convenzionali antibiotici favorendone la penetrazione all'interno del microrganismo. Pertanto, recentemente molte industrie farmaceutiche si sono interessate allo sviluppo di farmaci antibatterici e antifungini aventi gli AMP come principio attivo e molti di questi prodotti sono attualmente in fase clinica, o loro immissione sul mercato è

di recente approvazione, come nel caso di un farmaco per la candidosi orale contenente il peptide P113 (2), un peptide analogo dell'istatina 5. La famiglia delle istatine (3), insieme a quella delle defensine (4) e delle catelicidine (5), è una delle tre famiglie di AMP più rappresentative prodotte nei mammiferi.

Studi sul meccanismo d'azione antimicrobica dell'istatina 5 e analoghi

Le istatine sono una famiglia di circa 12 peptidi lineari di natura cationica distinguibili elettroforeticamente e ricchi di istidina, che nel caso dell'istatina 5 risulta essere il 29% dell'intera composizione aminoacidica. Le istatine 1 e 3 sono i prodotti primari dei geni *his1* e *his2* localizzati sul cromosoma 4 umano nella banda q13, tali geni sono espressi solo nella parotide e nelle ghiandole submandibolari (3). Le istatine trovate nella saliva sono derivanti dalla proteolisi delle istatine 1 e 3 (Tabella 1).

Tabella 1. Sequenza amminoacidica delle istatine presenti nella saliva umana

Tipo di istatina	Sequenza amminoacidica
Istatina 1	DSpHEKRHHGYRRKFHEKHSHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
Istatina 2	RKFHEKHSHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
Istatina 3	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHSHSHRGYRSNYLYDN
Istatina 4	RKFHEKHSHSHRGYRSNYLYDN
Istatina 5	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHSHSHRGY
Istatina 6	DSHAKRHHGYKRRKFHEKHSHSHRGYR
Istatina 7	KFHEKHSHSHRGY
Istatina 8	RKFHEKHSHSHRGY
Istatina 9	KFHEKHSHSHRGYR
Istatina 10	KFHEKHSHSHRGYR
Istatina 11	KRHHGYKR
Istatina 12	KRHHGYK

I primi studi relativi all'attività antibatterica delle istatine risalgono al 1984 quando Mackay ad altri (6) misero in evidenza che le istatine possiedono un'attività batteriostatica e battericida nei confronti di *Streptococcus mutans*. Le istatine sono in grado di inibire la crescita microbica nella cavità orale, possedendo un'attività battericida e batteriostatica, pH dipendente, nei confronti di *S. mutans*, *Staphylococcus aureus* ed essendo in grado di inibire la coaggregazione di *Porfiromonas gengivalis* e *Streptococcus mitis* (7). Nell'ultima decade molto interesse ha suscitato il potere antimicotico di questa famiglia di peptidi e, in particolare, dell'istatina 5 (24 aa), che risulta essere il peptide antimicrobico più attivo tra le istatine naturali. L'istatina 5, infatti, è in grado di inibire la conversione di *Candida albicans* dalla forma vegetativa allo stato germinato, e di determinarne la morte a concentrazioni fisiologiche (15-30 µM) (8). Possiede, inoltre, sia un'attività fungicida che fungistatica nei confronti di *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* and *Neurospora crassa*. Quale sia il meccanismo di azione dell'istatina 5 nell'indurre tale attività candidacida, e in generale antifungina, non è al momento ancora noto. Tale peptide non esplica la sua attività inducendo la formazione di pori nella membrana, come avviene per altri AMP, ma si pensa che la sua azione possa essere determinata mediante un processo *multi-step*, che include un' iniziale interazione del peptide con una proteina presente sulla parete di *Candida* chiamata Ssa1/2p, che ne media l'entrata

nella cellula (9). Studi di microscopia a fluorescenza hanno messo in risalto che il target dell'istatina 5 all'interno della cellula di *C. albicans* è il mitocondrio (10) e in particolare si è osservato che all'interazione del peptide con la membrana mitocondriale segue il blocco della catena respiratoria. Si pensa che l'istatina 5 possa indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e in tal modo causare danni a livello della catena respiratoria (11). Recenti studi hanno messo in evidenza che l'istatina 5 è in grado di alterare il funzionamento del trasportatore di ioni potassio Trk1p ed è stato ipotizzato che quest'ultimo possa essere il target molecolare dell'istatina 5 nel determinare la morte cellulare di *C. albicans* (12). Studi strutturali e funzionali da noi effettuati su Hist5 (13), e sul peptide suo analogo ATCUN-C16 (10), hanno messo in luce nuove proprietà di questo peptide correlate alla sua capacità di legare ioni metallici (Figura 1). Sono stati effettuati studi di caratterizzazione strutturale volti a valutare l'interazione di tale peptide con ioni metallici mediante l'uso di tecniche spettroscopiche (Dicroismo Circolare, Risonanza Magnetica Nucleare, spettrometria di massa ESI) (14, 15) mettendo in evidenza un tipo di coordinazione caratteristica del motivo strutturale di legame per gli ioni metallici, chiamato Amino terminal- $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ - motif (ATCUN-motif): è stato, inoltre, possibile rivelare, mediante spettri CD nella far UV, e spettri 2D NMR l'influenza del legame degli ioni - $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ sulla stabilità strutturale del peptide. Studi funzionali hanno rivelato la capacità del peptide ATCUN-C16 di legare con elevata affinità e di idrolizzare il DNA. È ormai noto che tri- o tera- peptidi, caratterizzati dalla presenza del motivo ATCUN, sono in grado indurre l'idrolisi del DNA in presenza di ioni rame e acido ascorbico, o nichel e monoperossifalato di magnesio, generando una specie ossidante, non diffusibile, che determina un danno a livello del deossiribosio del DNA con conseguente scissione ossidativa (16-17). Dai dati da noi ottenuti risulta, inoltre, che l'attività nucleasica di questo AMP sia anche potenziata da un'azione idrolitica determinata dalla presenza del motivo EHXXH legante lo zinco (13, 14). Tali proprietà, non solo permettono una migliore comprensione del meccanismo di attività antimicrobica di questa famiglia di AMP salivari, ma anche ne ampliano le possibilità d'impiego come agenti terapeutici. Attualmente, nel nostro laboratorio sono in corso studi volti a valutare l'utilizzo di questi peptidi salivari, e di loro analoghi, come potenziali agenti antivirali e antitumorali.

Istatina 5

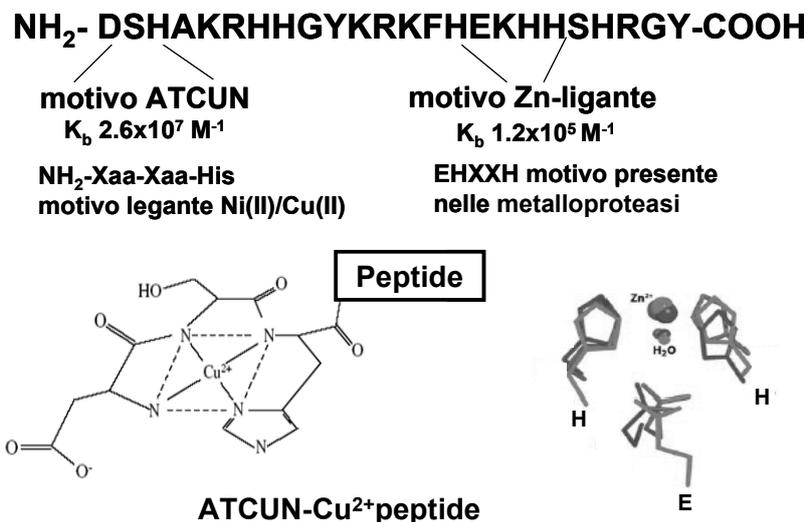


Figura 1. Motivi strutturali leganti ioni metallici presenti nell'Hist5

Bibliografia

1. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002;415(6870):389-95.
2. Rothstein DM, Spacciapoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, Dalla Serra M, Buxton DK, Oppenheim FG, Friden P. Anticandida activity is retained in p-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1367-73.
3. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotidsecretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1988; 263:7472-77.
4. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997;387(6636):861.
5. Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, Kiessling R, Jornvall H, Wigzell H, Gudmundsson GH. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000;96:3086-93.
6. MacKay BJ, Pollock JJ, Iacono VJ, Baum BJ. Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Infect Immun* 1984;44:688-94.
7. Murakami Y, Nagata H, Amano A, Takagaki M, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto, S. Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *Infect Immun* 1991;9:3284-6.
8. Tsai H, Bobek LA. Studies of the mechanism of human salivary histatin-5 candidacidal activity with histatin-5 variants and azole-sensitive and -resistant *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997;41:2224-28.
9. Edgerton M, Koshlukova SE, Lo TE, Chrzan BG, Straubinger RM, Raj PA. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998;273:20438-47.
10. Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, Amerongen AV, Abee T. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 1999;274:7286-91.
11. Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98:14637-42.
12. Baev D, Rivetta A, Vylkova S, Sun JN, Zeng GF, Slayman CL, Edgerton M. The TRK1 potassium transporter is the critical effector for killing of *Candida albicans* by the cationic protein, Histatin 5. *J Biol Chem* 2004;279:55060-72.
13. Melino S, Rufini S, Sette M, Morero R, Grottesi A, Paci M, Petruzzelli R. Zn²⁺ ions selectively induce antimicrobial salivary peptide histatin-5 to fuse negatively charged vesicles. Identification and characterization of a zinc-binding motif present in the functional domain. *Biochemistry* 1999;38:9626-33.
14. Melino S, Gallo M, Trotta E, Mondello F, Paci M, Petruzzelli R. Metal-binding and nuclease activity of an antimicrobial peptide analogue of the salivary histatin 5. *Biochemistry* 2006;45:15373-83.
15. Cabras T, Patamia M, Melino S, Inzitari R, Messana I, Castagnola M, Petruzzelli R. Pro-oxidant activity of histatin 5 related Cu(II)-model peptide probed by mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;358:277-84.
16. Lau SJ, Kruck TP, Sarkar B. A peptide molecule mimicking the copper (II) transport site of human serum albumin. A comparative study between the synthetic site and albumin. *J Biol Chem* 1974;249:5878-84.
17. Jin Y, Cowan JA. DNA cleavage by copper- atcun complexes. factors influencing cleavage mechanism and linearization of dsDNA. *J Am Chem Soc* 2005;127:8408-15.

ATTIVITÀ ANTIVIRALE DELLE SOSTANZE NATURALI

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

Introduzione

Tra le diverse attività biologiche attribuite alle sostanze naturali, una particolare importanza è rivestita dalle proprietà antimicrobiche e, in particolare, antivirali. Molte di esse, infatti, mostrano la capacità di inibire virus diversi per struttura e strategie replicative. In questo contesto, notevole interesse destano i polifenoli, una vasta famiglia di composti organici, largamente distribuita nel regno vegetale, caratterizzata da un ampio spettro di attività biologiche, tra cui, appunto, quella antivirale (1). Nonostante gli specifici meccanismi di azione restino ancora da chiarire, appare interessante che, in molti casi, il bersaglio non sia limitato a strutture virali, ma si estenda a vie metaboliche della cellula ospite, utilizzate dal virus per la propria replicazione.

Un esempio è costituito dalle catechine contenute nel tè verde, tra cui l'epigallocatechina gallato (EGCG), che mostrano attività antivirale nei confronti di più virus (HIV, virus dell'influenza, adenovirus, virus di Epstein Barr) (2) o dalle teaflavine, presenti nel tè nero, che recentemente hanno mostrato un'azione anti-HIV anche più potente di quella delle catechine, in entrambi i casi dovuta al blocco della fusione dell'*envelope* virale con la membrana cellulare, mediata dalla glicoproteina virale gp41 (3). In generale tutte queste sostanze sono in grado di interagire con strutture virali, ma non è escluso che la loro attività sia correlata anche alla capacità di interferire con funzioni cellulari. L'attività antiinfluenzale della EGCG, infatti, potrebbe essere legata anche al blocco dell'acidificazione dei compartimenti intracellulari, necessaria all'*uncoating* del virus (4).

In generale tutti i farmaci antivirali attualmente in uso riconoscono come bersagli strutture virali specifiche. Ad esempio i farmaci antiinfluenzali, rappresentati dagli adamantani, o inibitori M2, e dagli inibitori della neuroaminidasi (NA), bloccano, rispettivamente, la proteina virale con funzione di canale ionico M2, necessaria all'*uncoating* del virus, e la proteina virale ad attività enzimatica NA, fondamentale per la diffusione dei virioni neoprodotti. Tuttavia l'utilizzo del primo tipo di inibitori è limitato dalla loro tossicità, che si manifesta in particolare a livello del sistema nervoso centrale, e, soprattutto, dalla rapidità con cui inducono l'insorgenza di ceppi resistenti stabili. Questi sono stati riscontrati nel 30% dei pazienti trattati, entro i primi tre giorni di trattamento; sono risultati geneticamente stabili e con una trasmissibilità e patogenicità paragonabili a quelle del *wild type* (5). Negli ultimi anni è stata osservata l'insorgenza di varianti resistenti anche nei confronti dell'inibitore della NA oseltamivir. Nei ceppi H1N1 sono state individuate le mutazioni che conferiscono la resistenza al farmaco; oggi questi mutanti sono diffusi in tutto il globo (6). Più recentemente, in un ceppo H3N2, isolato da un paziente immunocompromesso, è stata individuata una nuova mutazione che conferirebbe la farmaco-resistenza anche in questo sottotipo virale (7).

Pertanto, in questo contesto, si rende necessaria una riconsiderazione della terapia delle infezioni virali, con l'individuazione di nuove strategie terapeutiche che, tenendo conto della fitta rete di interazioni che si stabiliscono tra virus e cellula ospite, potrebbero mirare ad interferire con vie di *signaling* intracellulari implicate sia nella replicazione virale, sia nella risposta infiammatoria. È noto, infatti, che diversi *pathways* intracellulari sono implicati nella

replicazione virale, e che alcuni di essi sono regolati da cambiamenti dello stato redox intracellulare. Uno squilibrio dello stato redox intracellulare è stato ampiamente descritto durante diverse infezioni virali, incluso quella del virus influenzale. È importante sottolineare che lo stato pro-ossidante indotto dal virus può favorire sia la replicazione virale che la patogenesi della malattia indotta dal virus, attraverso diversi meccanismi: attivazione di chinasi e fattori di trascrizione redox-sensibili coinvolti nelle risposte infiammatorie; cooperazione al *fold*ing di glicoproteine virali ricche in legami disolfidici; aumento della permissività cellulare a diversi patogeni. Studi condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che diversi virus inducono uno sbilanciamento dello stato redox intracellulare in senso pro-ossidante mediante deplezione di glutatione (GSH), principale antiossidante intracellulare; tale deplezione varia in intensità, durata e meccanismo di induzione in funzione del tipo di virus e di cellula ospite infettata (8, 9, 10). Inoltre la replicazione virale in diverse popolazioni cellulari dipende dalla diversa concentrazione di GSH intracellulare. Infatti, nelle cellule dove sono presenti basse concentrazioni di GSH la replicazione virale è più elevata rispetto a cellule che contengono elevati livelli di GSH (11).

È noto poi che numerose sostanze antiossidanti sono in grado di inibire la replicazione di diversi virus, sia *in vitro* che *in vivo*. Ad esempio un estratto di *Geranium sanguineum*, ricco in polifenoli, ha mostrato una elevata attività antiinfluenzale, sia *in vitro* che *in vivo*, e l'effetto protettivo è stato correlato alle sue proprietà antiossidanti e di *radical scavenger* (12).

Studi condotti nei nostri laboratori hanno dimostrato che il resveratrolo, un polifenolo presente in numerosi frutti, dalle note proprietà antiossidanti, inibisce *in vitro* e in un modello sperimentale *in vivo* la replicazione del virus influenzale (Figura1) (13).

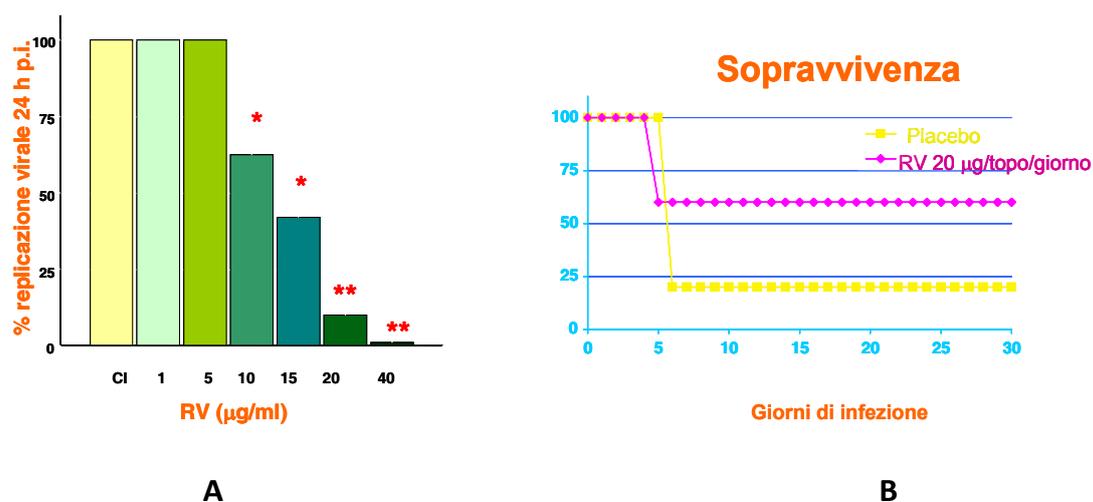


Figura 1. Effetto del resveratrolo (RV) sulla replicazione del virus influenzale A/Puerto Rico/8/34 H1N1 (PR8) *in vitro* (A) e *in vivo* (B)

A) Concentrazioni differenti di RV sono state aggiunte al terreno di coltura di cellule MDCK dopo l'infezione con PR8 (0,2 m.o.i.). Il titolo virale è stato valutato 24h p.i. mediante il test dell'emoagglutinazione (HAU/mL) ed espresso come percentuale rispetto al controllo (CI), rappresentato da cellule infettate e trattate con lo 0,02% di dimetilsolfossido (DMSO, la concentrazione presente nel terreno di coltura contenente la dose più alta di RV). I dati rappresentano la media \pm SD di 4 esperimenti, ciascuno condotto in duplicato. * $P=$.002; ** $P<$.0001 vs cellule CI. B) Topi BALB/c sono stati infettati con PR8 per via intranasale ed RV o placebo

(DMSO diluito in PBS alla stessa concentrazione presente nelle iniezioni di RV) sono stati somministrati intraperitonealmente 1h dopo l'inoculo del virus e giornalmente per i 7 giorni successivi. I risultati sono stati espressi come percentuale di sopravvivenza, valutata giornalmente per 30 giorni. Il trattamento con il resveratrolo inibisce l'espressione delle proteine tardive del virus (HA e M1) a livello post-trascrizionale e l'esporto nucleare dei complessi ribonucleoproteici (Figura 2). In questo caso, però, gli effetti non sembrano dovuti all'attività antiossidante GSH-mediata del prodotto, quanto piuttosto all'inibizione della protein chinasi C e di alcune vie da essa dipendenti, quali p38MAPK e JNK (Figura 3). Tali vie chinasiche, attivate specificamente dal virus, sono implicate nella regolazione del traffico nucleo-citoplasmatico della nucleoproteina virale, così come nell'innescò della risposta infiammatoria (14).

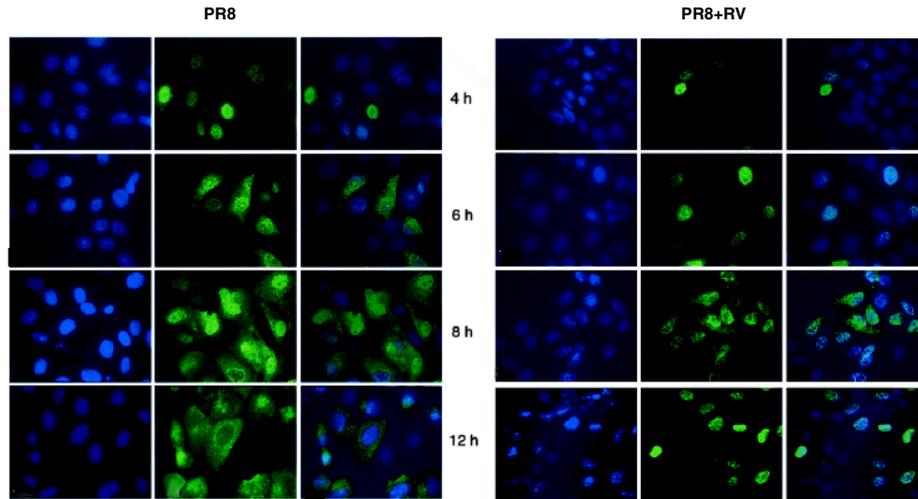


Figura 2. Localizzazione intracellulare della nucleoproteina (NP) in cellule trattate e non con resveratrolo a tempi differenti dopo l'infezione

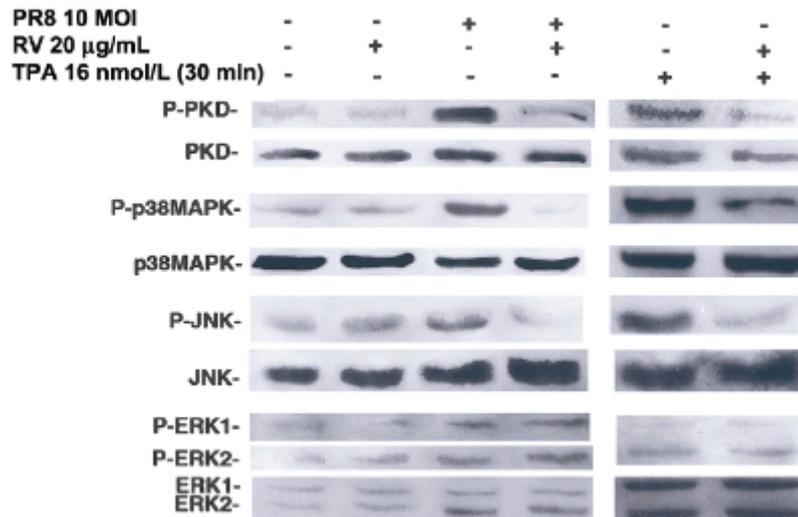


Figura 3. Effetto del resveratrolo sulla via della protein chinasi C

Le cellule sono state infettate con PR8 a 10 m.o.i. per permettere un ciclo singolo di replicazione (valutato a 4-12h p.i.) e trattate con RV (20 µg/mL). Le cellule sono state fissate con metanolo/acetone (1:2), permeabilizzate con Triton X 0,1%, incubate con l'anticorpo monoclonale anti-NP (verde) e osservate al microscopio a fluorescenza. I nuclei sono stati colorati con il DAPI (blu).

Cellule NCI-H292 sono state infettate con PR8 (10 m.o.i.), trattate con RV (20 µg/mL) per 8 ore p.i. e lisate. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE 10%, trasferite su membrana di nitrocellulosa e incubate con gli anticorpi anti-P-PKD, anti-P-p38MAPK, anti-P-JNK, anti-P-ERK1/2. Successivamente le stesse membrane sono state incubate con gli anticorpi anti-PKD, anti-p38MAPK, anti-JNK, anti-ERK1/2, che riconoscono la forma totale di queste proteine. Come controllo dell'attività chinasi, in esperimenti separati, cellule NCI-H292 non infettate sono state trattate con RV (20 µg/mL) per 1 ora e quindi stimulate con TPA (16 nmol/L) per 30 minuti. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante *Western blotting* con gli stessi anticorpi indicati sopra.

La "duplicità di azione" di alcune sostanze naturali capaci di bloccare sia strutture virali, sia funzioni cellulari necessarie alla replicazione del virus, potrebbe offrire numerosi vantaggi per strategie antivirali innovative. Infatti la possibilità di agire contemporaneamente su più target potrebbe consentire di aumentare in modo importante l'efficacia e lo spettro d'azione delle molecole e di ridurre la probabilità di insorgenza di ceppi virali resistenti. Inoltre l'inibizione di vie di *signaling* intracellulari attivate dal virus potrebbe consentire anche di ottenere una interessante azione antinfiammatoria. Ricerche volte a caratterizzare l'attività antivirale delle sostanze naturali e a chiarirne il meccanismo d'azione potranno consentire in futuro di proporre l'uso di alcune di queste sostanze in associazione ai farmaci antivirali noti.

Bibliografia

1. Saladino R, Gualandi G, Farina A, Crestini C, Nencioni L, Palamara AT Advances and challenges in the synthesis of highly oxidised natural phenols with antiviral, antioxidant and cytotoxic activities. *Curr Med Chem*. 2008;15(15):1500-19.
2. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):673-751.
3. Liu S, Lu H, Zhao Q, He Y, Niu J, Debnath AK, Wu S, Jiang S. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochim Biophys Acta* 2005;1723:270-81.
4. Imanishi N., Tuji Y., Katada Y., Maruhashi M., Konosu S, Mantani N., Terasawa K., Ochiai H. Additional inhibitory effect of tea extract on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Microbiol Immunol*. 2002;46(7):491-4.
5. Moscona A. Medical management of influenza infection. *Annu Rev Med* 2008;59:397-413.
6. Moscona A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med* 2009;360(10):953-6.
7. Abed Y, Baz M, Boivin G. A novel neuraminidase deletion mutation conferring resistance to oseltamivir in clinical influenza A/H3N2 virus. *J Infect Dis* 2009;199:180-3.
8. Ciriolo MR, Palamara AT, Incerpi S, Lafavia E, Buè MC, De Vito P, Garaci E, Rotilio G. Loss of GSH, oxidative stress and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. *J Biol Chem* 1997;272:2700-8.
9. Palamara AT, Perno CF, Ciriolo MR, Dini L, Balestra E, D'Agostini C, Di Francesco P, Favalli C, Rotilio G, Garaci E. Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *Antiviral Res* 1995;27:237-53.

10. Garaci E, Palamara AT, Ciriolo MR, D'Agostini C, Abdel-Latif MS, Aquaro S, Lafavia E, Rotilio G. Intracellular GSH content and HIV replication in human macrophages. *J Leukoc Biol* 1997;62:54-9.
11. Nencioni L, Iuvara A, Aquilano K, Ciriolo MR, Cozzolino F, Rotilio G, Garaci E, Palamara AT. A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. *FASEB J* 2003;17(6):758-60.
12. Sokmen M, Angelova M, Krumova E, Pashova S, Ivancheva S, Sokmen A, Serkedjieva J *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sci* 2005;76:2981-93.
13. Palamara AT, Nencioni L, Aquilano K, De Chiara G, Hernandez L, Cozzolino F, Ciriolo MR, Garaci E Inhibition of Influenza A virus replication by resveratrol. *J Infect Dis* 2005;191(10):1719-29.
14. Nencioni L, De Chiara G, Sgarbanti R, Amatore D, Aquilano K, Marcocci ME, Serafino A, Torcia M, Cozzolino F, Ciriolo MR, Garaci E., Palamara AT. Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus: impact on virally induced apoptosis and viral replication. *J Biol Chem* 2009;284(23):16004-15.

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

Francesca Mondello, Antonietta Girolamo, Antonio Cassone
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

A causa della scarsità di nuovi antibiotici e vaccini, nonché per la resistenza di molti batteri ai comuni antibiotici, le malattie infettive costituiscono ancora un grosso problema in medicina e una continua sfida terapeutica. Per queste ragioni, nell'ultimo ventennio si è verificato un notevole interesse per l'uso terapeutico di sostanze naturali in alcune patologie infettive, incluse quelle fungine di particolare rilievo nell'ospite immunocompromesso.

Recentemente la letteratura scientifica ha evidenziato, tra le sostanze naturali, gli oli essenziali (OE; complesse misture di sostanze vegetali volatili) sia per l'ampio spettro di attività biologiche presentato, sia per la loro biodisponibilità e la loro esigua tossicità. Attualmente un grande numero di OE e i loro costituenti sono stati ben caratterizzati *in vitro* per la loro attività nei confronti di lieviti, di dermatofiti e di altri funghi filamentosi. Tuttavia 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. In questa breve rassegna verranno prevalentemente analizzati e discussi:

- 1) i differenti aspetti e le recenti ricerche sui criteri di qualità degli OE e sull'attività antifungina di quest'ultimi, e dei principali componenti, nei riguardi di funghi patogeni umani;
- 2) i principali meccanismi di azione antifungina;
- 3) gli studi preclinici ;
- 4) l'eventuale efficacia clinica;
- 5) le future prospettive di tali sostanze come possibile alternativa e/o integrazione per la prevenzione e risoluzione delle micosi.

Composizione chimica e attività antimicrobica degli OE

Gli OE sono complesse miscele di sostanze organiche, costituite prevalentemente da terpeni (idrocarburi aromatici polimeri di isoprene) estratte da piante aromatiche mediante distillazione in corrente di vapore o spremitura, oleose, infiammabili, volatili a temperatura ambiente.

La qualità degli OE è garantita da alcuni criteri fondamentali, quali la conoscenza della specie botanica esatta, del chemiotipo (indicante i componenti che conferiscono un'azione terapeutica), della parte della pianta usata e del gascromatogramma. Quest'ultimo rappresenta "l'impronta digitale" dell'OE ed è fondamentale per valutare le caratteristiche chimiche di un OE in riferimento al lotto che si intende utilizzare, sia per i test microbiologici che per la terapia dei pazienti. Si evince che esiste un'enorme variabilità da lotto a lotto e purtroppo solo alcuni fitocomplessi sono regolati da norme internazionali o farmacopee, come ad esempio il *tea tree*

oil, olio essenziale di *Melaleuca alternifolia*, (TTO) con l'International Standard for "Oil of *Melaleuca-terpinen-4-ol type*," che stabilisce le quantità minime e/o massime per 14 componenti dell'olio (Tabella 1) (1, 2).

Tabella 1. Composizione dell'olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (tea tree-TTO), chemiotipo terpinen-4-olo

Componenti	Composizione (%)	
	EU.PH.4°Ed. ISO 4730 * Range	Composizione tipica**
1,8-cineolo	≤15,0	5,1
alfa-terpinene	5,0-13,0	10,4
gamma-terpinene	10,0-28,0	23,0
p-cimene	0,5-12,0	2,9
terpinen-4-olo	≥ 30,0	40,1
alfa-terpineolo	1,5-8,0	2,4
alfa-pinene	1,0-6,0	2,6
terpinolene	1,5-5,0	3,1
aromadendrene	tracce-7,0	1,5
delta-cadinene	tracce-8,0	1,3
limonene	0,5-4,0	1,0
sabinene	tracce-3,5	0,2
globulolo	tracce-3,0	0,2
viridoflorolo	tracce-1,5	0,1

(*) EU.PH.4°Ed, *European Pharmacopoeia, Fourth edition* (2002); ISO 4730, International Organization for Standardization standard no. 4730. (**) da Brophy, J. J., N. W. Davies, I. A. Southwell, I. A. Stiff, and L. R. Williams. 1989. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol type* (Australian tea tree). *J. Agric. Food Chem.* 37:1330–1335. Tradotto e adattato da Carson C F, Hammer K A, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 50-62, 2006.

La letteratura chiaramente evidenzia l'ampio spettro di attività antifungine e antinfiammatorie degli OE. Tuttavia solo recentemente un grande numero di OE e loro costituenti sono stati ben caratterizzati *in vitro* per le loro proprietà antifungine, anche se ancora la comparazione dei dati rimane spesso problematica a causa delle varie tipologie di metodologie usate. I dati disponibili mostrano che una vasta gamma di lieviti, dermatofiti e altri funghi filamentosi sono sensibili agli OE e ai loro costituenti principali, sotto forma sia liquida che gassosa. L'attività antimicrobica varia da un microrganismo all'altro e da un OE all'altro, ma è sempre dose dipendente. Inoltre è strettamente connessa alla composizione chimica e alla concentrazione dei loro costituenti, che non dipendono solo dalla specie, ma anche da altri fattori come la provenienza della pianta, la parte della pianta usata, lo stadio di sviluppo della pianta, le condizioni di crescita (temperatura, terreno, fertilizzanti), la distillazione e le condizioni di conservazione.

Bisogna anche considerare nel valutare l'attività antimicrobica che gli OE hanno un basso indice terapeutico (potenza microbica direttamente proporzionale alla tossicità, ovvero il rapporto tra la dose terapeutica e quella tossica) e ciò significa che è necessario avere un'olio con una minima concentrazione inibente (MIC) ottimale più bassa possibile per evitare effetti collaterali (3, 4). Per valutare l'attività antimicrobica degli OE *in vitro* in genere vengono utilizzati i metodi convenzionali utilizzati per testare gli antibiotici che dovrebbero avere tutte le caratteristiche di standardizzazione, ripetibilità e qualità del risultato richieste dagli organismi internazionali di controllo, quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e il *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Tabelle 2 e 3).

Tabella 2. Esempi selezionati di oli essenziali con attività antifungina

Oli essenziali	Componenti e/o derivati	Funghi	Metodo	Range di MIC <i>in vitro</i>	Referenze
<i>Lavandula angustifolia</i>	Linalolo Linalyl acetate	<i>Candida albicans</i>	microdiluzione CLSI M27-A2	0,09-1,04%	D'Auria FD <i>Med Mycol</i> 2005
<i>Citrus bergamia</i> (bergamotto)	Furocumarina e estratti distillati	<i>Trichophyton</i>	microdiluzione CLSI M38-A	0,156-2,5%	Sanguinetti M <i>JAC</i> 2007
		<i>Microsporum</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Candida</i>	microdiluzione CLSI M27-A2	1,25-10%	Sanguinetti M <i>JAC</i> 2005
<i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree)	Terpinen-4-olo	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i>	microdiluzione CLSI M27-A2	0,03-0,5%	Mondello F <i>JAC</i> 2003 Mondello F <i>BMC Infec Dis</i> 2006
Timo rosso, finocchio, chiodi di garofano, pino, melissa, lavanda		<i>Dermatophytes</i> <i>Dematiaceous</i>	microdiluzione CLSI M38-A	0,0078->1%	Tullio V <i>J Appl Microb</i> 2006
			contatto con vapore (microatmosfera)		
<i>Salvia officinalis</i>		<i>Dermatophytes</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> <i>Candida</i>	microdiluzione CLSI M38-A	0,63->10 µL/mL	Pinto E <i>Industrial Crops and Products Intern J</i> 2007
			microdiluzione CLSI M27-A2	1,25-10 µL/mL	
<i>Thymus pulegioides</i>	Timolo, Carvacrolo, P-cymene, Gamma-terpinene	<i>Dermatophytes</i> <i>Aspergillus</i> <i>Candida</i>	microdiluzione CLSI M38-A	0,08->20 µL/mL	Pinto E <i>J Med Microbiol</i> 2006
			microdiluzione CLSI M27-A2	0,08->20 µL/mL	
<i>Mentha suaveolens</i>	Piperitenone oxide Piperitone oxide	<i>Dermatophytes</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Candida</i>	microdiluzione CLSI M27-A3	0,39 mg/mL	Pietrella D <i>et al.</i> <i>BMC Complem Altern Med</i> 2011

Le specifiche proprietà degli OE (volatilità, insolubilità, viscosità) richiedono però delle modificazioni dei suddetti metodi, perché si potrebbe avere una distribuzione non omogenea dell'olio anche utilizzando un appropriato solubilizzante che deve essere inerte nei confronti del microrganismo testato. Inoltre bisogna considerare che tali complesse miscele di sostanze volatili potrebbero evaporare o decomporsi durante una lunga incubazione, che dovrebbe quindi essere monitorata in tal senso. Altri fattori importanti che possono influenzare la valutazione dell'attività antimicrobica degli OE sono anche: l'inoculo, il terreno di coltura, la temperatura, le condizioni di crescita in aerobiosi o anaerobiosi, il tipo di solubilizzante (tween, DMSO, etanolo, agar), l'uso di sigillanti.

Sono stati utilizzati anche metodi non convenzionali per la valutazione *in vitro* dell'attività antimicrobica degli OE quali il metodo della microatmosfera (test per valutare l'attività di OE in fase di vapore), la turbidimetria (test per misurare i cambiamenti della densità ottica della coltura durante la curva di crescita con *multiscan photometer*, anche se la torbidità dell'emulsione olio-acqua può interferire con la lettura dell'*end point*), la bioimpedenza (test veloce, ripetibile, effettuabile per molti campioni, che si basa sulla

correlazione fra i parametri elettrici alterati dalla coltura in crescita, strettamente collegati all'attività metabolica del microrganismo testato, e il numero di cellule, espresso come CFU/mL).

Molta letteratura mostra che una vasta gamma di lieviti, dermatofiti e altri funghi filamentosi sono sensibili al TTO, sebbene i test differiscano, le minime concentrazioni inibenti (MIC) generalmente sono tra 0,03 e 0,5% e le minime concentrazioni fungicide (MFC) generalmente da 0,12 a 2% (5). L'eccezione è costituita da *Aspergillus niger* con MFC 8%. Tuttavia questi saggi sono effettuati con i conidi fungini di cui è nota la relativa impervietà agli agenti chimici; i conidi germinati sono più sensibili al TTO (Tabella 4).

Tabella 3. Suscettibilità *in vitro* per varie specie fungine testate con diversi oli essenziali (OE) e con i loro componenti principali

Funghi	OE e/o componenti testati con metodo di diluizione (MIC <i>in vitro</i>)	OE e/o componenti testati con metodo di diffusione
<i>Aspergillus flavus</i>	Carota 2000, timolo 250, cinnamaldeide 200, geraniolo, nerolo, citronellolo 500 ppm, tea tree 0,5%, <i>Artemisia nilagirica</i> 500 ppm	Alloro, cannella, chiodi di garofano eucalipto
<i>A. fumigatus</i>	Carota 2000 ppm, timolo 125 (µg/mL) <i>Artemisia nilagirica</i> 250 ppm	<i>Piper betle</i> , palmarosa, citronella, menta piperita
<i>A. niger</i>	Eucalipto 0,4%, tanacetolo, elecampane 4000 ppm, tea tree 0,4%, <i>Origanum syriacum</i> 0,1%	Alloro, geranio, origano, timo
<i>A. parasiticus</i>	Timo 0,4, cumino 0,6, chiodi di garofano 0,6, rosmarino 2,0 mg/mL	Tea tree
<i>Candida albicans</i>	Achillea 2500 µg/mL, elecampane 2000 ppm, chiodi di garofano 3,4-9 mg/mL, 0,4% eucalipto, pino 2,5-29 mg/mL, linalolo, terpineolo 0,25%, camazulene 500 µg/mL, polyacetylenes 0,5 mg/mL, <i>Artemisia asiatica</i> 2 µL/mL, <i>Ocimum gratissimum</i> 350 µg/g, timolo 50 µg/g, tea tree 0,2%, timo 5 mg/mL, cannella, cinnamaldeide, carvacrolo 1 mg/mL, <i>Zieria</i> sp. 0,2%, Manuka 0,31%, issopo 0,3%, Aniba canelilla 170 µg/mL, 0,5 mg/mL	<i>Artemisia</i> , rosmarino, chiodi di garofano, coriandolo, cannella, maggiorana, salvia, achillea, pino
<i>Candida spp.</i>	<i>Aniba canelilla</i> 360 µg/mL, cumino nero 2,5, prezzemolo 12,5 mg/mL, cardamomo 1.600 µg/mL, origano, maggiorana 5 ppm	<i>Vicia indica</i> , <i>Murraya exotica</i> , alloro, <i>Myrtus communis</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cannella, palmarosa, chiodi di garofano, origano, timo 200, timolo, carvacrolo 50 µL/L, <i>Ocimum gratissimum</i> 300 µg/mL, timolo 50 µg/g	<i>Artemisia</i> , citronella, menta piperita, <i>Piper angustifolium</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Eucalipto 0,4%, polyacetylenes 0,125 mg/mL, cannella 200, chiodi di garofano 400, geranio, cipresso 600 ppm, anetolo 200 µg/mL	Rosmarino, chiodi di garofano, coriandolo, cannella, maggiorana, salvia, pino

Tradotto e adattato da Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 10(10):813-29, 2003.

Tabella 4. Suscettibilità *in vitro* per varie specie fungine testate con olio essenziale di *Melaleuca alternifolia*

Specie fungine	% (vol/vol)	
	MIC(*)	MFC(*)
<i>Alternaria spp.</i>	0,016-0,12	0,06-2
<i>Aspergillus flavus</i>	0,31-0,7	2-4
<i>A. fumigatus</i>	0,06->2	1-2
<i>A. niger</i>	0,016-0,4	2-8
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	0,25	/
<i>Candida albicans</i>	0,06-8	0,12-1
<i>C. glabrata</i>	0,03-8	0,12-0,5
<i>C. parapsilosis</i>	0,03-0,5	0,12-0,5
<i>C. tropicalis</i>	0,12-2,0	0,25-0,5
<i>Cladosporium spp.</i>	0,008-0,12	0,12-4
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,015-0,06	/
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,008-0,7	0,12-0,25
<i>Fusarium spp.</i>	0,008-0,25	0,25-2
<i>Malassezia furfur</i>	0,03-0,12	0,5-1,0
<i>M. sympodialis</i>	0,016-0,12	0,06-0,12
<i>Microsporum canis</i>	0,03-0,5	0,25-0,5
<i>M. gypseum</i>	0,016-0,25	0,25-0,5
<i>Penicillium spp.</i>	0,03-0,06	0,5-2
<i>Rhodotorula rubra</i>	0,06	0,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,25	0,5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,11-0,44	0,25-0,5
<i>T. rubrum</i>	0,03-0,6	0,25-1
<i>T. tonsurans</i>	0,004-0,016	0,12-0,5
<i>Trichosporon spp.</i>	0,12-0,22	0,12

(*) range ottenuti da varie referenze

Tradotto e adattato da Carson C F, Hammer K A, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 50-62, 2006.

Meccanismo di azione antifungina degli OE

Il meccanismo di azione degli OE nei riguardi dei microrganismi è complesso e ancora non è stato ben chiarito perché dipende da vari fattori: dal tipo di potenza antimicrobica dei vari OE, che dipende dalla loro composizione chimica e quindi dalle loro caratteristiche prevalentemente idrofile o lipofile; dal tipo di microrganismi ed è principalmente collegato alla struttura della loro parete cellulare.

L'azione degli OE verso i batteri Gram-positivi e funghi sembra essere simile. Segni visibili della loro azione contro i lieviti, i dermatofiti e altri funghi filamentosi possono essere osservati con cambiamenti morfologici e funzionali micro e macroscopici.

La maggior parte degli studi sul meccanismo di azione antifungina degli OE sono stati condotti su *Candida albicans*, il maggiore patogeno fungino umano. Gli OE sembrano agire prevalentemente con cambiamenti strutturali e funzionali delle membrane fungine, portando alla dispersione del citoplasma e alla morte cellulare. Si assiste quindi ad un blocco della sintesi delle membrane, inibizione della germinazione, riproduzione e respirazione cellulare. Gli studi principali si sono focalizzati molto sul meccanismo di azione del TTO, dimostrando l'alterazione della permeabilità delle cellule dei lieviti (Tabella 5).

Tabella 5. Meccanismo di azione antifungina di alcuni oli essenziali

Oli essenziali e componenti	Concentrazione	Microrganismi target	Meccanismo d'azione	Referenze
<i>Tea tree</i>	0,25%	<i>Candida albicans</i> <i>C. glabrata</i>	Permeabilizzazione e lisi?	Cox <i>et al. Molecules</i> 2001;6:87-91 Hammer KA <i>et al. JAC</i> 2004;53:1081-5
<i>Tea tree</i>	1,0%	<i>C. albicans</i>	Inibisce la respirazione in modo dose dipendente	Cox <i>et al. J Appl Microbiol</i> 88;170-5:2001
<i>Tea tree</i>	0,25%	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inibisce l'acidificazione del terreno ATPasi Altera mitocondri e membrana plasmatica	Hammer KA <i>et al. JAC</i> 2004;53:1081-5
<i>Tea tree</i>	0,25% 0,125%	<i>C. albicans</i>	Morfogenesi inibita Gemmazione multipla	Hammer KA <i>et al. Med Mycol</i> 2000;38:355-62
<i>Tea tree</i>	1,0%	<i>C. albicans</i>	Modificazioni della membrana plasmatica e nucleare	Stringaro A <i>et al.</i> (dati non pubblicati)
Origanum Chiodi di garofano carvacrolo eugenolo		<i>C. albicans</i>	Danni alla parete	Chami N. <i>et al. Oral Microbiol Immunol</i> 2005;20:106-11
<i>Thymus pulegioides</i>	0,64µL/mL	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus dermatofite</i> sp	Distrugge la struttura della membrana cellulare Riduzione del contenuto in ergosterolo	Pinto <i>et al. J Med Microbiol.</i> 2006;55:1367-73
<i>Origanum compactum</i> <i>Eugenia caryophyllata</i>	0,2%	<i>S. cerevisiae</i>	Alterazione della forma cellulare e fratture superficiali	Chami F. <i>et al. Phytoter Res</i> 2005;19:405-08

Studi preclinici con gli OE

Gli studi preclinici costituiscono un valido supporto sperimentale per studi di sicurezza d'uso e di efficacia degli OE nelle micosi umane e rappresentano un contributo preliminare per lo sviluppo di una nuova generazione di agenti antifungini naturali a scopo terapeutico e preventivo. Nella Tabella 6 si mette in evidenza che il carvacrolo, il maggiore componente fenolico dell'OE di timo e di origano e l'eugenolo, il maggiore componente fenolico dell'OE di garofano sono stati usati in un modello sperimentale di vaginite e di candidosi orale nella ratta, confermandone l'efficacia (6-8). L'applicazione vaginale di olio di geranio e il suo componente principale geraniolo sopprime la crescita di *C.albicans* e l'infiammazione locale nella candidosi sperimentale murina (9).

L'efficacia *in vivo* dell'OE di timo e di perilla tramite contatto con vapore degli OE è stato dimostrato in *tinea pedis* sperimentale in cavie infettate con *Trichophyton mentagrophytes*, dimostrando una potente azione anti-*Trichophyton* tramite contatto con solo vapore (10).

L'elevata attività antifungina di TTO e di terpinen-4-olo viene dimostrata per la prima volta, in un modello di infezione sperimentale di *C. albicans* nella ratte, modello molto predittivo della terapia della vaginite da *Candida* nelle donne, anche con l'uso di un ceppo fluconazolo (FCZ) e itraconazolo (ITR) resistente. Tre dosi *post-challenge* di TTO al 5% v/v e di terpinene-4-olo all'1% v/v sono risultate altamente significative nel risolvere efficacemente l'infezione vaginale con *C. albicans* resistente a FCZ, nelle ratte infettate sperimentalmente. Tuttavia TTO 5% v/v risulta più attivo del terpinene-4-olo 1% v/v nel risolvere l'infezione causata da *C. albicans* farmaco-resistenti (11-13).

Tabella 6. Studi preclinici con esempi selezionati di oli essenziali antifungini

Oli essenziali (componenti)	Microrganismi target	Modello animale	Comparatore	Referenze
Timo Perilla	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Tinea pedis</i> in cavie		Inouye S. <i>et al.</i> <i>Mycoses</i> 2001;44:99-107
Tea tree Terpinen-4-olo	<i>C. albicans</i>	Vaginite nelle ratte	fluconazolo	Mondello F. <i>et al.</i> <i>J Antimicrob Chemoter</i> 51(5):1223-9,2003 Mondello F. <i>et al.</i> <i>BMC Infect Dis</i> 2006;6:158
<i>Origanum</i> Chiodi di garofano carvacrolo eugenolo	<i>C. albicans</i>	Candidosi orale nelle ratte immuno-depresse	nistatina	Chami F. <i>et al.</i> <i>Braz J Infec Dis</i> 2004;8:217-26 Chami F. <i>et al.</i> <i>Oral Microbiol Immunol</i> 2005;20:106-11
<i>Origanum</i> Chiodi di garofano carvacrolo eugenolo	<i>C. albicans</i>	Vaginite nelle ratte immuno-depresse	nistatina	Chami F. <i>et al.</i> <i>J Antimicrob Chemoter</i> 2004;54(5):909-14
<i>Pelargonium</i> geraniolo	<i>C. albicans</i>	Vaginite nei topi immuno-depressi	clotrimazolo	Mayurama N. <i>et al.</i> <i>Biol Pharm Bull</i> 2008;31(8):1501-6
<i>Mentha suaveolens</i>	<i>C. albicans</i>	Vaginite nei topi	tea tree oil	Pietrella D. <i>et al.</i> <i>BMC Complement Altern Med</i> 2011;11(1):18

Studi clinici

Nei pochi casi in cui sono stati effettuati studi clinici i dati sono promettenti, ma non ancora esaustivi (Tabella 7). Molti studi clinici effettuati per convalidare l'efficacia clinica degli OE non sono stati considerati scientificamente validi dagli standard oggi in uso, perché in molti casi non sono stati condotti in condizioni controllate (14). Sebbene alcuni di questi dati clinici

indichino che molti OE possano essere efficaci come agenti terapeutici sono necessari rigorosi studi di conferma. Fattori come la concentrazione finale ottimale dell'olio, la formulazione del prodotto, la durata e la frequenza del trattamento, eventuali effetti avversi possono influenzare l'efficacia farmacologica e devono essere considerati in futuri studi clinici. Quest'ultimi dovranno considerare e studiare anche in modo molto stringente gli eventuali effetti tossici. Il costo-efficacia del potenziale trattamento terapeutico con gli OE dovrà essere considerato.

Tabella 7. Alcuni esempi selezionati di studi clinici con tea tree oil (TTO)

Studio popolazione	Tipo di studio	Terapia gruppo pazienti	Trattamento somministrato	Risultati	Effetti avversi
117 pazienti con coltura positiva per onicomicosi	RCT*, Doppio cieco	TTO 100%, 1% clotrimazolo	2 volte al di per 6 mesi	Completa o parziale risoluzione per il 60% per il gruppo TTO e 61% per il gruppo clotrimazolo non significativo	7,8% TTO, 5,7% clotrimazolo
60 pazienti con diagnosi clinica per onicomicosi	RCT doppio cieco	TTO 5% crema, butenafine 2%+ TTO 5% crema	3 volte al di per 8 settimane	Guarigione in 80% del gruppo butenafine/TTO and 0% nel gruppo TTO P<0,0001	10% butenafine/ gruppo TTO
13 pazienti con AIDS+candidosi orale resistente al fluconazolo	Serie di casi	soluzione orale TTO	4 volte al di per 2-4 settimane	Risposta clinica 67% dopo 4 settimane	nessuno
27 pazienti con AIDS+candidosi orale resistente al fluconazolo	Studio aperto	soluzione orale TTO + soluzione orale TTO priva di alcool	4 volte al di per 2-4 settimane	Risposta clinica e micologica in 58% (soluzione con alcool) e 54% (soluzione priva di alcool)	66,7% (sol con alcool) 15,4% (sol priva di alcool)
121 pazienti con diagnosi clinica per <i>tinea pedis</i>	RCT, doppio cieco	TTO 10% in sorbolene, tolnaftato 1%, placebo (sorbolene)	2 volte al di per 4 settimane	Miglioramento micologico e clinico in 46% gruppo tolnaftato, 22% gruppo TTO, 9% gruppo placebo non significativo	nessuno
137 pazienti con coltura positiva per <i>tinea pedis</i>	RCT doppio cieco	TTO 25%, TTO 50%, placebo	2 volte al di per 4 settimane	Cura efficace in 48% gruppo (TTO 25%), 50% gruppo (TTO 50%), 13% gruppo placebo. P<0,0005	2,8% in gruppo TTO 25%, 7,9% in gruppo TTO 50%
126 pazienti con forfora da blanda a moderata	RCT	TTO 5% shampoo, placebo shampoo	1 volta al di per 4 settimane	41,2% in gruppo TTO 5%, 11,2% in gruppo placebo. P<0,001	5% in gruppo TTO 13% in gruppo placebo

* RCT= studio controllato randomizzato

Conclusioni e future prospettive

Gli oli essenziali potrebbero costituire una possibile integrazione e, in alcuni casi estremi, un'alternativa all'antibiotico-terapia, in particolare nei casi refrattari alla terapia convenzionale (es. vaginite ricorrente). Infatti tali misture, oltre a dimostrare una notevole attività antimicrobica, possiedono proprietà biologiche e terapeutiche multifunzionali (antinfiammatorie, immunomodulanti, ecc.). I dati sperimentali in letteratura danno un sostanziale supporto a precedenti evidenze empiriche sull'efficacia antifungina *in vitro* degli oli essenziali, anche nei confronti di specie fungine farmaco-resistenti e confermano anche che i principali componenti degli OE generalmente rappresentano il prodotto attivo della miscela. Gli studi preclinici dimostrano l'elevata attività antifungina degli OE verso *C. albicans* in modelli di infezione orale e vaginale sperimentale nella ratta e di infezione sistemica murina, anche con l'uso di ceppi fungini resistenti. Tali indagini costituiscono un valido supporto sperimentale preclinico per studi di sicurezza d'uso e di efficacia. Manca tuttavia una serie di studi clinici controllati, in particolare in doppio cieco e randomizzati, che possano fornire una base di certezza dell'efficacia clinica.

Problemi ulteriori da affrontare per l'uso clinico sono senz'altro la necessità di standardizzazione dei metodi di estrazione, dei criteri di qualità dell'OE testato e delle metodiche *in vitro*, in modo che la ricerca possa essere più sistematica e l'interpretazione dei risultati più facilitata. Si richiedono inoltre ulteriori conferme scientifiche (studi pre-clinici, clinici e farmacocinetici) delle evidenze empiriche terapeutiche provenienti dalla tradizione clinica. Inoltre studi sul sinergismo con farmaci come amfotericina B, fluconazolo e altri antimicotici potrebbero essere utili per migliorare l'indice terapeutico dei farmaci antifungini, attualmente abbastanza tossici per l'ospite alle dosi impiegate e per trattamenti ripetuti.

Bibliografia

1. ISO 4730. *Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (tea tree oil)*. Geneva International Organization for Standardization; 2004.
2. Strasbourg: Council of Europe. *European Pharmacopoeia*, 4th edn, 2002.
3. Camporese A, Oli essenziali e malattie infettive. Terapia antimicrobica ragionata con gli oli essenziali, *Tecniche Nuove*, 1998.
4. Centro Clinico di Medicina Naturale. Disponibile all'indirizzo: www.usl11.toscana.it/fito_idx_it.php ; ultima consultazione 06/10/2011.
5. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19: 50-62.
6. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Nov;54(5):909-14.
7. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis*. 2004; 8(3):217-26.
8. Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20(2):106-11.
9. Maruyama N, Takizawa T, Ishibashi H, Hisajima T, Inouye S, Yamaguchi H, Abe S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31(8):1501-6.

10. Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. *In-vitro* and *in-vivo* anti-Trichophyton activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses*. 2001; 44(3-4):99-107.
11. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts *Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1223-9.
12. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;6:158.
13. De Bernardis F, Lorenzini R, Cassone A. Rat model of *Candida* vaginal infection. In: . O Zak Merle, A.Sande (Ed) *Handbook of Animal Model of Infection*. Academic press; 1999.
14. Martin KW, Ernst E. Herbal medicines for treatment of fungal infections: a systematic review of controlled clinical trials. *Mycoses* 2004;47(3-4):87-92.

MECCANISMO DI AZIONE E PROPRIETÀ TERAPEUTICHE DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MELALEUCA ALTERNIFOLIA* SU CEPPI FARMACOSENSIBILI E FARMACORESISTENTI DI *CANDIDA ALBICANS*

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", Sapienza Università di Roma

Introduzione

Le malattie infettive sono causate da microrganismi che interagiscono in modo complesso con l'ospite. La scoperta degli antibiotici e il loro impiego sono risultati molto efficaci nel trattamento delle infezioni batteriche e fungine, ma il loro uso indiscriminato ha purtroppo causato lo sviluppo di ceppi patogeni resistenti.

Infatti, negli ultimi anni le terapie anticancro (chemio e radio-terapia) e l'AIDS hanno pesantemente contribuito all'aggravarsi dell'immunocompromissione dei pazienti che vivono a lungo in questo stato. Difatti, in questi pazienti sono ricorrenti le infezioni fungine localizzate e sistemiche e per prevenire l'evolversi di tali patologie viene incrementato l'uso di farmaci antimicotici anche per la profilassi. Purtroppo, con l'uso eccessivo di questi farmaci si è registrato anche un significativo incremento dei fenomeni di resistenza agli antimicotici (1). Storicamente la resistenza clinica è stata definita come persistenza o progressione di un'infezione nonostante la terapia antimicrobica appropriata. Una successiva risposta clinica alla terapia antimicrobica, tipicamente, non solo dipende dalla suscettibilità dell'organismo patogeno, ma molto dal suo sistema immunitario, dalla penetrazione e distribuzione del farmaco e da complicanze nel paziente. La resistenza *in vitro* di un isolato può essere descritta come primaria o secondaria. Un organismo che risulta resistente ad un farmaco prima dell'esposizione presenta resistenza primaria intrinseca. La resistenza secondaria si sviluppa in risposta all'esposizione ad agenti antimicotici (2). Una correlazione di suscettibilità rivelata *in vitro* con quella riscontrata *in vivo*, è stata osservata per infezioni mucosali di *Candida* in pazienti HIV positivi (3).

Candida albicans (*C. albicans*) è un fungo diploide che vive solitamente come colonizzatore innocuo e commensale del tratto gastrointestinale e genitale dell'uomo, oppure come patogeno opportunisto in presenza di uno o più fattori predisponenti (4).

La sua patogenicità è dovuta alla capacità di invadere tessuti e organi e di dar luogo a difficili, talvolta intrattabili, infezioni superficiali.

Anche l'abilità di *C. albicans* nel formare biofilm sulle superfici (cellule endoteliali e cateteri) è considerata responsabile della "resistenza clinica". È noto infatti, che la formazione dei biofilms può conferire protezione al microrganismo all'interno degli strati, portando al fallimento della terapia antimicotica (5).

La resistenza di *Candida* è rivolta soprattutto verso il fluconazolo, un farmaco che appartiene alla famiglia degli azoli. Questi farmaci, inclusi imidazoli e triazoli, sono diretti contro l'enzima lanosterolo demetilasi che catalizza uno step del *pathway* biosintetico dell'ergosterolo (6). L'azione degli azoli è generalmente fungistatica contro lieviti come le specie di *Candida*, mentre è fungicida contro muffe quale *Aspergillus*. Purtroppo, l'utilizzo intensivo del fluconazolo diventato di prima scelta per il trattamento di molte infezioni opportunistiche soprattutto in pazienti AIDS che ricevono per un periodo prolungato gli azoli, ha causato la selezione di ceppi resistenti di *C. albicans* al fluconazolo (7-10).

Prove della comparsa di resistenze primarie e secondarie sono state documentate in pazienti HIV positivi, in cui frequentemente *Candida* colonizza il cavo orale in un range che va dal 64 all'87% e causa malattia sintomatica nel 47% dei casi. Ad esempio è stato osservato che resistenze secondarie, in individui con AIDS, sono causate da singoli ceppi di *C. albicans* che acquistano crescente resistenza nel tempo e la cui selezione è successiva al trattamento con azoli.

Sebbene siano state riportate resistenze all'amfotericina B e alla 5-FC, la resistenza agli azoli appare emergere come il problema maggiore in pazienti curati per infezioni da lievito. Questo può considerarsi come il risultato di un incremento nell'uso degli azoli. L'importanza della pressione selettiva del farmaco su ceppi resistenti, nell'induzione di resistenza secondaria, o anche nella trasmissione nosocomiale, non è stata definita chiaramente. La tipizzazione genetica degli isolati di pazienti con AIDS, con vaginiti ricorrenti o neutropenia, ha dimostrato lo sviluppo di resistenza in ceppi colonizzanti, suggerendo che l'induzione di una mutazione genica gioca un ruolo importante nello sviluppo della resistenza stessa (11).

Per questi motivi numerosi ricercatori stanno valutando la reale fattibilità di impiego di nuove strategie terapeutiche non farmacologiche per evitare l'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza. 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 e i loro componenti ottenuti dalla distillazione di alcune parti vegetali hanno dimostrato di possedere diverse attività come quella antimicrobica e anti-infiammatoria. Per questo motivo è apparsa evidente la necessità di sviluppare dei modelli *in vitro* e di applicare le indagini biochimiche e ultrastrutturali per ottenere indicazioni utili sul meccanismo di azione e quindi sulla loro reale attività farmacologica.

Obiettivo dello studio

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). Il TTO contiene 48 composti organici ma, le sostanze più significative per la sua attività salutare sono due: il terpinene e il cineolo. La composizione dell'olio è regolamentata da Standard Internazionali che lo definiscono come "Oil of *Melaleuca terpinen-4-ol type*" che regolamentano appunto la massima e/o minima composizione dell'olio. Il composto maggiormente presente è il terpinen 4-ol che deve rappresentare almeno il 30% del totale e l'1,8-cineolo che deve essere meno del 15%.

I nostri studi sono stati condotti trattando con il TTO due ceppi di *C. albicans*, isolati da pazienti HIV positivi.

Risultati

Nei nostri studi abbiamo analizzato gli effetti del TTO su due ceppi di *C. albicans*, il ceppo farmacosensibile 3153 e il ceppo farmaco-resistente al fluconazolo AIDS68. In particolare modo abbiamo valutato la presenza di alterazioni indotte dal trattamento sia nella parete sia nella membrana cellulare del microrganismo dimorfico.

Numerose sono le proprietà attribuite alla parete cellulare di *C. albicans*:

- Mantenimento della morfologia cellulare attraverso processi metabolici attivi che hanno luogo nella membrana citoplasmatica e nella parete stessa.
- Protezione contro la lisi osmotica e fattori offensivi esterni, compresa la fagocitosi.
- Fondamentale mosaico antigenico della cellula, importante nelle relazioni ospite-parassita.
- Barriera di permeabilità anche se non selettiva: in condizioni normali può essere attraversata solo da molecole che hanno peso molecolare inferiore a 1000.
- Bersaglio ideale per l'attività antimicrobica, che può tuttavia comportarsi come un fattore di resistenza ad essa.

Molte delle funzioni biologiche correlate alla patogenicità e alla virulenza del microrganismo risiedono proprio nella parete fungina dal momento che essa è riconosciuta come la componente critica per la morfogenesi e per le interazioni cellulari con l'ospite (12).

Dei molti fattori associati alla virulenza di *C. albicans*, la morfogenesi ifale sembra essere uno dei più importanti. Lo sviluppo dell'ifa dalle cellule di lievito è cruciale per l'adesione nella fase iniziale della colonizzazione microbica, ed è un evento chiave nella patogenesi. L'adesione può coinvolgere sia proteine di parete glicosilate sia proteine non-glicosilate che fungono da adesine.

La parete di *C. albicans* è costituita principalmente da mannani, glucani e chitina. I mannani rappresentano il 40% del totale dei polisaccaridi di parete mentre il 47-60% è costituito dal beta (1,3)-D e (1,6)-D-glucano. La composizione percentuale della parete cellulare della forma lievito e della forma ifale è sostanzialmente la stessa sebbene l'ammontare dei glucani alcali-solubili e insolubili e della chitina variano in base alla forma di crescita. La membrana plasmatica di *Candida* è molto simile a quella delle cellule eucariotiche superiori tranne che per la presenza di ergosterolo al posto del colesterolo.

Nel nostro studio abbiamo utilizzato la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) che permette lo studio dei dettagli ultrastrutturali di un campione biologico. L'allestimento di un preparato per l'osservazione al TEM deve necessariamente condurre alla formazione di un campione estremamente sottile, in grado di essere attraversato dagli elettroni emessi dalla sorgente. Le fasi principali sono costituite da: fissazione e post-fissazione, disidratazione, infiltrazione e polimerizzazione, sezionamento e contrastazione delle sezioni.

Questi studi hanno rivelato che dopo pochi minuti dal trattamento con TTO 1% le cellule farmacosensibili (3153) subiscono delle lievi ma significative alterazioni ultrastrutturali (Figura 1b) mentre le cellule farmaco-resistenti mostrano queste stesse alterazioni solo dopo un'ora dal trattamento (Figura 2d).

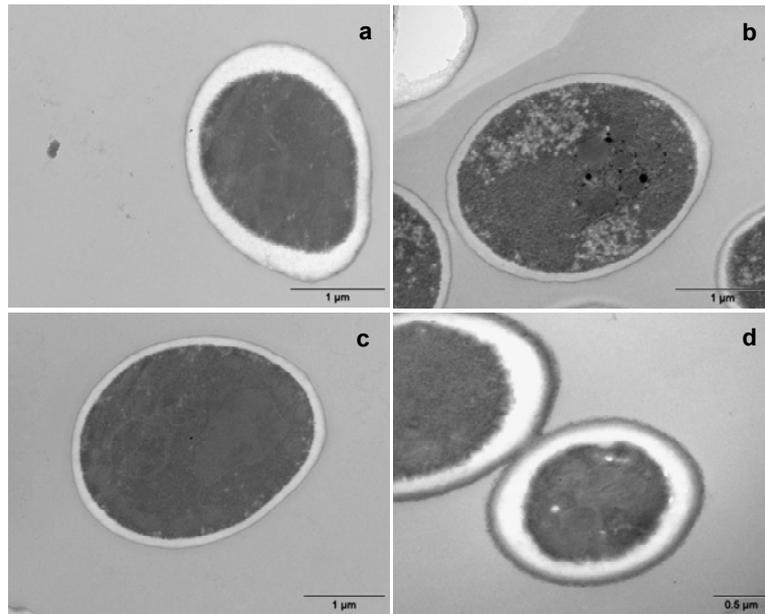


Figura 1. Microscopia elettronica a trasmissione di a) 3153 controllo; b) 3153 trattato per 10 minuti con 1% TTO; c) AIDS68 controllo; d) AIDS68 trattato per 60 minuti con 1% TTO

La microscopia elettronica a scansione invece permette lo studio della morfologia di superficie di campioni biologici opportunamente preparati e delle eventuali modificazioni indotte, ad esempio, dal trattamento con agenti di varia natura, dall'instaurarsi di stati patologici o da variazioni delle condizioni ambientali.

Nelle immagini ottenute con questa metodica non si sono evidenziate significative differenze nella morfologia di superficie in entrambi i ceppi trattati. L'unica modificazione osservata è stata la presenza di materiale capsulare addensato sulla superficie del ceppo sensibile 3153 dopo 30 minuti di trattamento (Figura 2, freccia); tale alterazione invece è quasi completamente assente nel ceppo resistente AIDS68 (dato non mostrato).

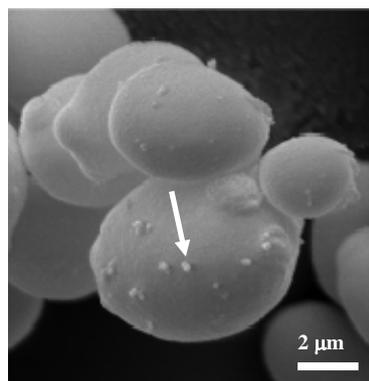


Figura 2. Immagine di microscopia elettronica a scansione del ceppo 3153 trattato con TTO 1%

Discussione

Questi studi indicano che popolazioni sensibili e resistenti al fluconazolo del fungo dimorfico *C. albicans* subiscono un effetto citotossico, più o meno evidente, anche con tempi di trattamento molto brevi. Le strutture cellulari colpite sono soprattutto la membrana plasmatica con l'aumento delle sue invaginazioni e i mitocondri e, dato non meno importante, la comparsa delle rarefazioni citoplasmatiche. Questo ha permesso di ipotizzare che il TTO possa esercitare la sua ben nota attività antimicrobica mediante un meccanismo di azione al quale partecipano numerose proteine citoplasmatiche che una volta attivate trasducono i segnali che regolano l'omeostasi cellulare. Queste modalità di attivazione sembrano essere diverse se si confrontano il ceppo sensibile (3153) e quello resistente (AIDS 68) infatti, il ceppo sensibile risente dell'effetto esercitato dall'olio essenziale più velocemente e soprattutto con maggiori conseguenze.

Conclusioni

Il rischio più grande per i pazienti immunocompromessi, trattati con azoli per lunghi periodi, in profilassi o trattamento di infezioni fungine invasive o difficili da eradicare, è l'instaurarsi di condizioni favorevoli per lo sviluppo della resistenza.

Questi dati, dimostrano che il TTO è in grado di causare rapidamente alterazioni morfologiche-ultrastrutturali significative.

L'identificazione delle molecole responsabili dei fenomeni osservati darà indicazioni utili per un impiego terapeutico del TTO soprattutto per le micosi ricorrenti provocate da ceppi resistenti alle comuni terapie anti-fungine.

Si tratta di osservazioni originali e inaspettate che meritano ulteriori indagini e approfondimenti che sono in corso nei nostri laboratori.

Bibliografia

1. Fadda ME, Podda GS, Pisano MB, Deplano M, Casentino S. Prevalence of *Candida* species in different hospital wards and their susceptibility to antifungal agents: results of a three years survey. *J Rev Med Hyg* 2008;49(2):69-74.
2. Cowen LE. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:187-98 Review.
3. Oliveira PM, Mascarenhas RE, Fererer SR, Oliveira RP, Travessa IE, Gomes MV Grassi MF Rev. Bras. Vaginal infections in human immunodeficiency virus-infected women. *Ginecol Obstet* 2008;22:121-6.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ, Messer SA, and the SENTRY Participant Group. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and variconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Microbiol* 2001;39:3254-59.
5. d'Efert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets* 2006;7:465-70.
6. De Sarro ., La Camera E, Fera MT. New and investigational triazole agents for the treatment of invasive fungal infections. *J Chemother* 2008;20:661-71.

7. White TC, Pfaller MA, Rinaldi MG, Smith J, Redding SW. Stable azole drug resistance associated with a substrain of *Candida albicans* from HIV-infected patients. *Oral Dis* 1997;1:102-09.
8. Kauffman CA. Clinical efficacy of new antifungal agents. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:483-88.
9. Gómez-López A, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Pharmacotherapy of yeast infections. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9:2801-16 Review.
10. Stringaro A, Molinari A, Calcabrini A, Arancia G, Ceddia PG, Cianfriglia M, Poloni F, Mondello F, Angiolella L, De Bernardis F, Cassone A. Detection of human P-glycoprotein-like molecule in azole-resistant *Candida albicans* from HIV+ patients. *Microb Drug Resist* 2002;8(3):235-44.
11. Perea S, Lopez-Ribot SL, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Santillan RA, Martinez M, Calabrese D, Sanglard D, Petterson TF.. Prevalence of molecular mechanism of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2676-84.
12. Angiolella L, Stringaro A, De Bernardis F, Posteraro B, Bonito M, Toccaceli L, Torosantucci A, Colone M, Sanguinetti M, Cassone A, Palamara A T. Increase of virulence and its phenotypic traits in drug-resistant strains of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:927-36.

FATTORE ANTI-LPS DA *PARIETARIA JUDAICA*

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

(a) Istituto di Biomedicina e Immunologia Molecolare "Alberto Monroy" del Consiglio Nazionale
delle Ricerche, Palermo

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

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

(d) Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Università di Palermo

Introduzione

L'endotossina è una tossina microbica, parte integrante della membrana esterna della parete di batteri Gram-negativi che viene rilasciata completamente con la lisi del batterio. È costituita da sub-unità molecolari che hanno dimensioni comprese tra 10.000 e 20.000 Daltons, mentre le aggregazioni hanno dimensioni di circa 100.000 Daltons. Un esempio tipico di endotossina è rappresentato dal lipopolisaccaride (LPS) che è presente nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi. Le endotossine sono le principali responsabili delle conseguenze cliniche delle infezioni da batteri gram-negativi. Infatti, l'endotossina è ritenuta responsabile della patogenesi della sepsi, dello shock settico e della conseguente malattia multiorgano (MOF) (1). A causa della sua natura particolarmente aggressiva e multifattoriale, la sepsi conduce rapidamente a morte e costituisce la principale causa di decesso nelle terapie intensive non coronariche di tutto il mondo. Da qui la necessità, per la cura della sepsi, di rimuovere e/o disattivare le endotossine dal corpo del paziente prima che la malattia degeneri. Infatti, in relazione alla presenza di endotossina nel sangue si innesca una complessa attivazione immunologica che coinvolge vari sistemi biologici (immunitario e reticoloendoteliale) e una serie di mediatori, liberati principalmente dall'attivazione di macrofagi, monociti e altre cellule. Inoltre, le endotossine sono contaminanti frequenti del DNA plasmidico estratto dai batteri e di tutti quei prodotti che sono estratti e/o sono venuti a contatto con essi. Le endotossine devono essere rimosse da questi prodotti per evitare reazioni infiammatorie nel corso delle applicazioni *in vivo*, quali ad esempio la terapia genica. Dal punto di vista terapeutico, negli ultimi anni hanno assunto un ruolo rilevante una classe di proteine e/o peptidi (e loro derivati) che, come prodotti dell'immunità innata, sono in grado di legare e neutralizzare componenti della parete batterica tra cui l'LPS. I peptidi che sono in grado di neutralizzare questo tipo di processo vengono oggi definiti con un termine ampio quale quello di *Host Defense Peptide* (HDP). Quest'ultima classe di proteine sono di particolare interesse in quanto oltre all'attività antimicrobica diretta, sono in grado di potenziare la risposta immunitaria dell'organismo, promuovendo *in vitro* varie risposte di difesa (ad es. migrazione di leucociti, maturazione delle cellule dendritiche) e contribuendo così al potenziamento della risposta immunitaria adattativa. Queste proteine sono generalmente caratterizzate dall'aver un peso molecolare compreso tra 2 ed 80 kDa e in maniera preferenziale, contenenti amino-acidi caricati positivamente (da qui il termine di proteine cationiche) (2).

Le proteine denominate *non specific Lipid Transfer proteins* (ns-LTPs) sono piccole molecole proteiche particolarmente stabili di approssimativamente 10 kDa solitamente presenti in tutti gli organismi vegetali sino ad oggi studiati (3). Tali proteine sono accomunate dalla capacità di promuovere, *in vitro*, il trasferimento di molecole lipidiche attraverso membrane

anche se, studi recenti, hanno dimostrato che esse sembrano svolgere una funzione protettiva in quanto capaci di agire come peptidi ad attività antimicrobica. In alcune specie vegetali è stata dimostrata una loro capacità allergenica come nel caso delle *Rosaceae Prunoideae* (pesca, albicocca, prugna), *Pomoideae* (mela) e le *Urticaceae* quali la Parietaria (4). La tecnologia del DNA ricombinante ha permesso l'isolamento di vari allergeni della famiglia delle proteine ns-LTPs, tra questi quelli della Parietaria denominati Parj1 e Parj2. In particolare, sono state ad oggi isolate due isoforme dell'allergene Parj1 denominate (secondo la nomenclatura internazionale) Parj1.01 e Parj1.02 (5, 6). Tali isoforme differiscono essenzialmente per la presenza di una regione di 37 aminoacidi presente esclusivamente nell'isoforma Parj1.01 (7).

Caratterizzazione di un peptide in grado di legare LPS batterico

Una analisi *in silico* condotta mediante l'algoritmo messo a disposizione dall'*Antimicrobial Peptide Database* ha messo in evidenza che la porzione carbossiterminale del Parj1.01 presenta caratteristiche biochimiche peculiari. Tale regione presenta una carica netta totale positiva (+5) e una elevata percentuale di residui di prolina suggerendo che tale peptide possa avere la capacità di agire come peptide ad attività antimicrobica. I dati riportati in Tabella 1 descrivono la diversa capacità delle due isoforme ricombinanti dell'allergene maggiore Parj1 (Parj1.01 e Parj1.02) di legare LPS di origine batterica. I dati mostrati evidenziano come l'isoforma Parj1.01 presenti una spiccata capacità di legare LPS.

Tabella 1. Saggi di determinazione della quantità di endotossina endogena

Quantità di proteina analizzata	Positività al LAL test	
	rParj1.01	rParj1.02
1 µg	+	-
0,5 µg	+	-
0,25 µg	+	-
0,125 µg	+	-
62,5 ng	+	-
31,25 ng	+	-
15,625 ng	+	-
7,81 ng	+	-
3,9 ng	+	-

I valori relativi alla concentrazione di endotossina delle soluzioni sono stati ottenuti mediante il kit Multi-test *Limulus Amebocyte Lysate (LAL) pyrogen plus test* (Bio-Whittaker, USA) sensibilità 0,12 EU.

Inoltre quando la sequenza in questione viene separata dalla molecola di origine e studiata sotto forma di peptide sintetico (peptide Par37), essa conserva la caratteristica di legare endotossina in saggi *in vitro* (dati non mostrati). Le caratteristiche di tale peptide sono state studiate mediante i saggi *in vitro* di seguito riportati. In particolare, test di citotossicità condotti su cellule in coltura (linee cellulari HeLa) (Figura 1) o con emazie di origine umana (Tabella 2) hanno dimostrato che tale molecola non ha effetti tossici sulle cellule analizzate anche quando utilizzata ad elevate concentrazioni. In Figura 1 il saggio descrive la bioriduzione dell'MTS (Reagente di Owen) prodotto dagli enzimi ad attività deidrogenasica presenti nelle cellule metabolicamente attive. I valori sull'asse delle ascisse indicano la concentrazione di antigene

utilizzato per il test mentre i valori sull'asse delle ordinate l'assorbanza, delle soluzioni determinata ad una lunghezza d'onda di 490 nm. Mentre per il test di emolisi il saggio è in grado di descrivere l'eventuale emolisi indotta dopo incubazione con il peptide Par37 a differenti concentrazioni. 1X PBS è stato utilizzato come controllo negativo e 0,1% Triton X100 come controllo positivo. Le Densità Ottiche misurate a 451 nm indicano il rilascio di emoglobina nel terreno in seguito a lisi cellulare (Figura 2).

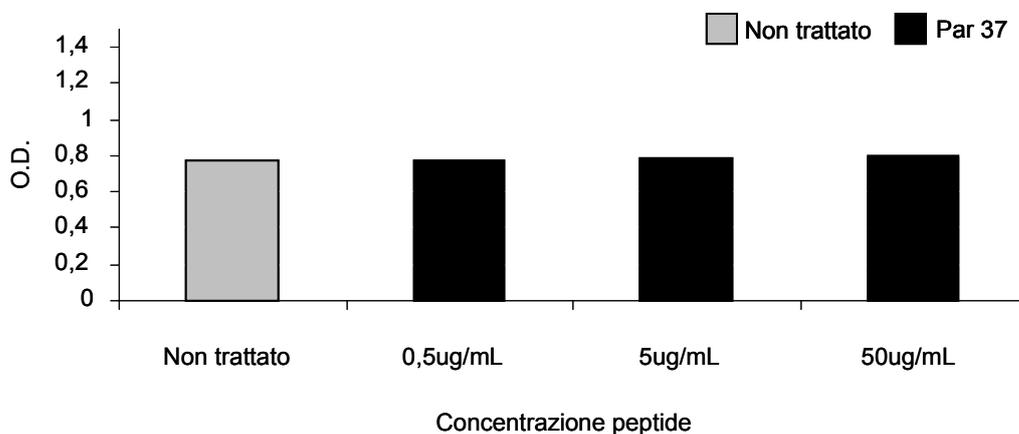


Figura 1. Test di citotossicità con cellule HeLa

Tabella 2. Test di emolisi

Stimulus	Concentrazione peptide sintetico Par37	O.D. (415 nm)
1XPBS		0,041
	2,5 µM	0,044
	25 µM	0,041
Par37	250 µM	0,041
	2,5 mM	0,045
	25 mM	0,040
Triton X100	0,1%	3,3

Conclusioni

I peptidi antimicrobici sono molecole largamente diffuse in natura, sintetizzate da organismi appartenenti sia al regno vegetale che animale. Essi sono tipici componenti del sistema innato e rappresentano la prima linea di difesa contro molti patogeni. Questa classe di molecole è nota nel mondo scientifico da almeno due decenni e negli ultimi anni sono diventati argomento di notevole interesse in quanto rappresentano delle nuove possibili formulazioni terapeutiche in grado di sopperire alla sempre maggiore diffusione di microrganismi patogeni resistenti ai comuni antibiotici utilizzati sia in campo umano che veterinario. I dati qui riportati sono relativi alla caratterizzazione e al possibile utilizzo di un peptide capace di legare componenti delle membrane batteriche quali, a titolo puramente esemplificativo, il lipopolisaccaride (LPS) e/o di interferire, e in particolare minimizzare, gli effetti associati all'LPS e ad altri componenti delle membrane batteriche, come ad esempio gli effetti tossici su esseri viventi e in particolare su

esseri umani e animali (8). In particolare si tratta di un peptide derivato da una sequenza proteica di maggiori dimensioni identificata nel polline di *Parietaria judaica* che presenta caratteristiche in grado di supportare possibili applicazioni mediche del peptide sia in forma di composizioni farmacologiche anti-shock settico che di sistemi di purificazione da endotossine batteriche.

Bibliografia

1. Brunn GJ, Platt JL, The etiology of sepsis: turned inside out. *Trends Mol Med* 2006;12(1):10-6.
2. Lai Y, Gallo RL, AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 2009;30(3):131-41.
3. Marion D, Bakan B, Elmorjani K, Plant lipid binding proteins: properties and applications. *Biotechnol Adv* 2007;25(2):195-7.
4. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Barber D, Plant non-specific lipid transfer proteins as food and pollen allergens. *Clin Exp Allergy* 2004;34(9):1336-41.
5. Costa MA, Colombo P, Izzo V, Kennedy H, Venturella S, Cocchiara R, Mistrello G, Falagiani P, Geraci D. cDNA cloning, expression and primary structure of Par jI, a major allergen of *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett* 1994;341(2-3):182-6.
6. Duro G, Colombo P, Costa MA, Izzo V, Porcasi R, Di Fiore R, Locorotondo G, Mirisola MG, Cocchiara R, Geraci D. cDNA cloning, sequence analysis and allergological characterization of Par j 2.0101, a new major allergen of the *Parietaria judaica* pollen. *FEBS Lett* 1996;399(3):295-8.
7. Colombo P, Bonura A, Costa M, Izzo V, Passantino R, Locorotondo G, Amoroso S, Geraci D. The allergens of *Parietaria*. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;130(3):173-9.
8. Andra J, Gutschmann T, Garidel P, Brandenburg K, Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds. *J Endotoxin Res* 2006;12(5):261-77.

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", Sapienza Università di Roma

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

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

Introduzione

Tra i funghi di interesse medico *Candida albicans*, fungo dimorfo, ricopre un ruolo di rilievo in quanto normalmente presente come commensale a livello del tratto gastrointestinale nell'ospite sano, ma in condizioni di immunosoppressione diviene predominante e patogeno. Altri miceti di rilievo sono rappresentati dal *Cryptococcus neoformans*, lievito capsulato, la cui capsula costituisce il principale fattore di virulenza e dai generi *Microsporium* e *Tricophyton*, funghi filamentosi dermatofiti, generalmente trasmessi dagli animali all'uomo, invadendo i tessuti cutanei e si nutrendosi di cheratina.

Il trattamento spesso inappropriato e prolungato con farmaci di sintesi ha determinato in alcuni casi il fallimento terapeutico a causa dello sviluppo della farmaco-resistenza. Tutto ciò ha spostato l'interesse verso l'utilizzo di sostanze naturali come valida alternativa ai farmaci di sintesi, verso i quali è più difficile lo sviluppo di farmacoresistenza per la loro composizione più complessa.

Uno studio svolto precedentemente sull'olio essenziale di *Mentha suaveolens* proveniente dal Marocco, i cui principi attivi sono stati identificati come pulegone, piperitenone ossido (PEO) e piperitone ossido (PO) in concentrazioni differenti a seconda della sottospecie esaminata (1, 2), ha messo in evidenza l'attività antimicrobica di quest'olio essenziale. Poiché questa pianta cresce spontaneamente nell'area mediterranea, ne abbiamo voluto studiare in particolare l'attività antimicotica del suo olio essenziale.

Materiali e metodi

L'analisi chimica dell'olio essenziale di *M. suaveolens* da noi utilizzato è stata effettuata mediante gascromatografia e spettrometria di massa e da tale analisi è risultata una prevalenza di PEO maggiore del 90%. Per questo studio sono stati saggiati 12 ceppi di *C. albicans* di diversa origine, natura e sensibilità ai farmaci di sintesi, 4 ceppi clinici di *C. neoformans* e 7 ceppi di funghi filamentosi di cui 2 appartenenti al genere *Microsporium* e 5 al genere *Tricophyton*.

Per determinare la MIC (minima concentrazione inibente) dell'olio essenziale di *M. suaveolens* è stato utilizzato il metodo delle micro-diluizioni secondo le modifiche apportate per gli oli essenziali (3). L'olio essenziale è stato diluito in RPMI 1640 addizionato con 0,001% v/v di Tween 80. Le diluizioni di olio essenziale, comprese tra 0,000488 e 0,5 % v/v, sono state poste in piastre Costar a 96 pozzetti, inoculate con 2×10^3 cellule e incubate a 28 °C per 24 ore.

Per valutare l'inibizione della formazione del tubo germinativo a carico dell'olio essenziale di *M. suaveolens* è stato eseguito il test del tubo germinativo su un ceppo di *C. albicans*. A tale

scopo 1.4×10^7 cellule sono incubate in 5 mL di RPMI 1640 contenente siero al 10% e olio essenziale alle seguenti concentrazioni: 0,0156 e 0,031% v/v e poste in agitazione a 37 °C. Ai tempi 0, 90, 240 minuti e 24 ore le cellule sono state prelevate, osservate e fotografate al microscopio ottico con un ingrandimento 40x.

Infine i lieviti sono stati visualizzati mediante microscopio elettronico a scansione Cambridge Stereoscan 360 (SEM). Per l'osservazione al SEM i campioni sono stati fissati per 20 min a temperatura ambiente mediante una soluzione di glutaraldeide al 2,5% v/v in *buffer* di cacodilato 0,01M (pH 7.4) contenente saccarosio al 2% (p/v), successivamente sono stati post-fissati con OsO₄ al 1% v/v per 1 ora, deidratati con etanolo e infine ricoperti con un sottile strato di oro (*coating* o metallizzazione).

I risultati ottenuti evidenziano che la MIC dell'olio essenziale di *M. suaveolens* testato su tutti i dodici ceppi di *C. albicans* è dello 0,125% v/v, mentre la MFC (minima concentrazione fungicida) è dello 0,250% v/v. L'olio essenziale utilizzato come controllo è stato il TTO (*tea tree oil*) che presenta una MIC dello 0,250% v/v, e una MFC dello 0,500% v/v. In tutti i casi l'olio essenziale di *M. suaveolens* presenta un'attività antimicotica leggermente maggiore al TTO come riportato nella Tabella 1.

Tabella 1. Minima Concentrazione Inibente (MIC) dell'olio essenziale di *Mentha suaveolens* e TTO in diversi ceppi di *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>	MIC <i>Mentha</i> v/v%	MIC TTO v/v%	MFC <i>Mentha</i> v/v%	MFC TTO v/v%
CO23	0,125	0,250	0,125	0,250
CO23RFK	0,125	0,250	0,250	0,250
CO23RFLU	0,125	0,250	0,250	0,500
CA2	0,125	0,250	0,125	0,250
3153	0,125	0,250	0,250	0,500
GR5	0,125	0,250	0,250	0,250
AIDS 6	0,125	0,250	0,250	0,500
AIDS 37	0,125	0,250	0,125	0,250
AIDS 68	0,125	0,250	0,250	0,250
AIDS 126	0,125	0,250	0,250	0,250
ATCC10231	0,125	0,250	0,125	0,250
ATCC20891	0,125	0,250	0,250	0,250
ATCC24433	0,125	0,250	0,125	0,250

Per quanto riguarda l'attività antimicotica dell'olio essenziale di *M. suaveolens* sui diversi ceppi di *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium* e *Tricophyton*, la MIC nella maggior parte risulta compresa tra 0,03-0,125% v/v come riportato nella Tabella 2, in alcuni casi anche inferiori alle MIC riportate per *C. albicans* dimostrando quindi una buona attività antimicotica di questo olio essenziale sulle diverse specie fungine.

Tabella 2. Minima Concentrazione Inibente (MIC) in diversi ceppi di *Cryptococcus neoformans* e dermatofiti del genere *Microsporium* e *Trichophyton*

Ceppi utilizzati	MIC100		
	48h	72h	7gg
<i>Crypt. neoformans</i> 23159	0,03	0,03	0,03
<i>Crypt. neoformans</i> Volpe	0,03	0,03	0,03
<i>Crypt. neoformans</i> 3	0,03	0,03	0,03
<i>Crypt. neoformans</i> 4	0,03	0,03	0,03
<i>Trychopyton mentagroph</i> 54	/	0,125	/
<i>T. mentagrophytes</i> 4	/	0,06	/
<i>T. mentagroph.</i> 297	/	0,125	/
<i>Microsporium gypseum</i> 314	/	0,125	/
<i>Trichoph. violaceum</i> 254	/	0,06	/
<i>Trichoph. rubrum</i>	/	0,5	/
<i>Microsporium canis</i> 250	/	0,125	/

Poiché in *C. albicans* il dimorfismo rappresenta uno dei più importanti fattori di virulenza, è stata indotta la morfogenesi e successivamente è stata valutata la capacità dell'olio essenziale di *M. suaveolens* di inibire la formazione del tubo germinativo. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'olio essenziale di *M. suaveolens* è in grado di inibire la formazione del tubo germinativo al 100% entro 240 minuti e del 90% circa nelle 24 h anche a concentrazioni subinibenti dello 0,0156% v/v come illustrato in Figura 1.

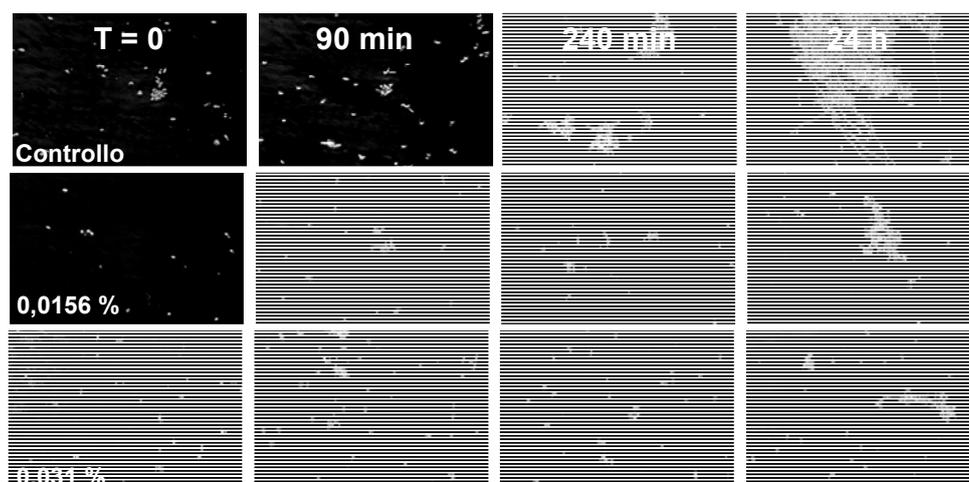


Figura 1. Inibizione del tubo germinativo in *Candida albicans* dopo contatto con l'olio essenziale di *M. suaveolens*

Allo scopo di studiare il meccanismo d'azione mediante il quale l'olio essenziale da noi studiato esercita la sua attività citotossica, sono state eseguite delle osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) che hanno messo in evidenza la presenza di significative alterazioni ultrastrutturali sulle cellule di *C. albicans*. Infatti, sulla superficie di numerose cellule di *Candida* è possibile osservare la presenza di "blebs" dopo trattamento con l'olio essenziale. Le "blebs" osservate quasi certamente interessano gli strati più superficiali della parete cellulare (Figura 2a, 1.5000x; Figura 2b, 12.500x).

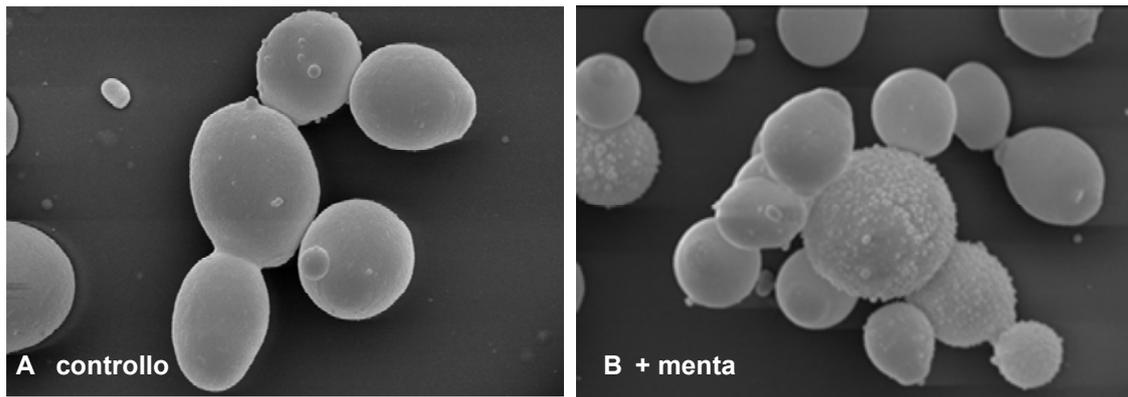


Figura 2. Osservazione al microscopio elettronico a scansione

In conclusione, i risultati ottenuti rivelano che l'olio essenziale di *M. suaveolens* possiede un'attività fungicida nei confronti di diversi tipi di miceti a concentrazioni molto basse. Inoltre, la sua capacità di inibire importanti fattori di virulenza di *C. albicans*, come la formazione del tubo germinativo e di provocare alterazioni a livello della parete cellulare anche in ceppi farmaco-resistenti, suggerisce l'impiego di questo olio essenziale come una valida alternativa ai farmaci di sintesi attualmente utilizzati nella terapia clinica.

Bibliografia

1. Ildrissi A, Bellakhdar J. Etude chimiotaxonomique de diverses populations de *Mentha suaveolens* EHRH. du Maroc: Nouvelles données. *AL BIRUNIYA, Rev Mar Phar* 1989;5:79-88.
2. Oumzil H, Ghouami S, Rhajaoui M, Ildrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res* 2002;16:727-31.
3. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Second Edition: approved standard. NCCLS document M27-A2., Villanova, Pa., USA. 2002.

CLIMACOSTOLO: NUOVO ANTIBIOTICO?

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

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

(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

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

Introduzione

Come recentemente sottolineato da Da Rocha (1), circa il 60% dei principi attivi dei prodotti farmaceutici oggi in uso, derivano da sostanze naturali ottenute da piante, animali, funghi e microorganismi, confermando come la natura rappresenti una fonte estremamente ricca e diversificata di composti chimici innovativi. Nell'ambito di quest'elevata varietà di composti naturali, i metaboliti secondari hanno ripetutamente attratto l'interesse dei ricercatori per le loro interessanti attività biologiche e, talvolta, per i loro profili farmacologici. In particolare, i microorganismi eucariotici, come i protozoi e le microalghe, molti dei quali sono stati per lungo tempo ignorati, vengono ora ritenuti un'importante fonte di nuovi metaboliti secondari bioattivi. Fino ad oggi, solo una dozzina di metaboliti secondari sono stati isolati da protozoi ciliati e molti di questi composti sembrano essere il risultato di una selezione evolutiva associata a meccanismi di attacco o di difesa. Queste sostanze includono la keronopsina isolata da *Pseudokeronopsis rubra* (2), le euplotine (3, 4), il raikovenal (5, 6) e l'epoxifocardina (7) da specie di *Euplotes*, la blefarismina da *Blepharisma japonicum* (8, 9), la stentorina da *Stentor coeruleus* (10, 11), la maristentorina da *Maristentor dinoferus* (12), e il climacostolo da *Climacostomum virens* (13). È interessante notare che, a causa delle attività antimicrobiche e pro-apoptotiche dimostrate contro alcune linee cellulari tumorali, il sesquiterpenoide euplotina C è stato recentemente proposto per la progettazione di nuovi farmaci (14-16). Inoltre, attività antibatteriche e antivirali sono state osservate per la stentorina (17) e per la blefarismina (18), entrambi strutturalmente simili all'ipericina (un composto policiclico aromatico estratto da piante del genere *Hypericum*).

Il climacostolo [5-(Z)-non-2-enil-benzene-1,3-diolo] è una tossina incolore usata dal ciliato per difesa chimica contro i predatori. Una particolare attenzione è stata recentemente riservata a questa molecola, che viene classificata all'interno di un grande gruppo di composti naturali conosciuti come lipidi resorcinolici (anche chiamati alchilresorcinoli o 5-alchilresorcinoli), largamente rinvenuti in piante, funghi e alghe, ma solo in una specie animale, la spugna marina *Haliclona* sp. (19). Gli elementi strutturali comuni a tutti i lipidi resorcinolici sono rappresentati da un'unità 1,3-diidrossibenzenica (resorcinolo) e da una catena alchilica o alchenica situata in posizione 5 dell'anello aromatico. Molti composti biologicamente attivi appartenenti a questa classe di sostanze contengono anche altri gruppi funzionali sia nella catena alchilica, sia nell'anello aromatico. Interessanti attività antibatteriche, antiparassitarie, genotossiche e antitumorali sono state osservate per questi composti (20-22). Ad esempio, alcuni alchilresorcinoli estratti da graminacee hanno mostrato la capacità di ridurre considerevolmente l'attività mutagena indotta da alcune sostanze nei linfociti umani (23). Effetti citotossici con induzione di apoptosi su cellule umane di epatocarcinoma, di tumore al colon e leucemiche sono stati anche descritti per alchilresorcinoli estratti da una specie di Anacardiacee (*Lithraea melloides*) (24) e da un basidiomicete del legno (25). Inoltre, quando gli alchilresorcinoli sono

stati utilizzati come principi attivi in farmaci destinati al trattamento di infezioni e tumori nei mammiferi, hanno mostrato una bassa tossicità anche ad alti dosaggi (26).

Il climacostolo è il primo esempio di alchilresorcinolo isolato da protozoi e sintetizzato chimicamente (27, 28), sul quale sono stati recentemente condotti studi relativi all'attività citotossica su cellule umane tumorali e non tumorali (29). Questi studi hanno dimostrato che la molecola inibisce efficacemente e specificamente la crescita delle cellule tumorali attivando un processo apoptotico, mentre risulta priva di effetti sulle cellule non-tumorali. Sulla base di queste evidenze sperimentali e della bassa tossicità descritta per altri lipidi resorcinolici, che sono già utilizzati nel trattamento di tumori e infezioni nei mammiferi, abbiamo saggiato l'effetto della tossina di *C. virens* sul protozoo parassita *Toxoplasma gondii* per valutarne, in prima istanza, la capacità parassitocida o parassitostatica quando aggiunta a colture *in vitro*. Alcuni risultati preliminari ci inducono a proseguire questi esperimenti anche in considerazione del fatto che il climacostolo è oggi disponibile come prodotto di sintesi e quindi facilmente ottenibile.

Il climacostolo come arma di difesa

Negli ultimi dieci anni la funzione naturale e le caratteristiche fisico-strutturali del climacostolo sono state oggetto di studio da parte di diversi ricercatori (13, 31, 32), ed è possibile affermare che, al pari di altri ciliati eterotrichi, *C. virens* utilizza questa tossina per difendersi da potenziali predatori unicellulari e/o multicellulari (13, 30). Il climacostolo è infatti contenuto in particolari organuli tipici dei protisti e delimitati da una propria membrana denominati "estrusomi". Questi organuli sono generalmente collocati subito sotto la superficie cellulare, possono essere diversificati per struttura e morfologia, ma hanno tutti la caratteristica in comune di scaricare il loro contenuto all'esterno della cellula in seguito a vari stimoli chimici o fisici senza una rottura della membrana cellulare. Alcuni ciliati utilizzano gli estrusomi a scopo offensivo (come le aptocisti dei Suctoria o le toxicisti degli Haptorida), mentre altri ciliati posseggono estrusomi difensivi come le tricocisti di *Paramecium* o le pigmentocisti di *Blepharisma* e *Stentor*. Le granulocisti di *C. virens*, che contengono il climacostolo, rientrano in quest'ultima categoria. Infatti, quando un predatore, come il ciliato *Dileptus margaritifer*, tenta di attaccare il *C. virens*, quest'ultimo reagisce scaricando il climacostolo (con tempi misurabili in millisecondi) inducendo nel ciliato che lo sta attaccando immediate reazioni comportamentali e patologiche, come il nuoto all'indietro e/o una deformazione cellulare. Se il predatore insiste nei suoi attacchi la scarica di climacostolo sortirà un effetto letale su *D. margaritifer* disgregandolo in pochi minuti per mezzo di un chiaro effetto necrotico (33). È stato altresì osservato che il climacostolo è attivo su di un ampio spettro di organismi (protisti e metazoi) mostrando una diversificata attività tossica per ognuno di essi (Tabella 1).

Tabella 1. Tossicità del climacostolo su alcuni organismi misurata dopo 1 ora e 24 ore di esposizione

Organismo	IC ₅₀ (µM) [1 h]	IC ₅₀ (µM) [24 h]
<i>Blepharisma japonicum</i>	35,87	22,42
<i>Climacostomum virens</i>	55,52	14,94
<i>Dileptus margaritifer</i>	11,96	5,30
<i>Didinium nasutum</i>	13,67	5,34
<i>Euplotes aediculatus</i>	5,98	5,36
<i>Paramecium caudatum</i>	10,25	4,91
<i>Paramecium tetraurelia</i>	7,69	7,52
<i>Stenostomum sphagnetorum</i>	45,48	38,00
<i>Stentor coeruleus</i>	15,37	9,82
<i>Stentor niger</i>	10,68	10,68
<i>Stentor polymorphus</i>	14,52	7,69
<i>Stentor roeseli</i>	11,10	5,76

Il climacostolo come antitumorale

L'attività antitumorale del climacostolo è stata recentemente esaminata *in vitro* sulle seguenti linee cellulari umane: cellule leucemiche promielocitiche (HL60), cellule derivate da carcinoma squamoso (A431), cellule derivate da adenocarcinoma prostatico (PC-3) e cellule derivate da glioblastomi (T98-G, U-87MG) e cellule endoteliali non-tumorali EA.hy926 (33). I risultati ottenuti finora mostrano che il climacostolo esercita un'azione citotossica dose-dipendente su tutte le linee tumorali esaminate, mentre risulta sostanzialmente inefficace sulle cellule endoteliali di controllo (Tabella 2). Appare inoltre evidente che l'azione citotossica della molecola evidenziata sulle cellule tumorali è mediata da un meccanismo di morte cellulare programmata (apoptosi), ben diverso dal rapido meccanismo necrotico indotto in natura nei predatori di *C. virens*.

Tabella 2. Effetto del climacostolo su cellule umane tumorali e non tumorali

Linea cellulare	IC ₅₀ (µM)*	IC ₁₀₀ (µM)*	Annessina V (% positivi) ♦	Δψm (% riduzione) ♦	Caspasi-9 (% attività) ♣	Caspasi-3 (% attività) ♣
HL-60	6,40	42,74	68,80	38,11	1,60	1,9
A431	4,74	42,10	70,60	48,50	1,3	1,7
PC-3	11,47	44,67	58,30	82,66	2,64	3,21
T98-G	15,14	45,71	21,22	76,90	8,09	4,17
U-87MG	19,74	56,23	47,76	73,47	2,50	1,78
EA.hy926	231,20	>400,00	14,90	13,00	1,1	1,05

*, valori rilevati dopo 24 ore di esposizione al climacostolo;

♦, valori rilevati dopo 6 ore di esposizione al climacostolo (concentrazione IC₅₀)

♣, valori rilevati dopo 2 ore di esposizione al climacostolo.

Tutti i principali eventi distintivi del processo apoptotico, tra i quali la riduzione del volume cellulare, l'esposizione della fosfatidilserina sulla membrana plasmatica, la condensazione della cromatina, il taglio del DNA nucleare in unità di 180-200 pb, l'attivazione del sistema delle caspasi e la disintegrazione della cellula in piccole vescicole, sono stati evidenziati nelle cellule tumorali esposte al climacostolo, con qualche tratto particolare mostrato dalle cellule A431. In effetti, lo spettro di eventi indotto dal climacostolo su questa linea cellulare non si conforma

totalmente al quadro canonico descritto per il tipico processo apoptotico, dal quale differisce per l'assenza dei corpi apoptotici e della frammentazione in oligonucleosomi del DNA nucleare, fenomeni questi che sono stati riportati da diversi Autori come caratteristici di un tipo di morte cellulare programmata denominata paraptosi (34). Gli esempi di paraptosi descritti anche in completa assenza o indipendentemente dall'attivazione delle caspasi, come nel caso delle cellule A431, sono numerosi. Tra questi, vale la pena di ricordare il caso delle cellule leucemiche JM1 esposte alla cladribina, un composto antineoplastico, o il caso delle cellule Jurkat esposte alla curcumina, un polifenolo naturale dotato di attività antiossidanti, antiamiloidi e antitumorali. Infatti, sia la cladribina che la curcumina sono capaci di indurre l'attivazione del sistema delle caspasi senza che ciò determini la frammentazione del DNA in oligonucleosomi. Tuttavia, dal momento che la curcumina è stata utilizzata con successo nell'induzione del caratteristico *laddering* del DNA in 180-200 pb nelle cellule umane di epatoblastoma e in quelle leucemiche promielocitiche, è stato ipotizzato che l'attivazione o meno di questo processo sia strettamente correlato al tipo di cellule utilizzato (34). Anche l'effetto del climacostolo sembra essere correlato con la linea cellulare sulla quale viene sperimentato, come indica l'induzione della frammentazione del DNA in oligonucleosomi in tutte le cellule tumorali esaminate, ad eccezione delle cellule A431 nelle quali invece la tossina induce il taglio del DNA in grossi frammenti di 50/300 kb.

Riguardo al meccanismo d'azione del climacostolo, è stato recentemente osservato che esso induce cambiamenti morfologici in mitocondri di epatociti di ratto e che è in grado di inibire la catena respiratoria a livello del complesso enzimatico I (35). Queste osservazioni, unite all'evidenza che il climacostolo risulta maggiormente citotossico verso le cellule tumorali, piuttosto che verso quelle normali, suggerisce che il bersaglio primario della tossina sia rappresentato dai mitocondri. Tale ipotesi è in accordo con i dati sperimentali raccolti da diversi ricercatori che hanno ripetutamente confermato la prevalente dipendenza energetica delle cellule tumorali dal processo glicolitico, dovuta alla più o meno marcata inefficienza dei mitocondri e, in particolare, della catena respiratoria. In effetti, nelle cellule cancerogene con aumentato metabolismo glicolitico, i mitocondri appaiono morfologicamente alterati, meno numerosi e con una funzionalità alterata rispetto a quelli delle cellule normali (36). Questo *fenotipo glicolitico* è stato individuato in una varietà di tumori e sembra essere associato ad alterazioni del DNA mitocondriale, comprendenti mutazioni puntiformi e estese delezioni, che probabilmente inficiano la funzione respiratoria, dal momento che il DNA mitocondriale codifica per 13 proteine della catena respiratoria, ed è maggiormente esposto a danni rispetto al DNA nucleare. Infatti, con le sue ridotte dimensioni (16.569 pb), il DNA mitocondriale manca di introni e di istoni protettivi, ed è dotato di una limitata capacità ripartiva. In conseguenza dei sopraelencati danni genetici e biochimici, le cellule cancerose sono, in effetti, più suscettibili di quelle normali agli effetti di sostanze farmacologiche, che possono indurre la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e il rilascio nel citoplasma di fattori proapoptotici.

Secondo molti Autori, tra i diversi fattori che possono determinare danni ai mitocondri e, in particolare, alla catena respiratoria, le specie reattive dell'ossigeno (SRO) rivestono un ruolo di primo piano. Un aumento nella generazione di SRO associato al blocco della proliferazione cellulare e all'induzione di apoptosi è stato descritto per diverse linee tumorali esposte a diverse sostanze. Una di queste sostanze, il rotenone, originariamente utilizzato per dimostrare il flusso degli elettroni dal NADH all'ossigeno, si è dimostrato capace di inibire il complesso I sia in cellule HL60 in coltura sia in mitocondri isolati, inducendo l'apoptosi con rilascio del citocromo *c* (Cit-*c*), attivazione della caspasi-3 e frammentazione del DNA (37). Anche nelle cellule HL60 esposte al climacostolo si è osservato un rapido aumento delle SRO e una conseguente attivazione del processo apoptotico, caratterizzato da deplezione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), attivazione delle caspasi-9/3 e frammentazione del DNA nucleare.

Inoltre, la mancata attivazione delle caspasi in cellule esposte contemporaneamente al climacostolo e all'agente antiossidante *N*-acetil-cisteina, ha dimostrato che l'attivazione dell'apoptosi nella linea leucemica HL60 è mediata dalle SRO che, come indicato dalla variazione del $\Delta\Psi_m$, agiscono primariamente a livello dei mitocondri.

Il climacostolo come antiparassitario: attività contro *Toxoplasma gondii*

L'attività antibatterica di alcuni composti resorcinolici descritta da diversi Autori (21, 22) e la dimostrata attività antiparassitaria di altri metaboliti protozoari, quali l'euplotina C (17) ci hanno indotto ad avviare studi sulla possibile attività antimicrobica del climacostolo. In effetti, l'utilizzo di questa tossina da parte di *C. virens* come strumento di difesa nei confronti di altri protozoi loro predatori suggerisce la possibilità che tale sostanza possa essere attiva anche contro altre specie di protozoi e in particolare quelli parassiti. La ricerca di nuovi principi attivi di origine naturale, sempre in sviluppo per via dei limiti, quali per esempio gli effetti collaterali, dei farmaci di sintesi induce a valutare attentamente l'uso di sostanze naturali e in particolare proprio le sostanze prodotte da organismi evolutivamente vicini all'agente parassitario.

In questo contesto, e per la prima volta sino ad ora, abbiamo trattato protozoi parassiti del genere *Toxoplasma* cresciuti in colture *in vitro* di fibroblasti umani (HFF) con climacostolo sintetizzato chimicamente. *Toxoplasma gondii* è il protozoo agente dell'infezione zoonotica denominata toxoplasmosi ed è in grado d'infettare anche l'uomo provocando gravi conseguenze al feto quando una donna contrae l'infezione per la prima volta nel corso di una gravidanza. Esso rappresenta un serio pericolo anche per l'uomo immunodepresso. Proprio in queste categorie di soggetti la terapia classica è talvolta poco efficiente o troppo aggressiva ed è quindi auspicabile la sperimentazione di nuove molecole (38, 39).

Allo scopo di ottenere una prima indicazione sull'attività del climacostolo sui parassiti in coltura *in vitro* abbiamo scelto questo doppio schema sperimentale:

– *Esperimento A*

1. Infezione dei fibroblasti (HFF) cresciuti a confluenza con mezzo di coltura completo (Minimum Essential Medium, MEM, con 10% Foetal Calf Serum, FCS) con trofozoiti di *T. gondii*, ceppo virulento RH.
2. Sostituzione del MEM con tampone fosfato (PBS) per allontanare l'FCS, dopo due giorni dall'infezione e quando il parassita è ancora in fase endocellulare.
3. Trattamento della coltura con 100 μ g di climacostolo sciolto in etanolo al 70%, dopo 12 ore dalla sostituzione del mezzo e quando i parassiti sono per lo più fuoriusciti dalle cellule.
4. Osservazione dello stato dei parassiti, con microscopio ottico rovesciato dopo 12, 24 e 76 ore dal trattamento.
5. Prova d'infezione di nuove colture di fibroblasti in MEM con i parassiti così trattati.

– *Esperimento B*

1. Infezione dei fibroblasti (HFF) cresciuti a confluenza con mezzo di coltura completo (*Minimum Essential Medium*, con 10% Foetal Calf Serum, FCS) con tachizoiti di *T. gondii*, ceppo virulento RH.
2. Trattamento della coltura con 100 μ g di climacostolo sciolto in etanolo al 70%, dopo due giorni e mezzo dall'infezione e quando i parassiti sono per lo più fuoriusciti dalle cellule.

La concentrazione della sostanza è suggerita da studi precedentemente compiuti in studi precedenti (13, 33)

3. Osservazione dello stato dei parassiti, con microscopio ottico rovesciato dopo 12, 24 e 76 ore dal trattamento.
4. Prova d'infezione di nuove colture di fibroblasti in MEM con i parassiti così trattati.

Per controllo, colture cellulari di HFF non infettate con il parassita e infettate con *T. gondii*, sono state mantenute in PBS o trattate solo con etanolo al 70% per valutarne gli eventuali effetti.

Le evidenze sperimentali ottenute finora con l'utilizzo della sola microscopia ottica hanno evidenziato il quadro di eventi di seguito riportato.

– *Esperimento A*

1. Dopo 12 ore dal trattamento i fibroblasti presentano un aspetto apoptotico e i tachizoiti liberi appaiono modificati nella forma in quanto tondeggianti e vescicolari e non più infettivi se inoculati in una coltura fresca di fibroblasti. Era, inoltre, evidente una disaggregazione dei parassiti intracellulari (prima organizzati in pseudocisti).
2. Dopo 24 e 72 ore dal trattamento i fibroblasti presentano un aspetto apoptotico, i parassiti sono ridotti a *ghost* di membrane e, ovviamente, non sono più infettivi se inoculati in una coltura fresca di fibroblasti.

– *Esperimento B*

1. Dopo 12 ore dal trattamento i fibroblasti presentano un aspetto apoptotico ma i parassiti appaiono di aspetto normale e vitali, ancora infettivi se inoculati in una coltura fresca di fibroblasti, e non c'è evidenza di alterazioni a carico delle pseudocisti intracellulari.
2. Dopo 24 e 72 ore dal trattamento i fibroblasti presentano un aspetto apoptotico e i parassiti sono di forma normale ma non più infettivi se inoculati in una coltura fresca di fibroblasti.

Nei controlli, d'altronde, cellule e parassiti trattati con il solo etanolo al 70% fino a 72 ore non mostrano alterazioni mentre, come prevedibile, le colture cellulari mantenute in solo PBS mostrano sofferenza già dopo 12 ore.

Sintetizzando questi risultati preliminari possiamo affermare che apparentemente il climacostolo, almeno alla concentrazione qui sperimentata, induce un danno cellulare sia sui fibroblasti che sui parassiti, almeno nel loro stadio di tachizoiti (stadio disseminato a livello organico nell'ospite). Tale danno, se prolungato nel tempo, rende i parassiti modificati e non più infettanti, ma tale attività del climacostolo è evidente solo se il trattamento è effettuato in assenza di terreno di coltura completo (MEM+FCS) probabilmente per un'attività inibente della sostanza in studio da parte del siero bovino, in esso contenuto.

A questo proposito bisogna sottolineare che l'ambiente fisiologico in cui si muove il parassita nella sua forma infettante nell'ospite intermedio è l'ambiente circolatorio e sistemico, ricco di siero e, quindi, di questo elemento è necessario tener conto in una futura sperimentazione del climacostolo per trattamento d'infezioni *in vivo*.

Due degli eventi rilevati al microscopio ottico rimangono da valutare: l'effetto apoptotico nei confronti dei parassiti (per i quali è stata già dimostrato un macchinario apoptotico, 40f.) e l'effetto "disaggregante" sui parassiti intracellulari.

Conclusioni

Nell'opinione di alcuni ricercatori, l'uso di sostanze che abbiano come bersaglio i mitocondri delle cellule tumorali per innescare un processo apoptotico potrebbe rappresentare una strategia ottimale per la chemioprevenzione e la terapia del cancro (34, 36, 37). In questa prospettiva, i

risultati da noi ottenuti potrebbero rappresentare il punto di partenza per uno studio più ampio *in vitro* e *in vivo* che permetta la comprensione approfondita del meccanismo d'azione del climacostolo e la valutazione del suo potenziale utilizzo in chemioterapia.

Per quanto riguarda, invece, l'attività antiparassitaria del climacostolo da noi studiata nei confronti di *T. gondii* al momento non abbiamo dati per quantizzare l'effetto della tossina sul parassita, anche se è in corso una ripetizione degli esperimenti con l'applicazione di test sull'attività mitocondriale dei tachizoiti, e su altri parametri dell'attività apoptotica sui parassiti.

Nuovi esperimenti dovranno essere condotti sia *in vitro* con concentrazioni diverse di climacostolo, sia *in vivo* nel modello animale. Con questi studi preliminari possiamo per il momento affermare di avere individuato per la prima volta un'attività antiparassitaria del climacostolo (già dimostrata per altri derivati resorcinolici) e in particolare nei confronti del parassita da noi studiato, *T. gondii*, la cui importanza in medicina umana è più che mai nota.

Bibliografia

1. Da Rocha AB, Lopes RM, Schwartsmann G. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:364-9.
2. Höfle G, Pohlen S, Uhlig G, Kabbe K, Schumacher D. Keronopsins A and B, chemical defence substances of the marine ciliate *Pseudokeronopsis rubra* (Protozoa): identification by ex vivo HPLC. *Angew Chem Int Ed Engl* 1994;33:1495-7.
3. Dini F, Guella G, Giubbilini I, Mancini I, Pietra F. Control of interspecific relationships in marine ciliate protists by most evolved natural products. *Naturwissenschaften* 1993;80:84-6.
4. Guella G, Dini F, Tomei A, Pietra F. Preuplotin, a putative biogenetic precursor of the euplotins, bioactive sesquiterpenoids of the marine ciliated protist *Euplotes crassus*. *J Chem Soc Perkin Trans* 1994;1:161-6.
5. Guella G, Dini F, Pietra F. From epiraikovenal, an instrumental niche-exploitation sesquiterpenoid of some strains of the marine ciliated protist *Euplotes raikovi*, to an unusual intramolecular tele dienone-olefin [2+2] photocycloaddition. *Helv Chim Acta* 1995;78:1747-54.
6. Rosini G, Laffi F, Marotta E, Pagani L, Righi P. Total synthesis of the marine sesquiterpenoid raikovenal through a novel utilization of the bicyclo [3.2.0] heptenone approach. *J Org Chem* 1998;63:2389-91.
7. Guella G, Dini F, Pietra F. Epoxyfocardin and its putative biogenetic precursor, focardin, bioactive, new skeleton, diterpenoids of the marine ciliate *Euplotes focardii* from Antarctica. *Helv Chim Acta* 1996;79:439-448.
8. Gioffré D, Ghetti F, Lenci F, Paradiso C, Dai R, Song PS. Isolation and characterization of the presumed photoreceptor protein of *Blepharisma japonicum*. *Photochem Photobiol* 1993;58:275-9.
9. Ceccucci G, Shoemaker RS, Bini E, Cerny R, Tao N, Hyon JS, Gioffré D, Ghetti F, Lenci F, Song PS. Chemical structure of blepharismine, the photosensor pigment for *Blepharisma japonicum*. *J Am Chem Soc* 1997;119:5762-3.
10. Tao N, Orlando M, Hyon JS, Gross M, Song PS. A new photoreceptor molecule from *Stentor coeruleus*. *J Am Chem Soc* 1993;115:2526-8.
11. Cameron DW, Riches AG. Synthesis of stentorian. *Tetrahedron Lett* 1995;36:2331-4.
12. Mukherjee P, Fulton DB, Halder M, Han X, Armstrong DW, Petrich JW, Lobban CS. Maristentorin, a novel pigment from the positively phototactic marine ciliate *Maristentor dinoferus*, is structurally related to hypericin and stentorian. *J Phys Chem* 2006;110:6359-64.

13. Miyake A, Buonanno F, Saltalamacchia P, Masaki ME, Iio H. Chemical defence by means of extrusive cortical granules in the heterotrich ciliate *Climacostomum virens*. *Europ J Protistol* 2003;39:25-36.
14. Savoia D, Avanzini C, Alice T, Callone E, Guella G, Dini F. Antimicrobial activity of euplotin C, the sesquiterpene taxonomic marker from the marine ciliate *Euplotes crassus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(10):3828-33.
15. Cervia D, Martini D, Garcia-Gil M, Di Giuseppe G, Guella G, Dini F, Bagnoli P. Cytotoxic effects and apoptotic signalling mechanisms of the sesquiterpenoid euplotin C, a secondary metabolite of the marine ciliate *Euplotes crassus*, in tumour cells. *Apoptosis* 2006;11(5):829-43.
16. Cervia D, Garcia-Gil M, Simonetti E, Di Giuseppe G, Guella G, Bagnoli P, Dini F. Molecular mechanisms of euplotin C-induced apoptosis: involvement of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and proteases. *Apoptosis* 2007;12(8):1349-63.
17. Lobban CS, Hallam SJ, Mukherjee P, Petrich JW. photophysics and multifunctionality of hypericin-like pigments in heterotrich ciliates: a phylogenetic perspective. *Photochem Photobiol* 2007;83:1074-94.
18. Pant B, Kato Y, Kumagai T, Matsuoka T, Sugiyama M. Blepharismine produced by a protozoan *Blepharisma* functions as an antibiotic effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1997;155:67-71.
19. Kozubek A, Tyman JHP. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. *Chem Rev* 1999;99:1-25.
20. Lytollis W, Scannel RT, An H, Murty VS, Reddy KS, Barr JR, Hecht SM 5-Alkylresorcinols from *Hakea trifurcata* that cleave DNA. *J Am Soc* 1995;117:12683-90.
21. Singh US, Scannel RT, An H, Carter BJ, Hecht SM. DNA cleavage by di- and trihydroxyalkylbenzenes. Characterization of products and the roles of O₂, Cu(II), and alkali. *J Am Soc* 1995;117:12691-9.
22. Kozubek A, Zarnowski R, Stasiuk M, Gubernator J. Natural amphiphilic phenols as bioactive compounds. *Cell Mol Biol Lett* 2001;6:351-5.
23. Gasiorowski K, Szyba K, Brokos B, Kozubek A. Antimutagenic activity of alkylresorcinols from cereal grains. *Cancer Letters* 1996;106:109-15.
24. Barbini L, Lopez P, Ruffa J, Martino V, Ferraro G, Campos R, Cavallaro L. Induction of apoptosis on human hepatocarcinoma cell lines by an alkyl resorcinol isolated from *Lithraea molleoides*. *World J Gastroenterol* 2006;7:5959-63.
25. Filip P, Anke T, Sterner O. 5-(2'-oxoheptadecyl)-resorcinol and 5-(2'-oxononadecyl)-resorcinol, cytotoxic metabolites from a wood-inhabiting basidiomycete *Z. Naturforsch* 2002;57:1004-8.
26. Itokawa H, Totsuka N, Nakamura K, Maezuru M, Takeya K, Kondo M, Inamatsu M, Morita H. A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long-chain phenols from *Ginkgo biloba* L. *Chem Pharm Bull* 1989;37:1619-21.
27. Buonanno F. Variations in the efficiency of ciliate extrusomal toxins against a common ciliate predator, the catenulid *Stenostomum sphagnetorum*. *Ital J Zool* 2005;72:293-5.
28. Masaki ME, Harumoto T, Terazima M, Miyake A, Usuki Y, Iio H. Climacostol, a defense toxin of the heterotrich ciliate *Climacostomum virens* against predators. *Tetrahedron Lett* 1999;40:8227-9.
29. Masaki ME, Hiro S, Usuki Y, Harumoto T, Terazima M, Buonanno F, Miyake A, Iio H. Climacostol, a defense toxin of *Climacostomum virens* (protozoa, ciliata), and its congeners. *Tetrahedron* 2004;60:7041-8.
30. Buonanno F, Quassinti L, Bramucci M, Amantini C, Lucciarini R, Santoni G, Iio H, Ortenzi C. The protozoan toxin climacostol inhibits growth and induces apoptosis of human tumor cell lines. *Chem-Biol Interact* 2008;176:151-64.

31. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis: mediator or mode of cell killing by anticancer agents? *Drug Resist Updat* 2001;4:135-6.
32. Muto J, Tanabe Y, Kawai K., Iio H. Inhibition of mitochondrial respiration by climacostol. *Jpn J Protozool* 2003;36:25-6.
33. Hail Jr. N, Carter BZ, Konopleva M, Andreff M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 2005;11:889-904.
34. Li N, Ragheb EK, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson J.P. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production *J Biol Chem* 2003;278:8516-25.
35. Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*.2009;117(5-6):458-76. Review.
36. Iaccheri B, Fiore T, Papadaki T, Androudi S, Janjua S, Bhaila I, Stephen Foster C. Adverse drug reactions to treatments for ocular toxoplasmosis: a retrospective chart review. *Clin Ther* 2008;30(11):2069-74.
37. Carmen JC, Sinai AP. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol Microbiol* 2007;64(4):904-16. Review.

ATTIVITÀ DELLA LATTOFERRINA BOVINA SULL'INFEZIONE DA VIRUS INFLUENZALE

Agostina Pietrantoni (a), Antonella Tinari (a), Maria Grazia Ammendolia (a), Eleonora Dofrelli (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 e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'influenza è un'infezione virale acuta e altamente contagiosa delle vie respiratorie superiori. La sindrome influenzale costituisce un serio problema di sanità pubblica e una rilevante fonte di spesa a causa dei costi sanitari diretti e indiretti misurabili in termini di morbilità, ospedalizzazioni e mortalità (1). Sebbene la vaccinazione rappresenti la migliore strategia di prevenzione dell'infezione, non sempre si è dimostrata efficace soprattutto a causa della estrema variabilità del virus (2). Esistono in commercio due classi di farmaci antinfluenzali, utilizzati sia per la profilassi sia per il trattamento, che hanno lo scopo di ridurre soprattutto l'intensità e la durata della malattia: gli inibitori della proteina M2, quali amantadina e rimantadina, che impediscono la liberazione del genoma virale nelle cellule, e gli inibitori della neuraminidasi, quali oseltamivir e zanamivir, che impediscono il rilascio di particelle virali mature. Va comunque tenuto conto che l'efficacia di questi farmaci dipende in modo cruciale dal tempo di somministrazione, che deve essere tempestivo, e che spesso possono provocare effetti collaterali più o meno seri e soprattutto favorire lo sviluppo di ceppi virali mutanti resistenti (3). Sulla base di queste osservazioni appare quindi estremamente urgente la ricerca di farmaci alternativi utilizzabili anche da quei pazienti che non possono essere vaccinati, perché immunocompromessi, o che non possono essere curati con la terapia convenzionale (4). Negli ultimi anni sono state condotte numerose ricerche mirate all'individuazione di nuovi farmaci antivirali di origine naturale. In particolare, basandosi sull'osservazione che i bambini allattati al seno contraggono infezioni respiratorie in misura significativamente minore rispetto ai bambini allattati con latte artificiale, molta attenzione è stata rivolta alle sostanze derivate dal latte. Diversi studi hanno dimostrato che tra le molecole ad attività antimicrobica presenti nella frazione proteica non anticorpale del latte umano la lattoferrina riveste un ruolo molto importante in quanto dotata di attività immunomodulante, antinfiammatoria, battericida e antivirale (5-7). La lattoferrina è una glicoproteina monomerica, del peso molecolare di circa 80 kDa, appartenente alla famiglia delle transferrine, composta da una singola catena polipeptidica suddivisa in due lobi globulari simmetrici (lobo N e lobo C), ciascuno dei quali è in grado di legare un atomo di ferro. Il nostro gruppo di ricerca si occupa da diversi anni dello studio dell'attività antimicrobica di questa proteina e, in particolare, i risultati delle nostre ricerche hanno dimostrato che la lattoferrina è in grado di inibire l'infezione da rotavirus, poliovirus, adenovirus, echovirus, polyomavirus e herpesvirus (8-22). In questo studio abbiamo analizzato l'effetto della lattoferrina sull'infezione da virus influenzale in un sistema *in vitro*.

Risultati e conclusioni

Come modello sperimentale sono stati utilizzati un ceppo di virus influenzale di tipo A, sottotipo H₃N₂, la lattoferrina bovina (bLf) e la linea cellulare renale di cane *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK). Sono stati condotti esperimenti preliminari per verificare la capacità della bLf di inibire l'effetto citopatico indotto dal virus dell'influenza e i risultati ottenuti hanno dimostrato che il trattamento con la proteina è in grado di prevenire tale effetto in modo dose-dipendente. Poiché è stato riportato in letteratura che il virus dell'influenza è in grado di indurre apoptosi in diverse linee cellulari (23), sono stati condotti esperimenti volti a verificare se anche nel nostro sistema sperimentale le cellule infettate andassero incontro a morte cellulare programmata. Sulla base dei risultati dell'analisi subcellulare, che hanno confermato tale ipotesi, abbiamo analizzato la possibile attività anti-apoptotica della bLf. I risultati ottenuti, sia con indagini di tipo morfologico che con l'analisi della frammentazione del DNA, hanno dimostrato che il trattamento con la lattoferrina è in grado di prevenire la morte cellulare programmata indotta dal virus. L'apoptosi, è un processo altamente regolato che prevede il coinvolgimento di specifiche proteasi cisteiniche denominate caspasi (24). In particolare l'attivazione della caspasi 3 è coinvolta sia nella fase di esecuzione del processo apoptotico (durante la quale le cellule subiscono cambiamenti morfologici quali la frammentazione del DNA, la condensazione della cromatina e la formazione dei corpi apoptotici) che nella morfogenesi del virus influenzale (25). Sono stati quindi condotti esperimenti volti ad analizzare un possibile effetto del trattamento con bLf sull'attivazione della caspasi 3. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'infezione virale induce un aumento significativo dell'attività della caspasi 3 e che il trattamento con bLf è in grado di inibire in modo specifico questa attivazione. Successivamente sono state condotte analisi, tramite microscopia elettronica a trasmissione, per visualizzare le modificazioni cellulari indotte dall'infezione e gli effetti del trattamento con lattoferrina sulle cellule e sulla produzione della progenie virale. I risultati di questi studi hanno dimostrato che le cellule infettate in presenza di bLf possiedono caratteristiche ultrastrutturali comparabili alle cellule di controllo non infette mentre la quasi totalità delle cellule infettate mostra i tipici segni della morte cellulare programmata quali marginalizzazione della cromatina, formazione di micronuclei e condensazione dell'intera cellula. Nella maggior parte delle cellule in apoptosi è inoltre presente un'abnorme dilatazione del reticolo endoplasmatico (Figura 1).

Studi precedenti hanno dimostrato che l'inibizione dell'attivazione della caspasi 3 ha come conseguenza il blocco della morfogenesi del virus e che tale blocco è dovuto all'accumulo del complesso della ribonucleoproteina virale all'interno del nucleo della cellula infetta (25-26). Sulla base di queste conoscenze, sono stati condotti esperimenti volti a verificare se il trattamento con bLf, riducendo significativamente l'attività della caspasi-3, fosse anche in grado di sequestrare la ribonucleoproteina all'interno del nucleo delle cellule infette. I risultati ottenuti in seguito all'analisi dell'espressione della nucleoproteina (NP) negli estratti cellulari e citoplasmatici di cellule infettate in presenza o in assenza di bLf hanno dimostrato che nelle cellule infettate e trattate con bLf la NP virale è rivelabile solo nel compartimento nucleare (Figura 2, linea A) mentre nelle cellule infettate è presente sia nel nucleo che nel citoplasma (linee C e D).

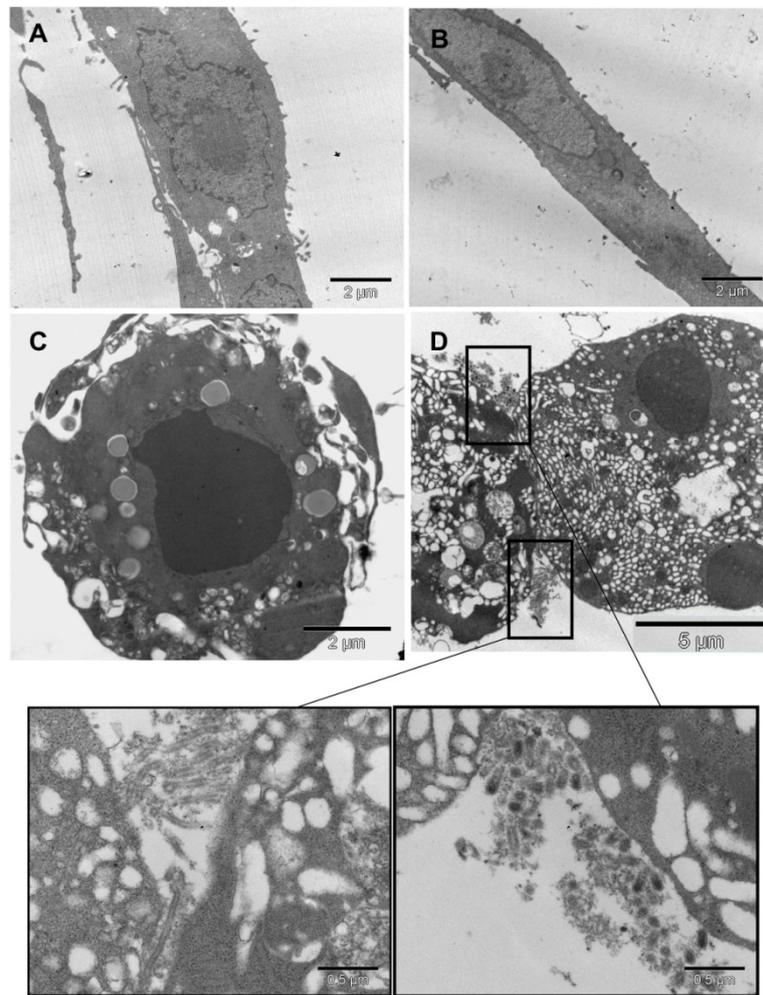


Figura 1. A) Cellula MDCK di controllo non infettata; B) Cellula MDCK infettata e trattata con bLf; C e D) Cellule MDCK infettate in apoptosi; D) Da notare la grande produzione di virioni completi (inserti)

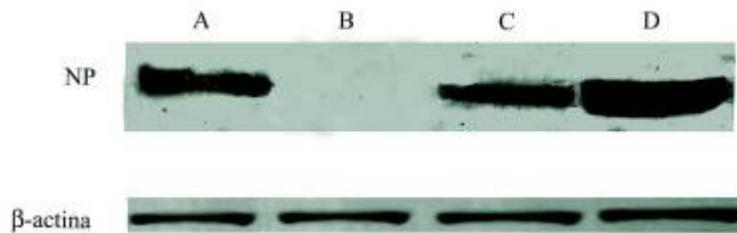


Figura 2. Immunorivelazione dell'espressione della NP negli estratti nucleari e citoplasmatici; linea A: estratto nucleare di cellule infettate e trattate con bLf; linea B: estratto citoplasmatico di cellule infettate e trattate con bLf; linea C: estratto nucleare di cellule infettate; linea D: estratto citoplasmatico di cellule infettate

Nel loro insieme i risultati di questo studio hanno dimostrato 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 le nostre ricerche 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. Questi dati, oltre a dimostrare un'attività della bLf diretta in modo specifico verso la cellula infetta, rappresentano un primo passo negli studi volti a verificare se la lattoferrina possa essere un buon candidato per il trattamento delle infezioni da virus influenzale.

Bibliografia

1. Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res* 2008;78(1):91-102.
2. Nichol KL. Efficacy and effectiveness of influenza vaccination. *Vaccine* 2008;12:26 Suppl 4.
3. Tappenden P, Jackson R, Cooper K, Rees A, Simpson E, Read R, Nicholson K. Amantadine, oseltamivir and zanamivir for the prophylaxis of influenza (including a review of existing guidance no. 67): a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2009;13(11):1-246.
4. Hayden F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis* 2009;48 Suppl 1:S3-13.
5. Kanyshkova TG, Nevinsky GA. Lactoferrin and its Biological Function. *Biochemistry (Moscow)* 2001;66(1):1-7.
6. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin-a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 2003;40:395-405.
7. González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Ag* 2009;33(4):301-8.
8. Marchetti M, Superti F. Antiviral activity of lactoferrin. In: Pandalai, S. G. (Ed.), *Recent developments in antiviral research*. Trivandrum, India: Transworld Research Network, 2001. p. 193-203.
9. Superti F, Ammendolia MG, Valenti P, Seganti L. Antiroviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med Microbiol Immunol* 1997;186:86-93.
10. Superti F, Siciliano R, Rega B, Giansanti F, Valenti P, Antonini G. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim Biophys Acta* 2001;1528:107-15.
11. Marchetti M, Superti F, Ammendolia M G, Rossi P, Valenti P, Seganti L. Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron, manganese and zinc saturated lactoferrin. *Med Microbiol Immunol* 1999;187:199-204.
12. Arnold D, Marchetti M, Pietrantonio A, Valenti P, Seganti L, Superti F. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Res* 2002;53:153-8.
13. Di Biase AM, Pietrantonio A, Tinari A, Siciliano R, Valenti P, Antonini G, Seganti L, Superti F. Heparin-interacting sites of bovine lactoferrin are involved in anti-adenovirus activity. *J Med Microbiol* 2003;69:495-502.
14. Pietrantonio A, Di Biase AM, Tinari A, Marchetti M, Valenti P, Seganti L, Superti F. Bovine lactoferrin inhibits adenovirus infection by interacting with viral structural polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(8):2688-91.

15. Tinari A, Pietrantonio A, Ammendolia MG, Valenti P, Superti F. Inhibitory activity of bovine lactoferrin against echovirus induced programmed cell death in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:433-8.
16. Pietrantonio A, Ammendolia MG, Tinari A, Siciliano R, Valenti P, Superti F. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of Echovirus 6 in vitro infection. *Antiviral Res* 2006;69(2):98-106.
17. Ammendolia MG, Pietrantonio A, Tinari A, Valenti P, Superti F. Bovine Lactoferrin inhibits echovirus endocytic pathway by interacting with viral structural polypeptides. *Antiviral Res* 2007;73(3):151-60.
18. Longhi G, Pietropaolo V, Mischitelli M, Longhi C, Conte MP, Marchetti M, Tinari A, Valenti P, Degener AM, Seganti L, Superti F. Lactoferrin inhibits early steps of human BK polyomavirus infection. *Antiviral Res* 2006;72(2):145-52.
19. Marchetti M, Longhi C, Conte MP, Pisani S, Valenti P, Seganti L. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus Type 1 adsorption to Vero cells. *Antiviral Res* 1996;29:221-31.
20. Marchetti M, Pisani S, Antonini G, Valenti P, Seganti L, N Orsi. Metal complexes of bovine lactoferrin inhibit in vitro replication of herpes simplex virus type 1 and 2. *BioMetals* 1998;11:89-94.
21. Marchetti M, Trybala E, Superti F, Johansson M, Bergstrom T. Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. *Virology* 2004;318:405-13.
22. Ammendolia MG, Marchetti M, Superti F. Bovine lactoferrin prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 1 in Green Monkey Kidney cells. *Antiviral Res* 2007;76(3):252-62.
23. Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-sissoko N, Evans D. Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol* 1999;468:3667-73.
24. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-6.
25. Wurzer T, Planz WJ, Ehrhardt O, Giner C, Silberzohn M, Pleschka T, Ludwig S. Caspase 3 activation is essential for efficient influenza virus propagation. *EMBO J* 2003;22:2717-8.
26. Wurzer WJ, Ehrhardt C, Pleschka S, Berberich-Siebelt F, Wolff T, Walczak H, Planz O, Ludwig S. NF- κ B dependent induction of TRAIL and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem* 2004;279:30931-7.

SESSIONE V
Sostanze naturali: le applicazioni cliniche

COMPLESSITÀ IN NATURA E SALUTE UMANA

Andrea Geraci

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

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. Siamo una rete complessa che sta in equilibrio utilizzando retroazioni (*feedback*) positive e negative.

Complessità

“Se si potesse definire la complessità in maniera chiara, il termine non sarebbe più complesso”. Questo concetto è stato espresso da Edgar Morin, sociologo, uno dei più famosi studiosi dell'argomento (1). Il termine complessità è utilizzato in molte discipline: matematica, sociologia, biologia, economia (2-6). Tra le caratteristiche del sistema complesso vi è la capacità di aumentare la propria complessità e la capacità di auto-mantenimento e, nei sistemi biologici in particolare, quella di auto-guarigione.

Un esempio abbastanza rappresentativo in ambito biomedico può essere considerato il network neuro-endocrino-immunitario e il relativo ruolo centrale del linfocita T (timo-dipendente): secondo alcune ricerche su modelli animali si potrebbe ipotizzare che il timo “manda” e “riceve” informazione nell'ambito dei sistemi nervoso, ghiandolare e immunitario (7). In particolare gli ormoni tiroidei e ipofisari regolano la secrezione di timulina, gli ormoni timici modulano le ghiandole endocrine e i circuiti neuroendocrini mentre ormoni e neuropeptidi influenzano la proliferazione di timociti. È stata inoltre riscontrata la produzione intratimica di corticosterone e di ormoni adenoipofisari da parte di cellule timiche e l'espressione di un neuropeptide da parte del microambiente timico. In termini più semplicistici possiamo dire che il timo “parla” ai sistemi endocrino, nervoso e immunitario e li “ascolta”.

In un certo senso dovremmo rivedere i concetti di compartimentazione dei nostri sistemi, immunitario, nervoso ecc., in termini di entità non separate ma che interagiscono tra loro come un'unica “macchina” umana complessa, nella quale recettori e citochine svolgono un ruolo fondamentale per la comunicazione tra distretti molto distanti tra loro. Da qui nasce l'esigenza di approfondire alcune discipline come la psico-neuro-endocrino-immunologia, la psicosomatica, gli studi dei sistemi complessi e dell'omeostasi per capire meglio i meccanismi che stanno alla base del rapporto mente-corpo, di cui tanto si discute in questi ultimi tempi, per scoprire altri segreti del sottile equilibrio tra salute e malattia.

Salute e malattia

Il benessere della persona dipende da numerosi fattori così come veniva sottolineato già nel 1946 nello statuto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità: la salute è stato di completo di

benessere fisico, psichico e sociale. I motivi della perdita della salute vanno così ricercati in cause genetiche, 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. Altri fattori molto importanti sono gli errati stili di vita come la sedentarietà, l'iperalimentazione, il fumo di tabacco, l'abuso di alcool e droga o la scarsa attenzione rivolta ai ritmi vitali (sonno-veglia, fame-sazietà ecc.).

Sostanze naturali e complessità umana

Le sostanze naturali come ad esempio gli estratti vegetali oppure il latte e i suoi derivati, i sali minerali, alcuni prodotti di origine batterica o fungina, 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 approfondire le numerose conoscenze che si avvalgono anche di millenni di utilizzo pratico; tali esperienze dovrebbero, cercando di non stravolgerne il loro nucleo epistemologico, essere studiate utilizzando anche la metodologia della *Evidence-Based Medicine* (EBM) sottoponendole così alla valutazione dell'efficacia e della sicurezza: questo sforzo è dimostrato dal numero sempre più crescente dei lavori scientifici pubblicati su prestigiose riviste internazionali. 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 ricchezza di conoscenze soprattutto per le numerose sostanze di origine vegetale che vengono utilizzate da anni, da secoli.

Approccio olistico

Nella maggior parte delle "altre" medicine, la persona è vista in senso olistico, (l'olismo è la teoria secondo cui l'intero è un tutto superiore rispetto alla somma delle sue parti) ma anche alla luce della sua complessità, nel senso che siamo tutti simili ma anche 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. Per il *National Center for Complementary and Alternative Medicine* (NCCAM) le medicine alternative e complementari possono essere distinte in:

- Terapie biologiche.
- Medicina energetica.
- Manipolazioni fisiche e ginnastiche.
- Interventi sulla connessione mente-corpo.
- Sistemi medici strutturati.

I sistemi medici strutturati a loro volta possono essere distinti in quelli di origine orientale, come la medicina tradizionale cinese, la medicina ayurvedica, la medicina tradizionale tibetana, la medicina tradizionale giapponese (*kampo*) e quelli di origine occidentale: medicina omeopatica, medicina antroposofica, naturopatia. Una delle caratteristiche dei diversi sistemi medici strutturati è quella secondo cui non vengono utilizzati solo sostanze naturali come

metodo di cura, ma anche tutta una serie di approcci terapeutici o consigli che possiamo definire igienici e che hanno molto a che fare con la medicina preventiva. Quindi da un lato si ha l'utilizzo di prodotti del mondo vegetale, sostanze di origine animale e minerale e dall'altro l'utilizzo di altri approcci che possiamo distinguere in modo molto generale in tre grandi gruppi:

- Terapie fisiche (ginnastiche, moxibustione, massaggi, agopuntura, elioterapia)
- Terapie artistiche (musica, canto, pittura, modellaggio, scultura, euritmia, biodramma)
- Consigli sugli stili di vita e approcci alla vita (dieta, autodeterminazione, meditazione, yoga, approccio olistico e spirituale, rapporto macro-microcosmo).

Questioni aperte

Le numerose conoscenze di fitoterapia delle medicine tradizionali in generale, rappresentano un enorme patrimonio di conoscenze ed esperienze empiriche che andrebbero verificate, laddove possibile, attraverso le metodiche della scienza moderna rappresentate sia dalla ricerca di base che dagli studi clinici. Sarebbe auspicabile in questo clima di rinnovato interesse per le sostanze naturali, perseguire e realizzare occasioni di confronto, di incontri per mezzo dei quali approfondire aspetti come efficacia e sicurezza delle cure: ad esempio studi clinici in cui vi sia l'associazione di sostanze, siano esse una pianta o un mix di piante con o senza altri approcci terapeutici usati in concomitanza (ad esempio agopuntura, massaggi, dieta, stili di vita, ginnastiche, meditazione ecc.). In questo contesto gli studi dovrebbero inoltre, laddove possibile, non snaturare il nucleo epistemologico di ciascun sistema medico strutturato.

Riallacciandoci al tema del rapporto mente-corpo e della complessità umana, sarebbe interessante soffermarsi poi su un tema come quello dell'effetto placebo (8). Se immaginiamo che in uno studio clinico il giudizio, il pensiero del paziente può essere influenzato, ad esempio dal personale che gli sottopone il consenso informato da firmare magari da un "camice bianco simpatico o antipatico" vedremo allora che il rapporto mente-corpo o mente-corpo-trattamento è un qualcosa di veramente "complesso" e necessita di studi con competenze multidisciplinari.

Un'altra questione attuale è rappresentata dalla problematica che riguarda il quesito di come valutare l'efficacia (terapeutica o salutistica o nutrizionale) di sostanze come gli integratori alimentari nei soggetti sani: sono quesiti che la stessa agenzia europea per la sicurezza alimentare (EFSA) si pone negli ultimi tempi. Un ultimo tema abbastanza attuale da segnalare è l'idea secondo cui c'è una relazione diretta tra l'utilizzo di sostanze naturali e di trattamenti complementari e una migliore qualità della vita (*quality of life* - QoL). Anche questo concetto dovrebbe essere studiato da vari punti di vista: da quello medico-biologico a quello economico, sociale e psicologico.

Conclusione

In questo contesto nasce l'esigenza di competenze trasversali, di multidisciplinarietà per osservare da vari punti di vista la persona, l'ambiente in cui vive, le varie possibili cure e sostanze che potrebbero riportarla da uno stato di malattia o squilibrio, ad uno di salute o equilibrio. Siamo di fronte alla possibilità di integrare modi di pensare e aspetti dualistici apparentemente anche diametralmente opposti, come ad esempio:

- Medicina scientifica e tradizionale
- Aspetto newtoniano e einsteiniano
- Aspetto quantitativo e qualitativo

- Aspetto materialistico e spirituale
- Molecola (aspetto newtoniano) e Complesso naturale, fitocomplesso (aspetto einsteiniano)

La possibilità di integrazione la si dovrebbe cercare caso per caso. Ad esempio, la molecola (di sintesi e/o naturale) è il cosiddetto proiettile per patologie acute e gravi mentre il complesso naturale potrebbe essere utilizzabile per patologie croniche meno gravi, soprattutto quelle “disfunzionali”. Ci sarebbero così diverse possibilità e gradi diversi di integrazione tra medicina “scientifica e i vari “approcci complementari”. D’altra parte la cosiddetta “ars medica” è unica così come è unica (nella sua complessità) la persona che richiede una cura.

Bibliografia

1. Morin E. La via della complessità. In: Bocchi G, Ceruti M (Ed.). *La sfida della complessità*. Milano: Feltrinelli; 1985. p 49-60.
2. Plsek PE, Greenhalgh T. Complexity science. The challenge of complexity in health care. *BMJ* 2001;323:625-8.
3. Sweeney K, Griffiths F. *Complexity and health care: an introduction*. Oxford: Radcliffe Medical Press; 2002.
4. Wilson T, Holt T. Complexity science. Complexity and clinical care. *BMJ* 2001;323:685-8.
5. Materia E, Baglio G. Health, science and complexity. *J Epidemiol Community Health* 2005;59:534-5.
6. Mele A, Materia E, Baglio G. *Salute e Complessità. Viaggio Nei Campi Del Sapere*. Il Mulino; 2007.
7. Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev* 2000;21(4):412-43.
8. Barrett B, Muller D, Rakel D, Rabago D, Marchand L, Scheder JC. Placebo, meaning, and health. *Perspect Biol Med* 2006;49(2):178-98.

STUDIO MODERNO DELLE PIANTE OFFICINALI: LE PIANTE ADATTOGENE

Mauro Serafini

Dipartimento di Biologia Vegetale, Sapienza Università di Roma

Introduzione

Nell'antichità, le droghe che avevano un effetto generalizzato duraturo nel tempo sono state indicate con il termine "Panacea" (dal greco "pan" (tutto) e "axos" (rimedio), ossia rimedio per tutti i mali. Nella mitologia greca, Panacea era la figlia di Asclepio (Esculapio in latino) e Lampezia (Epione) in grado di curare con le piante da ogni male qualsiasi essere vivente.

Nella medicina tradizionale dei paesi orientali si sono evidenziati una serie di rimedi vegetali, con un impiego destinato non ad un singolo organo bersaglio o ad una singola patologia:

- nella medicina Ayurvedica questi rimedi naturali vengono chiamati *rasayana*.
- nelle medicina tradizionale della Malesia e dell'Indonesia vengono chiamati *jamu*.
- in Cina vengono definiti *zi bu* o *hui fu* (col significato di tonico e ristorativo in mandarino).
- in Russia invece sono definiti *toniziruyuzhie sredstva* (sostanze toniche).

I concetti base

Il concetto di adattogeno nell'epoca moderna fu coniato la prima volta nel 1947 dallo scienziato russo Lazarev, studiando l'attività del dibazolo (2-benzilbenzilimidazolo), un dilatatore arterioso sviluppato in Francia, che aumentava la resistenza dell'organismo allo stress in studi sperimentali. Egli definì come adattogeni un gruppo di sostanze farmacologicamente attive, in grado di aumentare le resistenze aspecifiche dell'organismo, e così contrastare meglio i fattori di stress (1).

Seyle aveva già studiato gli effetti e le conseguenze di simili condizioni sull'organismo sano (2, 3). Infatti formulò la teoria della "sindrome generale di adattamento", consistente nell'individuazione di una risposta aspecifica, sempre uguale, dell'organismo a fattori di stress diversi, in grado di aumentare le capacità dello stesso nei confronti dei fattori di stress e quindi in grado di adattarsi a situazioni esterne. L'unico limite consiste nella quantità di riserve di difesa disponibili nell'organismo, non inesauribili, definite come "energie di adattamento".

I modelli per lo studio dello stress, utilizzati per stabilire l'effetto adattogeno, furono:

- Tolleranza al carico dinamico
- Stress indotto da suoni e vibrazioni
- Infezione batterica
- Stress emozionale

Brekhman, nel 1958, definì in modo preciso il concetto di adattogeno (4):

"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". Egli ha anche definito le caratteristiche di un adattogeno:

- Avere azione aspecifica
- Determinare l'aumento delle difese in stadi di stress fisico, chimico e biologico
- Agire in senso normalizzante (sempre in maniera aspecifica rispetto alla patologia)
- Essere privo di tossicità o in generale causare un disturbo minimo alle funzioni fisiologiche dell'organismo.

Possiamo quindi definire gli adattogeni come una nuova classe di regolatori metabolici (di origine naturale) in grado di aumentare la capacità dell'organismo di adattarsi a fattori ambientali e di evitare danni causati da tali fattori. Ci si pone però una domanda: gli effetti farmacologici e il modo di azione a livello biochimico degli adattogeni possono essere spiegati da regole generali? E inoltre: ci sono differenze tra gli adattogeni e le altre classi conosciute di regolatori metabolici e/o principi farmacologici? C'è differenza tra un adattogeno e uno stimolante?

La ricerca all'inizio

Ecco che le ricerche si dirigono verso due principali aree: studio dei meccanismi protettivi della cellula; studio dei mediatori nei sistemi di stress. Gli adattogeni sono in grado di aumentare la capacità lavorativa (*in vivo*). Ma con una differenza rispetto agli stimolanti: l'aumento degli stimolanti è temporaneo, seguito da un marcato decremento. Utilizzando adattogeni (*Rhodiola* e *Achantopanax*) il livello delle prestazioni, raggiunto il massimo, non è seguito da un decremento (Figura 1).

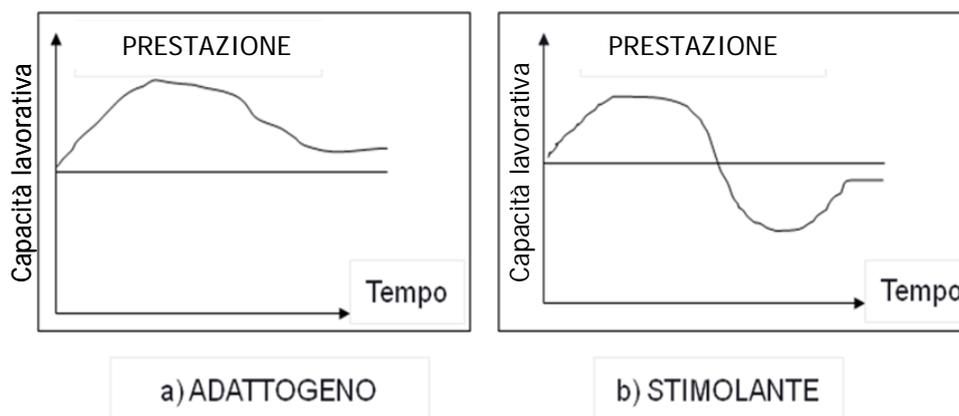


Figura 1. Capacità lavorativa di un adattogeno a), rispetto ad uno stimolante b)

Alcune ricerche hanno poi mostrato come l'effetto adattogeno è dipendente dalla sintesi dell'RNA-DNA dipendente. Esperimenti hanno stabilito che l'effetto adattogeno era dipendente dalla sintesi dell'RNA DNA-dipendente, anche se la sintesi di questo RNA è necessaria, ma non sufficiente per spiegare gli effetti. Piante adattogene aumentano la capacità lavorativa, mentre una precedente somministrazione di Actinomicina D (antitumorale che blocca la sintesi dell'RNA) inibisce completamente l'azione degli adattogeni (5). Da questo una serie di esperimenti sull'effetto degli adattogeni sulla sintesi proteica e quindi sulla produzione di proteine/acidi nucleici. È stato dimostrato l'effetto degli adattogeni sulla sintesi proteica, verificando il loro effetto su:

1. Aumento della sintesi di proteine/acidi nucleici: gli eleuterosidi (principi attivi dell'*Eleutherococcus senticosus*) sono in grado di bloccare parzialmente l'inibizione della RNA polimerasi DNA-dipendente in animali sotto sforzo, senza influenzare l'attività della stessa "in vitro" (6).
2. Aumento della sintesi di glucosio 6-phosphato deidrogenasi (G-6PD): studiando l'aspetto energetico durante lo stress, l'attenzione si è focalizzata sulla formazione della G-6PD. È stato dimostrato che gli adattogeni attivano l'enzima esochinasi nella via della glicolisi, secondo lo schema: glucosio → esochinasi → G6PD → piruvato. È stato dimostrato anche un effetto insulinico simile di queste sostanze e che tutti gli studi hanno dimostrato che gli effetti delle adattogene sul metabolismo dei carboidrati, produzione di energia, sintesi del DNA e delle proteine sono conseguenza del loro effetto sui mediatori chiave della risposta allo stimolo tra cellule e sistema regolatorio, piuttosto che a causa di un loro effetto diretto sugli enzimi coinvolti in questo processo (7).
3. Modulazione sinaptica catecolaminergica: studi hanno dimostrato l'effetto degli adattogeni nel limitare la iperproduzione di catecolamine durante situazioni di stress (anche se su prove indirette) (8).
4. Attività antiossidante - riduzione della perossidazione lipidica: studi effettuati su *Eleutherococcus*, *Schizandra* e *Rhodiola* hanno rilevato per la seconda un potente effetto antiossidante, dovuto ai lignani, accompagnata da una riduzione della perossidazione lipidica (9).

Le ultime ricerche

Nuovo quesito fondamentale: se un adattogeno deve avere azione aspecifica e niente effetti sullo stato normale dell'organismo, come si può conciliare questo con alcuni concetti chiave della moderna farmacologia, come potenza, selettività ed efficacia bilanciata da un livello accettabile di tossicità?

Quali sono i meccanismi d'azione degli adattogeni e quali marcatori biochimici possono essere usati per valutare l'efficienza dell'adattogeno, sia *in vivo* che *in vitro* su enzimi isolati e/o sistemi cellulari, animali e umani?

Possiamo pensare ad una standardizzazione biologica e biochimica?

I risultati si possono sintetizzare così:

- Il sistema di risposta responsabile della difesa e adattamento dell'organismo agli agenti di stress è molteplice, comprendente il sistema endocrino e immunitario. Il modello d'azione degli adattogeni è collegato con il sistema da stress e può essere diretto verso differenti obiettivi del sistema coinvolto nella regolazione. I più importanti marcatori di stress sono i messaggeri di stress che si dividono in:
 - a) Attivanti: catecolamine, citokine, NO ecc., cioè che attivano le risorse dell'organismo.
 - b) Deattivanti: corticosteroidi e mediatori PGE2 endogeni della comunicazione cellulare, che proteggono la cellula da una super-reazione ai messaggeri attivanti.
- Gli adattogeni aumentano la capacità del sistema stress di rispondere a segnali esterni ai più alti livelli di mediazione tra messaggeri attivanti e deactivated.
- Una pianta adattogena può essere definita come un soggetto in grado di ridurre l'attività del sistema di difesa e diminuire gli effetti dannosi dei vari agenti da stress, dovuti all'aumento del livello di base coinvolti nella risposta allo stress.
- Gli adattogeni vengono distinti in:
 - a) Immunostimolanti (sostanze che provocano un aumento delle difese immunitarie).

- b) Nootropici (sostanze in grado di migliorare le funzioni cerebrali).
- c) Anabolizzanti (sostanze che attivano le vie metaboliche del metabolismo basale, come la sintesi di proteine).
- d) Tonici (attenuano gli stati di insufficienza dell'organismo o di singoli organi).
- e) Geriatrici (sostanze utili nel trattamento delle malattie delle persone anziane) (9).

Bibliografia

1. Lazarev NV. 7th All - Union Congr. Physiol, Biochem, Pharmacol. *Medgiz Moscow* 1947. p. 579.
2. Selye H. Studies on adaptation. *Endocrinology* 1937;21:169.
3. Selye H. Stress. *Acta Inc.* Montreal: Med. Publ. 1950
4. Brekhman II, Dardymov IV. New substances of plant origin which increase nonspecific resistance. *Annu Rev Pharmacol* 1969;9:419-30.
5. Dardymov IV, Brekhman II. The influence of antimycin D on the regulation of carbohydrate metabolism, caused by *Eleutherococcus glycosides* and adrenal ectomy in rats. *Materiali Itogovoj Naucknoy Sessii VNIIFK*, 1969.
6. Bezdetko JN, Brekhman II, Dardymov IV, Zil'ber ML, Rogozkin VA. *Eleutherococcus glycosides* effect on nuclear RNA polymerase activity in skeletal muscles and liver after physical sytrain, *J. Voprosy Med Khimii*, 1973;19(3):245-8.
7. Dardymov IV, Kashina E. The effect of Ginseng and *Eleutherococcus glycosides* on hexokinase activity. *Lek. Sredstva Dal'nego Vostoka* (Remedies of the Far East), The Institute of Biologically Active Substance of the USSR, Akademy of Science, Vladivostok Russia, 1972;2:56-9.
8. Lupandin AV. The role of catecholaminergic synapses in the mechanism of adaptation formation under the action of polyphenolic adaptogens, *Fiziol Zh SSSR Im I M Sechenova*. 1989;75(8):1082-8.
9. Panossian A, Wikman G, Wagner H. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine* 1999;6(4):287-300.

LA FITOTERAPIA TRADIZIONALE CINESE TRA PERSONALIZZAZIONE ED *EVIDENCE BASED* MEDICINE (EBM)

Emilio Minelli

WHO Collaborating Centre for Traditional Medicine, Università degli Studi di Milano, Milano

La fitoterapia nella Medicina Tradizionale Cinese

La Medicina Tradizionale Cinese (MTC) è una componente estremamente dinamica e tuttora attiva di un corpus dottrinale molto ampio e articolato, costituito dalla Medicina Tradizionale. Questa è infatti composta dalla somma di una serie di sistemi tradizionali che, a livello mondiale e in zone piuttosto vaste, hanno fornito per millenni una risposta spesso sicura, efficace e di discreta qualità alla domanda di salute dell'Umanità.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità riconosce la Medicina Tradizionale «quale prezioso patrimonio di conoscenze, accumulate dalle diverse comunità etniche nei secoli; fonte inesauribile di esperienze teoriche e pratiche; contributo alla promozione e alla tutela della salute dell'umanità, a costi inferiori rispetto a quelli del sistema medico occidentale». Il sistema medico tradizionale, in quanto omogeneo alle culture e alle credenze delle varie popolazioni, spesso è più facilmente accettato da molte comunità etniche. (1)

Le medicine tradizionali più note sono costituite dalla Medicina Tradizionale Cinese, dalla Medicina Tradizionale Indiana o Ayurveda, dalla Medicina Tradizionale Araba o Unani, dalla Medicina Manuale, tra cui ritroviamo Osteopatia e Chiropratica, dalle medicine Omeopatia e Antroposofica.

Tutte queste medicine inglobano, a loro volta, in sé diverse componenti e tra queste la fitoterapia è senza dubbio quella più diffusa. Probabilmente anche la più utilizzata. Anche in Cina, in effetti, la fitoterapia tradizionale è diffusa in tutto il paese e impiegata, unitamente al massaggio, all'agopuntura e alla dietetica per il trattamento di un numero imprecisato di malattie e di disturbi.

Modello epistemologico e linguaggio alla radice della MTC

La MTC, a sua volta, è un sistema medico antichissimo basato su un modello epistemologico di tipo olistico e su una modalità linguistica fortemente caratterizzata da un linguaggio simbolico e da modalità di relazione tra i vari assunti del discorso di tipo squisitamente analogico (2). I criteri classificativi di riferimento, utilizzati anche in MTC sono costituiti dallo *yin/yang* e dai Cinque movimenti.

Lo *yin/yang*, originariamente indicante il versante in ombra e il versante soleggiato della montagna, è impiegato per cogliere e descrivere gli aspetti ritmici, che sono alla base della vita. La diastole e la sistole cardiache, per esempio, l'espiazione e l'inspirazione, il sonno e la veglia sono ugualmente esempi di fasi *yin* e *yang*, riposo e attivazione di altrettanti aspetti della fisiologia umana.

I Cinque movimenti, Cinque fasi o Cinque passi, accolgono e amplificano questa modalità classificativa, introducendo una sorta di misura quantitativa all'interno dell'analisi qualitativa, effettuata tramite le categorie dello *yin/yang*.

Vengono così descritte una fase di *yang* massimo, simboleggiato dal Fuoco, che corrisponde alla luce e al calore e una fase di *yin* massimo, simboleggiato dall'Acqua, che corrisponde al freddo, alla passività e all'indeterminatezza.

In posizione intermedia, abbiamo una fase di piccolo *yang*, il cui simbolo è il Legno, che corrisponde all'inizio dello *yang* e che rappresenta tutti i fenomeni colti al momento della nascita e nella fase di espansione verso l'esterno.

In posizione diametralmente opposta, abbiamo una fase di piccolo *yin*, il cui simbolo è il Metallo, che corrisponde a tutto ciò che si riduce e che rientra in profondità. Al centro di questi Quattro movimenti, abbiamo un quinto movimento simboleggiato dalla Terra, che rappresenta ciò che supporta e mantiene in equilibrio tutta la manifestazione.

A questi Cinque movimenti, come si può vedere nella Tabella 1, corrispondono climi, stagioni, sapori, organi, visceri, aspetti psichici della persona e tessuti.

Tabella 1. Le correlazioni dei cinque movimenti

Elemento	Stagione Clima Sapore	Organo
Fuoco	Estate Calore Amaro	Cuore Intestino Tenue <i>Shen</i> arterie - sangue
Acqua	Inverno Freddo Salato	Rene Vescica <i>Zhi</i> ossa - midollo
Legno	Primavera Vento Acido	Fegato Vescica Biliare <i>Hun</i> muscoli
Metallo	Autunno Secchezza Piccante	Polmone Intestino Crasso <i>Po</i> epidermide
Terra	Quinta stagione Umidità Dolce	Milza Stomaco <i>Yi</i> mucose - carne

I farmaci e, in particolare i fitoterapici della tradizione cinese, sono anch'essi inseriti all'interno di questo modello. E, in ultima analisi, non si può considerare la farmacologia cinese come il derivato di un sapere empirico.

Se è indubbio che la stratificazione delle conoscenze e delle esperienze, grazie a un'ineguagliabile e ininterrotta continuità politica del paese, ha aiutato la costruzione del corpus dottrinale relativo alla fitoterapia, è altrettanto vero che la lettura delle esperienze si è prodotta attraverso una serie di categorie teoretiche, che hanno reso possibile la costruzione di un sapere omogeneo al modello epistemologico della MTC nel suo complesso. Di fronte ad esso, è

indubbio che una traduzione si impone, per poterne utilizzare gli aspetti documentatamente efficaci, così come per respingerne gli erronei convincimenti, rafforzati da millenni di stratificazione.

Le caratteristiche dei farmaci

La classificazione dei farmaci obbedisce a due sistemi portanti, che sono costituiti dalla teoria dei Cinque sapori e da quella delle Quattro nature. La prima, in particolare, costituisce il principale strumento di raccordo con il sistema correlativo dei Cinque elementi sopra descritto e, quindi, con l'impostazione olistica della MTC (5).

I sapori

La teoria dei Cinque sapori, nella sua forma più semplice, deriva dalla teoria dei Cinque movimenti con una precisa applicazione agli alimenti e ai farmaci.

Secondo la teoria delle corrispondenze, che è un corollario della teoria dei Cinque movimenti, ad ogni organo corrisponderebbe un sapore, che, utilizzato in piccola quantità, avrebbe la funzione di nutrire l'organo corrispondente. (Tabella 1)

In realtà, la nozione di sapore è alquanto più complessa e per capire la diversità esistente tra una nozione di sapore intesa da un punto di vista palatale e quella utilizzata per la classificazione di farmaci e di nutrienti, è sufficiente considerare la seguente tabella (Tabella 2), in cui di ogni sapore sono indicate l'azione o le azioni specifiche.

Tabella 2. I sapori e le loro azioni

Sapore	Azioni specifiche
Amaro	Disseccante Disperde le offensive del <i>qi</i> verso l'alto Rafferma e consolida Emetizzante Purgativa
Salato	Ammorbidente Indurente Purgativa
Acido	Retraente Astringente Immobilizzante Purgativa
Piccante	Umidificante Mobilizza e fa circolare Diaforetica
Dolce	Rilassante Tonificante Dissipante
Insipido	Diuretica

Come si può vedere nella Tabella 2, ai Cinque sapori classici viene aggiunto un sesto sapore, l'insipido, con una spiccata attività diuretica.

La natura

La seconda categoria portante è costituita, invece, dalla natura, che descrive, attraverso l'antinomia freddo/caldo, gli effetti dell'impatto di un alimento o di una droga sul metabolismo umano. Tradizionalmente si descrivono Cinque nature. La natura neutra ha effetti molto equilibrati sull'organismo ed è costituita per lo più dalla natura prevalente nella maggior parte degli alimenti.

Abbiamo poi le natura calda e fredda, tipiche di molti alimenti, con funzione riscaldante e attivante sul metabolismo, così come su numerose funzioni organiche. Sono queste le due nature in cui ritroviamo un gran numero di farmaci.

A un livello intermedio, abbiamo infine le due nature fresca e tiepida, in cui ritroviamo sia sostanze ad attività nutrizionale che sostanze ad attività farmacologica, come le spezie e molte piante aromatiche.

Se queste sono le due principali categorie classificative di farmaci e di nutrienti, non vanno dimenticate altre quali, ad esempio, le Quattro tendenze, i Meridiani destinatari e l'azione energetica. La prima descrive la capacità della sostanza di far salire o superficializzare o, all'inverso, far scendere e approfondire l'energia dell'organismo, mentre la seconda descrive soprattutto la capacità di una sostanza di produrre un determinato effetto in una determinata zona del corpo. L'azione energetica, infine, descrive gli effetti del farmaco sulle varie componenti organiche, sui visceri e sulle malattie.

La fitoterapia cinese tra tradizione e modernità

L'innata tendenza alla integrazione della MTC si esprime oggi, anche ad un sommario esame, nella sviluppatissima farmacopea. In essa, infatti, se i criteri classificativi appena enunciati sono tuttora ben presenti, non meno rilevanti risultano le descrizioni farmacologiche, chimiche e biochimiche, con studio e individuazione dei vari principi attivi della maggior parte delle piante medicinali.

Questo sistema integrato è alla base dei due movimenti più caratteristici della farmacologia tradizionale cinese: l'impiego dei farmaci secondo una modalità tradizionale e quello, invece, secondo i dati della moderna ricerca farmacologica.

Persiste, infatti, un impiego di questa metodica secondo modalità che, basate sulle nozioni sopra accennate, hanno come obiettivo quello di individualizzare il più possibile il farmaco, in modo da cogliere le caratteristiche e le necessità dell'hic et nunc del paziente.

Su questa base, 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 (3).

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 trattamento della 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 (4).

Avremo così menopause 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.

È indubbio che, se questa modalità prescrittiva ha consentito e consente di ottenere una buona personalizzazione del farmaco, è tuttavia certo che queste modalità hanno reso più difficile lo sviluppo di studi clinici per lo studio della efficacia dei vari composti.

Peraltro, in una visione globale del sistema medico tradizionale cinese e del suo confronto con la medicina occidentale, è indubbio che questa tendenza alla personalizzazione della cura dovrebbe essere considerata una risorsa da preservare accanto alla necessaria implementazione della ricerca classica, piuttosto che come un semplice limite.

La ricerca attuale in fitoterapia cinese

La ricerca attuale nel settore della fitoterapia si snoda, altresì, secondo tre direttive principali che tengono conto sia dell'uso tradizionale che della moderna esigenza di valutazioni di efficacia e sicurezza legate alla EBM.

È così che l'uso tradizionale e, in particolare, l'indagine sulla modalità di funzionamento delle antichissime formule magistrali non è stato abbandonato e, anzi, linee di ricerca legate alla chemomica, alla metabonomica, alla proteomica e alla genomica cercano di utilizzare questi moderni strumenti di studio della interazione farmaco/organismo, per cercare di comprendere quali possano essere le determinanti minime per la descrizione e la comprensione dell'impatto di un farmaco su una determinata struttura biologica.

Accanto a questo, è fiorita una ricchissima ricerca clinica sulla sicurezza e sull'efficacia di numerosi principi attivi collegati alla fitoterapia tradizionale (6).

In questa tipologia di ricerca, si assiste, talvolta, alla semplificazione delle antiche ricette, mentre tal'altra, esse sono valutate nel loro complesso.

Infine, soprattutto sotto lo stimolo alla ricerca da parte di multinazionali in cerca di principi attivi, la farmacologia cinese ha iniziato un ampio lavoro di studio e rivalutazione della sua farmacoterapia tradizionale secondo criteri farmaco-biologici.

A questa tipologia di ricerche appartengono altresì quelle derivazioni volte ad indagare interazioni positive o negative tra farmaci occidentali e farmaci cinesi, sino ad individuare le potenziali interazioni sul sistema del citocromo P450. Scopo di questa ricerca è quello di implementare la sicurezza d'uso dei farmaci cinesi, anche in un mercato dove la commistione di prodotti tradizionali e di prodotti di sintesi chimica diventa sempre più frequente.

Se la tendenza tradizionalista alla estrema personalizzazione delle prescrizioni e la standardizzazione derivante dalla moderna ricerca scientifica sapranno integrarsi armonicamente, è indubbio che la farmacologia cinese continuerà, anche ai nostri giorni e probabilmente non solo in Cina, ad avere un posto di rilievo tra i sistemi primari di cura della salute.

Bibliografia

1. World Health Organization. *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. Geneva; 2002.
2. Minelli E. *Le cinque vie dell'agopuntura*. Verona: Gemma Editco; 2000.

3. Sangiorgi E, Minelli E, Crescini G, Garzanti S. *Principi di Fitoterapia clinica tradizionale, energetica, moderna*. Milano: Ed. CEA; 2007.
4. Minelli E, Schiantarelli C, De Giacomo E. *Agopuntura clinica*, Milano: Red Edizioni; 2002.
5. Berera F, Minelli E, Crescini G. *Le Cinque vie della Dietetica Cinese*. Milano: Red Edizioni; 2008.
6. World Health Organization. *General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine*. Geneva; 2000.

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

Edoardo Di Leginio
Maharishi Vedic University, Terni

Introduzione

È notizia di questi giorni (1) che dopo anni di lavoro, esperti del ministero della Salute indiano, hanno classificato, traducendole dal sanscrito e dall'indi migliaia e migliaia di ricette e informazioni mediche producendo trenta milioni di pagine. Il Governo Indiano dichiara che questa operazione è stata necessaria per evitare la speculazione, i brevetti inopportuni e calmierare i prezzi. L'occidente inizia a rendersi conto della grande quantità di conoscenza medica e delle piante che la tradizione indiana ha tramandato fino ad oggi. Negli ultimi anni, con la crescita economica dell'India sono stati fatti grandi investimenti per esplorare e definire meglio dal punto di vista scientifico il grande patrimonio di conoscenza fitoterapica indiana producendo una notevole quantità di materiale scientifico di qualità.

Dravyaguna

Il *Dravyaguna* è un aspetto della Scienza Vedica che studia le sostanze e le piante medicinali per uso terapeutico. *Dravya* significa sostanza e *Guna* significa qualità. La conoscenza delle sostanze e delle piante medicinali nella tradizione ayurvedica viene ottenuta a tre livelli: soggettivo, inferenziale, empirico. Il livello soggettivo si ottiene sviluppando particolari stati di coscienza attraverso tecniche di modificazione/controllo della coscienza ed è molto difficile da ottenere. La conoscenza inferenziale è la combinazione di 4 variabili: *Guna* (qualità), *Rasa* (sapore), *Virya* (potenza), *Vipaka* (effetto ritardato). È la combinazione delle quattro precedenti qualità che porta a inferire le proprietà di una sostanza ed è relativamente facile da padroneggiare. Il livello empirico è la conoscenza di *Prabhava* che sono gli effetti specifici su particolari malattie e che non possono essere attribuiti alle quattro precedenti qualità. È la conoscenza riassunta nella parola *Karma* (azione) ed è l'attività terapeutica della sostanza o pianta medicinale, rapportabile alle nostre proprietà farmacologiche ed è relativamente facile da padroneggiare.

Withania somnifera (L.) Dunal

L'esempio di come si possa procedere allo studio di una pianta della tradizione ayurvedica può essere trovato nello studio della *Withania somnifera* (L.) Dunal. La *Withania somnifera* vanta una tradizione d'uso di migliaia di anni e oggi è molto studiata dal punto di vista occidentale per dare un perimetro di 'certezza' conoscitiva all'uso di questa pianta. Esploreremo brevemente la visione occidentale e quella indiana di questa pianta.

La *Withania somnifera* dal punto di vista occidentale

È una pianta della famiglia delle Solanacee, il genere è *Withania*, la specie è *Withania somnifera* (L.) Dunal. Si tratta di un arbustello alto da 30 a 150 cm che è coperto da una pubescenza lanuginosa, con foglie lunghe 10 cm e larghe circa 5 cm a margine intero e alternate. I fiori sono verdi o gialli a fascicoli ascellari. I frutti maturi sono rossi e globosi. Le radici sono carnose e cilindriche con epidermide marrone chiaro e il midollo bianco. La radice è la parte usata. La pianta cresce spontaneamente in India e in Medio Oriente, nel centro e nel Sud Africa, nel Nord Africa e nel bacino Mediterraneo. Ne sono stati trovati esemplari anche in Sardegna. I nomi comuni occidentali sono: *Winter cherry* (inglese) e Ginseng Indiano (2). I principi attivi sono contenuti soprattutto nelle radici e nelle bacche della pianta. Sono stati riconosciuti sino ad oggi: 12 alcaloidi, 35 witanolidi, molti sitoindositi. Oggi si ritiene che l'attività farmacologica sia dovuta ai due witanolidi principali: witaferina A e witanolide D. I contenuti di witaferina A sono i seguenti: radici: 0,066%, fusto: 0,048%, foglie: 0,238%. I contenuti di witanolide D sono: radici: 0,193%, fusto: 0,007%, foglie: 0,003%.

I principali alcaloidi contenuti nella *withania S.* sono: withanina, somniferina, somnina, somniferinina, withananina, pseudo-withanina, tropina, pseudotropina, cholina, anaferina, isopellaterina e altri.

La *Withania somnifera* è considerata un pianta sicura: DL50 nei ratti: 465 mg/Kg (332-651 mg/Kg), DL50 nei topi: 432 mg/Kg (229-629 mg/Kg) - (3).

La *Withania somnifera* dal punto di vista indiano

I più comuni nomi indiani della *Withania S.* sono: *Ashwagandha* (Begali, Bombay), *Punir* (Hindi), *Aksan* (Punjab), *Amukkira* (Tamil), *Tilli* (Marathi).

Per il Dravyaguna i dati della *Withania S.* sono:

- Sruti (nome): Ashwagandha
- Rasa (sapore): tikta (amaro), kashaya (astringente)
- Vipaka (effetto ritardato): katu (pungente)
- Virya (potenza/effetto): ushna (caldo)
- Prabhava (qualità specifica):
- Medhya: sostiene il sistema nervoso,
- Stanyajanana: galattogogo,
- Nidrajanana: ipnotico,
- Vedanasthapana: analgesico,
- Balaya: energetico,
- Vajikarana: afrodisiaco,
- Rasayana: rivitalizzante, ricostituente, antiossidante,
- Medarasayana: promuove apprendimento e memoria,
- Vatakaphahara: riduce Kapha e Vata (4-6).

Valutazione dell'uso tradizionale indiano tramite le conoscenze scientifiche occidentali

Medhya - Effetto sul Sistema Nervoso Centrale

Medhya è l'azione sul sistema nervoso centrale (medha = intelletto). La *Withania S.* è una pianta del SNC ed ha un ruolo potenziale in molti disordini del SNC, di fatto in India viene usata in molte situazioni patologiche come:

- Anticolvulsivante tramite il sistema gabaergico (7).
- Ansiolitico tramite il sistema gabaergico (gabamimetico) (8, 9).
- Adattogeno e antistress legato all'attività antiossidante (10, 11, 12).
- Nei disturbi della memoria (nootropo) tramite il sistema colinergico (inibizione acetilcolinestasi e butilcolinestasi dose dipendente) tramite le proprietà calcio-antagonista della *Withania S.* (13).
- Nell'ischemia cerebrale favorisce la rigenerazione neuronale, ha una dimostrata capacità di rigenerazione di assoni e dendriti e ricostruzione pre e post sinaptica (14) e molti altri modelli animali.
- Alzheimer e problemi associati tramite il meccanismo di inibizione dell'acetilcolinestasi e della butilcolinestasi e per la sua azione calcio antagonista dei withanolidi (15).
- Parkinson: studi recenti hanno dimostrato una attività simil antiparkinsoniana modulando il sistema domapaminergico nel SNC (16).
- Epilessia: la *Withania S.* ha una azione profondamente depressiva sul SNC e ha mostrato possedere proprietà anticolvulsivanti in modelli acuti e cronici di epilessia (17, 18).

Stanyajanana - Effetto galattogogo

L'uso della *Withania S.* come galattogogo (stanya = latte) è un uso tradizionale di cui non se ne conosce il meccanismo.

Nidrajanana - Effetto ipnoinduttore

L'effetto ipnoinduttore (nidra = sonno) è dovuto all'azione depressiva sul SNC da parte della *W.S.* probabilmente mediato dalla modulazione del sistema gabaergico. La *Withania S.* potenzia l'effetto del Pentobarbital (3).

Vedanasthapana - Effetto antidolorifico

L'effetto analgesico (vedana = dolore) è dovuto all'azione depressiva sul SNC e all'attività antiossidante. Esiste uno studio effettuato su pazienti osteo-artritici (19). Come già ricordato sopra la *Withania S.* potenzia l'effetto del pentobarbital (3) e inibisce lo sviluppo della tolleranza all'analgesia indotta da morfina (20).

Balaya - Effetto energetico

L'uso della *Withania S.* come energetico (bala = forza) è un uso tradizionale e non se ne conosce il meccanismo.

Vajikarana - Effetto afrodisiaco

L'effetto afrodisiaco (vaaji = cavallo) della WS è un uso tradizionale e non se ne conosce il meccanismo (modulazione produzione di nitrossido).

Rasayana - Effetto ricostituente - rivitalizzante

L'effetto ricostituente e rivitalizzante (rasa = linfa, tessuto fondamentale) della *Withania S.* è riconducibile all'attività antiossidante della Withaferina A e dei Sitoindosidi VII-X è stata testata verso tutti maggiori enzimi anti-radicali liberi: Superossido desmutasi (SOD), Catalasi (CAT), Glutadione perossidasi (GPX) e ne aumenta la concentrazione nel cervello (corteccia e striato) di ratto (21).

L'effetto antineoplastico (*in vitro*) è dovuto a :

- Proprietà antiangiogeniche (22)
- Effetti citotossici (23)
- Inibizione sintesi RNA (24)

L'effetto immunostimolante probabilmente dovuto a:

- Induzione di produzione di NO da parte dei macrofagi (25)
- Aumento dell'attività macrofagi peritoneali (26).

Effetti Avversi

A dosi elevate può causare:

- Nausea e vomito
- È stato segnalato un caso di tireotossicosi senza altre conferme. Si sta studiando la possibilità che aumenti la produzione di TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*).

Precauzioni nell'uso

A causa della sua azione sedativa sarebbe bene non associarlo con:

- anticonvulsivanti
- antipsicotici
- benzodiazepine
- barbiturici (fenobarbital)
- fenitoina

È stato dimostrato che aumenta la tossicità della:

- metamfetamina
- metrazolo (27)

Legislazione

Non ci sono norme restrittive per l'uso della *Withania Somnifera* in Italia e nella Comunità Europea.

Uso attuale

L'uso attuale a scopo medico viene fatto quasi sempre in associazione con altre piante in fitocomplessi costituiti da numerose piante. Nella pratica clinica, alle dosi consigliate massime (891 mg di polvere di radice x 2 *die*), non ha mai mostrato dare problemi o effetti collaterali.

Conclusioni

La 'Saggezza' della Scienza Vedica attraverso metodi empirici, fenomenologici, osservazionali, e qualitativi ha permesso di individuare questa pianta e di consolidarne l'uso. Il raffinamento delle preparazioni ha prodotto nei secoli dei preparati praticamente senza effetti collaterali e con indicazioni precise. La "Scienza Occidentale" permette di definire meglio l'uso e i rischi che si corrono migliorando il livello di sicurezza nell'uso di questa pianta medicinale e raffinandone le indicazioni.

Bibliografia

1. Frascchetti V. Copyright sullo yoga *La Stampa* Torino, 27 febbraio 2009, pag. 16.
2. Singh B, Saxena AK, Chandan BK, Gupta DK, Bhutani KK, Anand KK. Adaptogenic activity of a novel withanolide-free aqueous fraction from the roots of *Withania somnifera* Dun. *Phytother Res* 2001;15:3118.
3. Sharada AC, Solomon FE, Uma Devi P. Toxicity of *Withania somnifera* root extract in rats and mice. *Indian J Pharmacog* 1993;31:205-12.
4. Srikanthamurthy KR, *Bhavprakash of Bhavmishra* 1st ed. Varanasi, India: Krishnadas Academy; 1998.
5. Warriar PK, Nambiar VPK, Ramankutty C. *Indian Medicinal Plants: A Compendium of 500 species*. Vol 5. Hyderabad, India: Orient Blackswan; 1996.
6. Dash B. *Materia Medica of Ayurveda*. New Delhi: B. Jain Publishers; 1991. p. 59.
7. Mehta AK, Binkley P, Gandhi SS, Ticku MK. Pharmacological effects of *Withania somnifera* root extract on GABA receptor complex. *Indian J Med Res* 1991;94:312-5.
8. Andrade C, Aswath A, Chaturvedi SK, Srinivasa M, Raguram R. A doubleblind placebo-controlled evaluation of anxiolytic efficacy of an ethanolic extract of *Withania somnifera*. *Indian J Psych* 2000; 42:295-301.
9. Bhattacharya SK, Bhattacharya A, Chakrabarti A. Adaptogenic activity of Siotone a polyherbal formulation of Ayurvedic rasayanas. *Indian J Exp Biol* 2000;38:119-28.
10. Dhuley JN. Adaptogenic and cardioprotective action of ashwagandha in rats and frogs. *J Ethnopharmacol* 2000;70:57-63.
11. Archana R, Namasivayam A. Antistressor effect of *Withania somnifera*. *J Ethnopharmacol* 1999;64:91-3.
12. Rege NN, Thatte UM, Dahanukar SA. Adaptogenic properties of six rasayana herbs used in Ayurvedic medicine. *Phytother Res* 1999;13:275-91.
13. Schliebs R, Liebmann A, Bhattacharya SK, Kumar A, Ghosal S, Bigl V. Systemic administration of defined extracts from *Withania somnifera* (Indian Ginseng) and Shilajit differentially affects cholinergic but not glutamatergic and GABAergic markers in rat brain. *Neurochem Int* 1997;30:181-90.
14. Kuboyama T, Tohda C, Komatsu K. Neuritic regeneration and synaptic reconstruction induced by withanolide A. *Br J Pharmacol* 2005;144:961-71.

15. Choudhary MI, Nawaz SA, ul-Haq Z, Lodhi MA, Ghayur MN, Jalil S, Riaz N, Yousuf S, Malik A. Withanolides a new class of natural cholinesterase inhibitors with calcium antagonistic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334:276-87.
16. Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Ansari MA, Yousuf S, Hoda MN, Islam F. Neuroprotective effects of *Withania somnifera* on 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in rats. *Hum Exp Toxicol* 2005;24: 137-47.
17. Kulkarni SK, Verma AV. GABA receptor mediated anticonvulsant action of *Withania somnifera* root extract. *Indian Drugs* 1993;30:305-12.
18. Kulkarni R, Patki P, Jog V, Gandage S, Patwardhan B. Treatment of osteoarthritis with a herbomineral formulation: a double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *J Ethnopharmacol* 1991;33:91-5.
19. Kulkarni SK, Ninan I. Inhibition of morphine tolerance and dependence by *Withania somnifera* in mice. *J Ethnopharmacol* 1997;57:213-7.
20. Bhattacharya SK, Satyan KS, Ghosal S. Antioxidant activity of glycowithanolides from *Withania somnifera*. *Indian J Exp Biol* 1997b;35:236-9.
21. Mohan R, Hammers HJ, Bargagna-Mohan P, Zhan XH, Herbstritt CJ, Ruiz A, Zhang L, Hanson AD, Conner BP, Rougas J, Pribluda VS. Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis. *Angiogenesis* 2004;7:115-22.
22. Fуска J, Fuskova A, Rosazza JP, Nicholas AW. Novel cytotoxic and antitumor agents. IV. Withaferin A: relation with its structure to the in vitro cytotoxic effects on P388 cells. *Neoplasma* 1984;31:31-6.
23. Chowdhury K, Neogy R. Mode of action of Withaferin A and Withanolide D. *Biochem Pharmacol* 1975;24:919-20.
24. Iuvone T, Esposito G, Capasso F, Izzo A. Induction of nitric oxide synthase expression by *Withania somnifera* in macrophages. *Life Sci* 2003;72:1617-25.
25. Dhuley J. Therapeutic efficacy of ashwagandha against experimental aspergillosis in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1998;20:191-8.
26. Malhotra C, Mehta V, Das P, Dhalla N. Studies on *Withania ashwagandha* Kaul V The effect of total alkaloids (ashwagandholine) on the central nervous system. *Indian J Physiol Pharmacol* 1965;9:311-33.

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

Walter Legnani
Società Italiana di Medicina Antroposofica, Milano

Le origini del medicamento

L'introduzione del *Viscum album* come terapia antineoplastica risale agli anni 1920-24 in base all'indicazione di Rudolf Steiner e alla collaborazione con la D.ssa Ita Wegman (1-6); il medicamento era noto da tempi antichi ma con altri usi e indicazioni. Si tratta dunque di un farmaco antico, ma ancora oggi uno dei più usati almeno in Europa nella cura del cancro. Ci chiediamo in questa relazione quali sono i motivi che lo rendono ancora così diffuso e quali le proprietà che lo fanno essere tuttora proponibile e attuale. La medicina antroposofica, che nasce dal pensiero di Rudolf Steiner, non rinnega le acquisizioni della scienza medica, ma si pone in modo complementare, cercando di inquadrare i fattori eziopatogenetici e le possibilità terapeutiche nella considerazione di tutto l'uomo (fisico, vitale, psichico, spirituale) e di tutto ciò che la natura rende disponibile di minerale, di vegetale, di animale (7, 8).

La ricerca preclinica

Se vogliamo spiegare nei termini della scienza moderna l'azione del vischio, parliamo di una sua azione sul sistema immunitario, ma anche di un'azione diretta inibitoria sulla proliferazione delle cellule neoplastiche. Il medicamento viene ricavato con un procedimento complesso di miscelazione e di fermentazione del succo estratto dalla pianta invernale e dalla pianta estiva. Le principali sostanze individuate sono viscotossine, lectine e polisaccaridi (9, 10).

Le viscotossine e le lectine, entrambe sostanze proteiche, hanno però caratteristiche diverse: le prime hanno una reazione lenta, bloccano la sintesi proteica a livello ribosomiale, sono da inquadrare come sostanze citostatiche; le seconde hanno reazione più rapida, agiscono sulla membrana cellulare, sono citolitiche. I polisaccaridi, estratti da tutte le componenti della pianta, determinano l'azione immunostimolante, incrementano l'azione dei linfociti NK, attivano il complemento. Le azioni a livello biologico del *Viscum* possono essere così riassunte (11-20):

- Citotossicità nelle colture cellulari tumorali
- Stimolo alla proliferazione linfocitaria
- Incremento numerico e attivazione fagocitica dei neutrofilo
- Aumento delle cellule CD4+ in circolo nei pazienti HIV positivi.

Le applicazioni cliniche

- L'attesa di vantaggi di questa terapia a livello clinico è così rappresentabile (21-26):
- miglioramento delle condizioni cliniche generali

- migliore qualità di vita (appetito e sonno migliorati, aumentato benessere generale)
- miglioramento del dolore neoplastico
- rallentamento della crescita tumorale
- 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.

Le indicazioni attuali all'uso del *Viscum album* possono essere così sintetizzate (28, 29):

- Tumori maligni o benigni: profilassi post-chirurgica, trattamento di recidive, metastasi e tumori inoperabili
- Trattamento delle precancerosi
- Trattamento adiuvante durante radio- e chemioterapia per stimolare le difese immunitarie e ridurre gli effetti collaterali indesiderati

Esistono in Italia diverse preparazioni di *Viscum album fermentatum* che si diversificano in base all'albero ospite: quercia (Qu), melo (M), pino (P). In alcune preparazioni è associato un metallo, argento, rame o mercurio. In altri paesi europei esistono preparati derivati anche da altri alberi (27). In base al diverso contenuto di lectine e viscotossine corrisponde una diversa azione citotossica e immunostimolante; da qui le diverse indicazioni nei due sessi e nei diversi tipi di tumore. Il farmaco viene somministrato a dosaggio ponderale, nell'adulto in genere a dosi tra 0,01 mg e 20 mg, più frequentemente per via sottocutanea, ma anche intracavitaria o per via venosa.

La ricerca clinica

Citiamo alcuni esempi di lavori recenti particolarmente esplicativi. In primo luogo si può prendere in esame una review del 2007 a opera di Kienle e Kiene (30), che riassume i principali risultati degli studi disponibili. Gli studi clinici significativi possono così essere sinteticamente raggruppati:

- 31 studi prospettici (19 randomizzati e 12 non-randomizzati)
- 39 studi comparativi retrospettivi
- 35 studi di coorte a singolo braccio o di coorte per serie di casi (13 prospettici e 22 retrospettivi o non definiti)
- 2 trials clinici su sistema complessivo di terapia antroposofica
- 7 review sistematiche (periodo 2002-2007).

Praticamente tutti i tipi di neoplasia sono stati studiati all'interno degli studi. In primo luogo vengono puntualizzati i principali quesiti posti nell'ambito degli studi stessi. Gli attuali studi clinici prospettici sono volti a dimostrare un'evidenza sull'efficacia della terapia con vischio in relazione a:

- Sopravvivenza
- Remissione della malattia
- Qualità di vita
- Riduzione degli effetti collaterali da trattamenti oncologici convenzionali
- Sicurezza dei preparati di vischio
- Valutazione sulla validità degli studi

La maggiore evidenza di risultato si osserva riguardo al miglioramento della qualità della vita e riduzione degli effetti citotossici nei pazienti radio o chemiotrattati. Si osserva anche un

beneficio sulla sopravvivenza, ma senza piena significatività statistica. Circa la remissione di malattia risulta un trend positivo, che incoraggia a un approfondimento con studi prospettici. Citiamo un lavoro molto significativo di Grossarth Maticsek (31). L'obiettivo dello studio è di dare una risposta a diversi interrogativi circa le interazioni tra il trattamento e la “*psychosomatic self-regulation*”.

Si tratta di uno studio epidemiologico prospettico non randomizzato di coorte. Sono stati studiati 10226 pazienti oncologici, di cui 1668 (16%) avevano assunto vischio. All'interno di questa casistica sono stati comparati 2 x 622 pazienti in “*prospective matched pairs*”. Lo studio comprende tumori di diverse sedi, vi sono rappresentate le forme più frequenti. È risultato che il tempo di sopravvivenza medio è aumentato del 40% nel gruppo vischio (3,05 anni; $P < 0,001$, il beneficio è correlato alla durata della terapia). Si è voluto esaminare l'effetto di sinergia Viscum–autoregolazione in modo prospettico randomizzato. Il dato che emerge è il seguente: i pazienti con elevato livello di autoregolazione beneficiano maggiormente del trattamento con vischio; il trattamento con vischio aumenta il livello di autoregolazione; conseguentemente vi è un aumento della qualità di vita (pazienti con ca. mammario dopo 3 mesi e cervice uterina dopo 12 mesi di trattamento). Un lavoro di Bock *et al.* del 2004 (32, 33) prende in esame una casistica di pazienti con carcinoma mammario non metastatico, in cui il *Viscum album* è aggiunto alla terapia convenzionale. Si tratta di uno studio multicentrico comparativo, retrospettivo, di coorte con gruppi paralleli, in accordo a *Good Epidemiological Practice*. Sono riportati 1442 pazienti (710 terapie convenzionali + *Viscum* vs 732 solo terapie convenzionali).

- *Endpoint* primario: reazioni avverse da terapia convenzionale. Vantaggio significativo.
- *Endpoint* secondari: sintomi associati alla malattia, sopravvivenza. *Trend* favorevole.

Augustin *et al.* pubblicano nel 2005 (34) i risultati di una casistica di pazienti con melanoma maligno, a medio e alto rischio (UICC/AJCC stadio II e III) curati con *Viscum album* dopo trattamento convenzionale adiuvante. È uno studio multicentrico comparativo, retrospettivo, di coorte con gruppi paralleli su 686 pazienti (329 gruppo *Viscum* vs 337 gruppo controllo)

- *Endpoint primario*: sopravvivenza correlata al tumore. Vantaggio significativo
- *Endpoint secondari*: sopravvivenza globale, sopravvivenza libera da malattia, intervallo comparsa metastasi cerebrali. Vantaggio significativo.

Citiamo due studi recenti, presentati nel 2007 alla ESMO Conference di Lugano. Si tratta di studi di coorte, multicentrici, controllati, retrospettivi a gruppi paralleli.

Il primo, di W.E. Friedel *et al.*, ha come oggetto “Efficacia e sicurezza di *Viscum alb. ferm.* nella terapia di supporto del carcinoma coloretale primario di stadio UICC I-III” (35).

Hanno preso parte allo studio 804 pazienti di 26 istituti. Di questi pazienti, 429 hanno ricevuto il trattamento con *Viscum album fermentatum* per via sottocutanea. Di contro, i 375 pazienti del gruppo di controllo hanno ricevuto solo il trattamento medico convenzionale o il follow-up programmato, senza altro tipo di terapie farmacologiche.

Il secondo, di H. Matthes *et al.* (36) riguarda la “Terapia di supporto con *Viscum alb. ferm.* nel carcinoma del pancreas di qualsiasi stadio (stadio UICC I – IV)”.

Hanno preso parte allo studio 396 pazienti seguiti in 17 istituti in Germania e in Svizzera. In 201 di questi pazienti è stato somministrato per via sottocutanea il *Viscum* come parte di una terapia di supporto, insieme alla chemio e/o radioterapia, oppure in corso di follow-up oncologico.

I 195 pazienti del gruppo di controllo sono stati trattati invece solo con chemio e/o radioterapia oppure è stata fornita loro solo una sorveglianza senza nessuna terapia farmacologica. Nei due studi il trattamento con *Viscum* è avvenuto con diversi tipi di preparato, oltre il 50% con *Viscum* Qu, in misura decrescente *Viscum* M e P.

In entrambi gli studi, rispetto al gruppo di controllo, i pazienti del gruppo *Viscum* hanno presentato una netta diminuzione degli effetti collaterali legati al trattamento convenzionale.

Sintomi legati alla malattia o al trattamento, come nausea/vomito, inappetenza, diarrea, cefalea, irritabilità o depressione, astenia, disturbi della memoria, disturbi del sonno o mucositi risultano significativamente diminuiti. Anche il performance status, misurato mediante l'indice di *Karnofski*, risulta migliorato in modo significativo nei pazienti trattati con *Viscum*.

Nel primo studio infine risulta migliorata la sopravvivenza libera da malattia, e nel secondo la sopravvivenza globale (l'uso dei due differenti indici è correlato alla diversa tipologia prognostica delle popolazioni indagate nei due studi).

La conclusione dei due studi è che il *Viscum album* ha migliorato la tollerabilità della chemio-radioterapia oncologica in misura significativa e clinicamente rilevante sia nei pazienti con carcinoma del grosso intestino che con carcinoma del pancreas.

Gli studi in Italia

In ultimo segnale due studi iniziati in Italia. Il primo, in corso di arruolamento dal 2006 presso l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna (referente la Dr.ssa Alessandra Longhi) è uno studio randomizzato, monocentrico, in pazienti affetti da Osteosarcoma pretrattati con chemioterapia e liberi da malattia dopo la seconda ricaduta.

Lo studio confronta il *Viscum Album Fermentatum Pini* (iniezioni s.c.) per 1 anno con un antiblastico, l'Etoposide per os, per 6 cicli.

- *Endpoint* primari: comparare il periodo libero da malattia nei due gruppi di trattamento a un anno per valutare se uno dei due trattamenti o entrambi possono migliorare la sopravvivenza libera da malattia (attualmente 12%)
- *Endpoint* secondari: Confrontare la qualità della vita di entrambi i gruppi e la tollerabilità di entrambe le terapie

Nei 10 casi arruolati (su 36 previsti) il trend è favorevole per i pazienti del braccio *Viscum album*.

È in fase iniziale presso l'U.O. di Oncologia e oncoematologia di Rimini uno studio di fase II per valutare l'attività e la tollerabilità di *Viscum album fermentatum Quercus* in pazienti con tumore solido in fase terminale (referente il Dr. F. Desiderio). Scopo dello studio è quello di valutare l'impatto di una terapia con *Viscum album fermentatum Quercus*, in aggiunta ad una *Best Supportive Care* (BSC) in termini di attività intesa come miglioramento della qualità di vita rispetto alla BSC da sola. Altri obiettivi dello studio sono: valutazione della tollerabilità, risposta dei sintomi correlati alla malattia in fase avanzata, sopravvivenza globale.

Conclusioni

La terapia con *Viscum album* si pone come cura oncologica complementare. In associazione a CT e RT diminuisce la tossicità iatrogena e migliora la qualità della vita. Anche negli stadi di malattia non passibili di CT e RT migliora la qualità della vita. Secondo molti lavori i pazienti curati con *Viscum* hanno una sopravvivenza globale più prolungata e un *Disease Free Survival* (DFS) aumentato nelle situazioni precauzionali. I parametri misurati comprendono effetti fisici, psichici e spirituali: questo intende essere il raggio d'azione dei preparati di *Viscum album*.

In conclusione il *Viscum album* ci sembra un farmaco estremamente attuale, in un momento in cui il bisogno del malato si è sempre più chiaramente configurato come richiesta di cura vera e propria, non solo di guerra alla malattia, ma di sostegno alla vita, alla qualità dell'esistenza, allo stato emotivo, di rafforzamento delle decisioni, in vista dei cambiamenti da instaurare per affrontare il futuro. L'azione positiva sul *performance status* da parte del *Viscum album*, in

qualche modo attivo a frenare la malattia (nessun paragone con la drasticità della chemioterapia), può essere un aiuto alla persona e alla sua reattività alla malattia. È necessario raccogliere casi e di migliorare la ricerca preclinica e clinica prospettica per poter avere dati sempre più attendibili sull'efficacia del medicamento.

Bibliografia

1. Steiner R. *Conoscenza Antroposofica dell'Uomo e Medicina*. Milano: Editrice Antroposofica; 1983.
2. Steiner R. *Scienza dello Spirito e Medicina*. Milano: Editrice Antroposofica; 1983.
3. Steiner R. *Conoscere l'uomo secondo corpo, anima e spirito*. Milano: Editrice Antroposofica; 2005.
4. Steiner R. *Problemi di Fisiologia e Terapia alla Luce della Scienza dello Spirito*. Milano: Editrice Antroposofica; 1993.
5. Steiner R. *Fondamenti Scientifico-Spirituali della Terapia*. Milano: Editrice Antroposofica; 1987.
6. Steiner R. *Elementi Fondamentali per un Ampliamento dell'Arte Medica*. Milano: Editrice Antroposofica; 1977.
7. Bott V. *Medicina Antroposofica*. Palermo: Nuova Ipsa Editore; 1999.
8. Fintelmann V. *Elementi di Medicina Antroposofica*. Como: L'altra Medicina Studio; 1996.
9. Pelikan W. *Le Piante Medicinali*. Alassio: Natura e Cultura Editrice; 1999.
10. Overstolz A. Il vischio nella terapia dei tumori. *Schweizerische Zeitschrift für GanzheitsMedizin*. 1998;10:352-6.
11. Büssing A. Immune modulation using mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung* 2006;56(6A):508-15.
12. Douch G. Anthroposophical medicine: a research based extension to conventional medicine. *Focus on Altern Compl Ther* 2003;8(1):135-136.
13. Elluru S, Duong Van Huyen JP, Delignat S, Prost F, Bayry J, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Molecular mechanisms underlying the immunomodulatory effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung*.2006;56(6A):461-6.
14. Haitò T, Berki T, Pálkàs L, Boldizsár F, Németh P. Investigation of the effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on the proliferation and apoptosis of murine thymocytes: bell-shaped curve of efficacy and help in immunological dose-finding. *Arzneimittelforschung* 2006;56(6A):441-6.
15. Harmsma M, Ummelen M, Dignef W, Tusenius KJ, Ramaekers FCS. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador on cell cycle and survival of tumor cells. *Arzneimittelforschung* 2006;56(6A):474-82.
16. Huber R, Claßen K, Werner M, Klein R. *In vitro* immunoreactivity towards lectin-rich or viscotoxin-rich mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador applied to healthy individuals: a randomize double-blind placebo controlled study. *Arzneimittelforschung* 2006;56(6A):447-56.
17. Kelter G, Fiebig HH. Absence of tumor growth stimulation in a panel of 26 human tumor cell lines by mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador *in vitro*. *Arzneimittelforschung*. 2006;56(6A):435-40.
18. Kovacs E, Link S, Toffol-Schmidt U. Cytostatic and cytotoxic effects of mistletoe (*Viscum album* L.) guercus extract Iscador. *Arzneimittelforschung* 2006;56:467-73.
19. Maldacker J. Preclinical investigations with mistletoe (*Viscum album* L.) extract Iscador. *Arzneimittelforschung* 2006;56(6A):497-507.
20. Urech K, Schaller G, Jäggy C. Viscotoxins, mistletoe lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung* 2006;56(6A):428-34.

21. Toelg M, Antonu H, Reiss B, Ramos MH. Quality of life of cancer patients under adjuvant mistletoe treatment. *Schweizerische Zeitschrift für Ganzheits Medizin* 2005;17(5):294-299.
22. Piao BK, Wang YX, Xie GR, Mansmann U, Matthes H, Beuth J, Lin HS. Impact of complementary mistletoe extract treatment on quality of life in breast, ovarian and non-small cell lung cancer patients: a prospective randomized controlled clinical trial. *Anticancer Res* 2004;24(1):303-9.
23. Mabed M, El-Helw L, Shamaa S. Phase II study of *Viscum fraxini*-2 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004;90(1):65-9.
24. Schneider B. The retrolective pharmacoepidemiological cohort study for evaluation of the efficacy and safety of a standardized mistletoe extract iscador: the methodological perspective. *Focus Altern Compl Ther* 2003;8(1):157.
25. Toelg M, Reiss B, Antonu H. Chemotherapy with accompanying mistletoe therapy: a prospective, non-randomized, and controlled open study (AWB) on life quality. *CO'MED* 2005;11(8):18-22.
26. Carlsson M, Arman M, Backman M, Flatters U, Hatschek T, Hamrin E. Evaluation of quality of life/life satisfaction in women with breast cancer in complementary and conventional care. *Acta Oncol*, 2004;43:27-34.
27. Eggenschwiler J, Patrignani A, Wagner U, Rehrauer H, Schlapbach R, Rist L, Ramos MH, Viviani A. Gene expression profiles of different breast cancer cells compared with their responsiveness to fermented mistletoe (*Viscum album* L.) extracts iscador from oak (*Quercus*), pine (*Pinus*), white fir (*Abies*) and apple tree (*Malus*) *in vitro*. *Arzneimittelforschung*. 2006;6(6A):483-96.
28. Kienle GS. La medicina antroposofica e le sue applicazioni in oncologia. Revisione critica degli studi preclinici e clinici sui preparati di *Viscum Album*. *Atti del congresso sulle medicine complementari in oncologia: quale stato dell'arte*; Milano, 22 aprile 2005,.
29. Kienle GS, Berrino F, Büssing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H. Mistletoe in cancer—a systematic review on controlled clinical trials. *Eur J Med Res* 2003;8(3):109-119.
30. Kienle GS, Kiene H. Complementary cancer therapy: a systematic review of prospective clinical trials on anthroposophic mistletoe extracts. *Eur J Med Res*. 2007;12:103-19
31. Grossarth-Maticsek R, Kiene H, Baumgartner S, Ziegler R. Use of Iscador, an extract of European mistletoe (*Viscum album*), in cancer treatment: prospective nonrandomized and randomized matched-pair studies nested within a cohort study. *Altern Ther Health Med* 2001;7:57-78.
32. Bock PR, Friedel WE, Hanisch J, Hoffmann J, Karasmann M, Schneider B. Adjuvant standardized mistletoe extract in early stage breast carcinoma: a multicentre comparative retrolective epidemiological cohort study. *Focus Alternv Compl Ther*. 2003;8(1):125-6.
33. Bock PR, Friedel WE, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B. Efficacy and safety of long-term complementary treatment with standardized European mistletoe extract (*Viscum album* L.) in addition to the conventional adjuvant oncologic therapy in patients with primary non-metastasized mammary carcinoma. *Arzneimittelforschung*. 2004;54(8):456-66.
34. Augustin M, Bock PR, Hanish J, Karasmann M, Schneider B. Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/ AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. *Arzneimittelforschung*. 2005;55(1):38-49.

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

Vittorio Unfer (a), Pietro Cavalli (b)

(a) *Sapienza Università di Roma*

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

Il myo-inositolo

Il myo-inositolo è un isomero dello zucchero alcolico C6 che appartiene alle vitamine del gruppo B. Numerosi studi hanno suggerito che il myo-inositolo giochi un ruolo importante nella morfogenesi e citogenesi cellulare, nella sintesi dei lipidi, nella struttura delle membrane cellulari e nella crescita cellulare. In particolare, è stato dimostrato che il myo-inositolo è il precursore della sintesi dei fosfoinosidi. Costituisce cioè il sistema di trasduzione del segnale del fosfatidilinositolo conosciuto per essere coinvolto nella regolazione di diverse funzioni cellulari inclusa la proliferazione cellulare.

L'importanza dell'attivazione del ciclo del fosfatidilinositolo nella trasduzione di diversi tipi di informazione attraverso la membrana plasmatica è diventata via via più importante negli ultimi anni. È attivata in risposta a stimoli ormonali o di altri tipi e coinvolge un'idrolisi recettore-dipendente di un precursore lipidico dell'inositolo al fine di generare l'1,4,5-trifosfato inositolo. Questo è un secondo messaggero che regola diversi tipi di processi cellulari modulando il rilascio intracellulare del Ca²⁺ in molteplici sistemi cellulari. Sebbene molti di questi dati derivino da studi condotti su cellule somatiche, si sta formando un'evidenza clinica crescente che tali eventi cruciali siano correlati anche allo sviluppo dei gameti, inclusa la maturazione ovocitaria e spermatica, la fecondazione e il primo sviluppo embrionale.

I difetti di chiusura del tubo neurale

I difetti di chiusura del tubo neurale (DTN) rappresentano una tra le più comuni cause di malformazioni congenite, per una frequenza che varia tra lo 0,5 e 2 ogni 1000 gravidanze. Il tubo neurale è la struttura embrionale la cui chiusura si completa entro la quarta settimana successiva al concepimento e che si sviluppa a formare il sistema nervoso centrale (SNC): nella parte rostrale dà luogo alla formazione delle strutture encefaliche e nella parte caudale il midollo spinale. Il processo di formazione e chiusura del tubo neurale prende anche il nome di neurulazione e si articola in due fasi: una primaria e una secondaria. Il DTN dipende da un'alterazione dei meccanismi di chiusura di tale struttura, con conseguenti gravi malformazioni, tra le quali la spina bifida (mielo-meningocele) e l'anencefalia costituiscono gli eventi più frequentemente osservabili, mentre altri quadri clinici (cranio-rachischisi, iniencefalia, encefalocele) rappresentano forme meno frequenti.

I DTN sono causa importante di mortalità (l'anencefalia non è compatibile con la vita) e di morbilità (soggetti affetti da spina bifida presentano vari gradi di disabilità, dipendenti dal livello della lesione midollare).

Generalmente, i DTN vengono considerati malattie di tipo multifattoriale (causate dalla interazione tra fattori ambientali e genetici) e quindi difficilmente prevedibili, a differenza delle malattie monogeniche. Pertanto, è sempre assai difficile la valutazione del rischio di occorrenza dei DTN. Inoltre, anche la stima del rischio di ricorrenza (la probabilità che si possa ripetere di nuovo una gravidanza affetta da DTN, sia a carico della coppia che della famiglia) non è facilmente definibile.

Un valore compreso tra il 3% e il 5% viene comunemente utilizzato per la definizione del rischio di ricorrenza dopo una gravidanza affetta. Tale rischio rappresenta un incremento di circa 50 volte rispetto alla popolazione normale ed è quindi correlabile con condizioni di tipo genetico. Tuttavia esistono condizioni differenti, in cui il DTN può essere associato ad altre anomalie congenite, definiti DTN sindromici. Ad esempio, alcune anomalie cromosomiche, sia di tipo aneuploide che strutturali, possono essere associate a DTN e ad altri difetti congeniti. Talvolta, la storia familiare della coppia rileva altri casi di DTN, con modalità di trasmissione di tipo autosomico dominante, recessivo o X-linked. Anche l'esposizione materna a teratogeni (assunzione di farmaci anticonvulsivanti, diabete, ipertermia, deficit o ridotto assorbimento di folati, infezioni) possono essere associati a DTN. Per tutti questi motivi, la vecchia classificazione dei DTN in sindromici e non sindromici deve venire considerata obsoleta, in quanto non è in grado di aiutare il medico né a stabilire un corretto rischio di ricorrenza, né di suggerire interventi terapeutici in ambito preventivo.

Acido folico e DTN

Anche se la somministrazione periconcezionale di acido folico è in grado di prevenire la maggior parte dei DTN, si stima che circa il 30% di tali malformazioni sia indipendente dall'apporto di folati. La segnalazione di ricorrenza di DTN nonostante una corretta assunzione periconcezionale di acido folico rafforza ulteriormente l'ipotesi di una eterogeneità eziologia di tali condizioni e suggerisce la presenza di differenti sottotipi di DTN, la maggior parte dei quali ritenuta folato-sensibile, mentre altri vengono ritenuti folato-resistenti. Nei casi folato-resistenti non è al momento disponibile alcuna terapia preventiva. Lo studio di modelli murini sperimentali ha consentito di individuare meglio la presenza di sottotipi di DTN. Mentre nel topo *Pax3* e *cited2* la ricorrenza di DTN può venire controllata dalla somministrazione di acido folico, il tipo *curly tail* appare resistente a tale tipo di intervento. Il topo *curly tail* costituisce quindi, ad oggi, il modello murino per lo studio dei DTN folato-resistenti.

La risposta alla supplementazione periconcezionale di acido folico costituisce un elemento fondamentale per una corretta classificazione dei DTN. Per questi motivi i DTN vengono oggi distinti non più in sindromici e non sindromici, bensì in sensibili o resistenti all'acido folico.

L'associazione di inositolo e acido folico

L'inositolo è una vitamina necessaria per la chiusura del tubo neurale nel topo, in cui l'effetto è mediato dalla proteina-chinasi C (PKC). Sia la somministrazione di *myo*-inositolo che di *D*-chiro-inositolo prevengono DTN nel topo *curly tail* e suggeriscono la sua efficacia nel controllo delle forme di DTN folato-resistenti nel modello murino (5). La somministrazione di inositolo a 0,08 mg/kg/die contribuisce inoltre a ridurre l'incidenza di DTN nel ratto diabetico dal 20,4% al 9,5% ed è in grado di ridurre l'occorrenza di DTN nel topo *curly tail*; il suo impiego è stato quindi proposto anche per la prevenzione dei DTN nell'uomo.

Bassi livelli di inositolo sono stati rilevati nel sangue di donne con gravidanza affetta da DTN, mentre la somministrazione di inositolo associata ad acido folico si è dimostrata in grado di garantire una gravidanza a termine, senza effetti collaterali per la madre o il feto, nonostante un iniziale elevato rischio di ricorrenza della patologia. Ad oggi risultano trattate con successo mediante l'associazione di inositolo e acido folico altre gravidanze ad elevato rischio di ricorrenza di NTD. L'impiego di inositolo si è dimostrato inoltre privo di effetti collaterali, sia per quanto riguarda effetti teratogeni che di perdite fetali nel topo *curly tail*, nel ratto e nel coniglio.

Nell'uomo, l'inositolo è stato impiegato senza effetti collaterali nel trattamento di disturbi psichiatrici, nel miglioramento della sensibilità all'insulina in corso di ovaio policistico, nel trattamento della psoriasi in associazione con litio. Nel bambino, l'inositolo è stato utilizzato per il trattamento dell'autismo e per la sindrome da *distress* respiratorio. I dosaggi sono nell'adulto sino a 18 g/die e nel bambino 200 mg/kg/die.

L'inositolo è una vitamina diffusa in molti alimenti. È oltremodo improbabile perciò che il suo utilizzo possa costituire un rischio per la madre od il feto. In uno studio condotto su 12 gravidanze di 10 donne con precedenti gravidanze affette da DTN resistente all'acido folico, perché avevano avuto due gravidanze affette da DTN e almeno una preceduta dalla corretta somministrazione di acido folico, sono state trattate con myo-inositolo e si sono ottenuti risultati preliminari assai favorevoli. Non è stato rilevato alcun effetto collaterale legato all'inositolo e tutte le gravidanze si sono concluse senza episodi di DTN (8).

I dosaggi utilizzati sono stati i seguenti:

- acido folico 5 mg/die
- myo-inositolo 1000 mg/die

a partire da almeno 1 mese prima del concepimento sino a due mesi dal concepimento.

Di seguito il protocollo di arruolamento utilizzato:

- accurata (ri)valutazione ecografica della gravidanza per la definizione di malformazioni associate
- consulenza genetica alla coppia con anamnesi familiare e storia clinica
- ricostruzione del pedigree su almeno tre generazioni
- mappa cromosomica (coppia)/citogenetica molecolare
- glicemia/curva da carico di glucosio (madre)
- genotipizzazione MTHFR, MTRR, CBS, MTHFD1, RFC1 (coppia).

In conclusione, i dati preliminari suggeriscono che la terapia periconcezionale con inositolo associato ad acido folico sia da considerare priva di effetti collaterali ed efficace nella riduzione del rischio di ricorrenza dei DTN. Il suo impiego potrebbe quindi venire consigliato a tutte le donne con una precedente gravidanza affetta da DTN di tipo multifattoriale.

Interazione tra inositolo e glucosio in gravidanza

I bambini di madri diabetiche hanno un aumentato rischio di malformazioni congenite, specialmente del sistema nervoso centrale e del cuore. Il meccanismo secondo il quale l'iperglicemia induca l'embriopatia non è ancora ben compreso, sebbene abbia probabilmente un'etiologia multifattoriale. Essa si presenta prima della settima settimana gestazionale.

Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che alte concentrazioni di glucosio diminuiscono il contenuto di inositolo e aumentano quello di sorbitolo a livello embrionale. Questo suggerisce che alti contenuti di glucosio portino a un'aumentata incidenza di dismorfogenesi causata dall'aumento del sorbitolo, dalla diminuzione dell'inositolo o da entrambe le cose. Aggiungendo inositolo diminuisce il contenuto in sorbitolo e aumenta la concentrazione

embrionale di inositolo che riduce le lesioni del tubo neurale. Somministrando un inibitore dell'aldoso-reduttasi (che riduce la produzione di sorbitolo) non si sono ottenuti gli stessi risultati in termini di ripristino dei livelli di inositolo embrionale. Questo suggerisce che siano i livelli di inositolo e non quelli di sorbitolo responsabili della patogenesi dei dimorfismi tipici delle gravidanze diabetiche.

Alcuni studi condotti su soggetti diabetici alimentati con una dieta ricca di inositolo hanno dimostrato una significativa riduzione dell'incidenza dei difetti del tubo neurale rispetto a soggetti diabetici non trattati con inositolo.

Conclusioni

I difetti di chiusura del tubo neurale costituiscono una frequente causa di malformazione congenita, per una frequenza di 0,5 – 2/1000 gravidanze. Il tubo neurale è la struttura embrionale che forma nella parte cefalica le strutture encefaliche e, nella parte caudale, il midollo spinale. Il difetto deriva da un improprio meccanismo di chiusura della struttura entro la quarta settimana di gravidanza, con il risultato di determinare malformazioni sia a livello cerebrale che spinale (più frequentemente spina bifida/mielomeningocele e anencefalia, più raramente e, a seconda della localizzazione del difetto di chiusura, craniorachischisi, encefalocele/exencefalia). Tali condizioni sono gravate da un elevato tasso di mortalità o di morbilità e da un pesante impatto personale, familiare e sociale. La prevenzione primaria con acido folico ha universalmente ridotto sia la morbilità che la mortalità associate ai DTN. Tuttavia anche se l'assunzione periconcezionale di acido folico è in grado di prevenire una certa proporzione di casi, si ritiene che almeno il 30% dei casi di DTN sia indipendente dai livelli di acido folico e dalla sua assunzione. In questi casi, definibili "folato-resistenti", non è attualmente disponibile alcun trattamento preventivo.

Ulteriori evidenze della presenza di sottotipi di DTN (folato-sensibili e folato-resistenti) viene suggerita da studi su animali: nei modelli murini omozigoti per mutazioni dei geni *Pax3*, *Cart1*, *crooked tail*, è possibile prevenire i difetti del tubo neurale mediante somministrazione esogena di acido folico, mentre il topo mutante *curly-tail* appare resistente all'acido folico. Proprio in relazione alla efficacia della risposta all'acido folico, la classificazione *Online mendelian inheritance in man* (OMIM) individua nell'uomo due differenti tipologie di difetti di chiusura del tubo neurale:

- *Neural Tube Defects, folate sensitive* (MIM 60163)
- *Neural Tube Defects* (MIM 18294)

Vanno pertanto esplorate altre possibilità di prevenzione primaria dei DTN resistenti all'acido folico. La somministrazione di myo-inositolo e di D-chiro-inositolo riesce a prevenire l'occorrenza di DTN nel topo *curly-tail* (5). La supplementazione con inositolo riduce inoltre in modo significativo la frequenza di DTN nel ratto diabetico.

Nell'uomo basse concentrazioni ematiche di inositolo sono state rilevate in donne gravide con feto affetto da DTN. Inoltre l'impiego periconcezionale di inositolo associato ad acido folico è stato impiegato con successo in gravidanze che presentavano un elevato rischio di ricorrenza per DTN, verosimilmente di tipo folato-resistente. L'inositolo è un isomero del glucosio, è diffuso in moltissimi alimenti e costituisce un elemento costitutivo della struttura cellulare, sia nella forma libera, sia come fosfatidil-inositolo e fosfoinositide. L'inositolo è un nutriente indispensabile ed essenziale per la crescita e la sopravvivenza cellulare in coltura.

Nell'uomo elevate dosi di inositolo (sino a 18 gr/die) sono state impiegate, senza particolari effetti collaterali, per il trattamento di disturbi psichiatrici e per migliorare la sensibilità all'insulina nella sindrome da ovaio policistico. Nel bambino l'inositolo è stato impiegato, a

dosaggi sino a 200 mg/kg e senza effetti collaterali, per il trattamento dell'autismo e della sindrome da *distress* respiratorio. L'inositolo è disponibile come integratore alimentare e non viene classificato come principio farmaceutico. È inoltre acquistabile in farmacia senza alcun tipo di prescrizione o ricetta medica. Sino ad oggi risultano trattate numerose gravidanze a rischio di DTN mediante l'associazione acido folico e inositolo.

Sono infatti state seguite 10 donne che hanno portato a termine 12 gravidanze complessive dopo avere presentato almeno una precedente gravidanza affetta da NTD e nelle quali si era verificata almeno una delle seguenti condizioni:

- a) ricorrenza di DTN nonostante una corretta profilassi con acido folico;
- b) genotipo *wild type*/eterozigote per i più frequenti polimorfismi dei geni MTHFR, MTRR, CBS, coinvolti nel metabolismo dell'acido folico.

Tutte le donne nelle loro 12 gravidanze avevano assunto in periodo periconcezionale 500-1000 mg di inositolo e 5 mg di acido folico/die a partire da 3 mesi prima del concepimento sino al 60° giorno dopo il concepimento. Nessun caso di DTN è stato rilevato e nessun effetto collaterale significativo, sia per la madre che per il feto, è stato segnalato (7, 8).

Sulla base di questi risultati (e come esplicitato dal modulo informativo) è in corso nel Regno Unito lo studio clinico "*the PONTI trial*", coordinato dallo *Institute of Child Health* presso *University College of London* (ICH UCL) per lo studio degli effetti di inositolo associato ad acido folico nella prevenzione dei DTN.

Il trattamento con inositolo associato ad acido folico dipende da un corretto inquadramento diagnostico ed eziologico della patologia congenita, aspetto fondamentale per fornire una classificazione dei DTN, che possa essere utile nella gestione del rischio di ricorrenza. Inoltre lo studio di polimorfismi di geni coinvolti nel *pathway* dei folati (MTHFR, MTRR, RFC1, MTHFD1) potrebbe aiutare a definire non solo un rischio di ricorrenza generico ma anche ad inquadrare correttamente la classificazione eziologica dei DTN. In pratica si tratta di definire e condividere un percorso diagnostico, a portata di tutte le strutture ospedaliere regionali, che possa portare alla corretta classificazione del DTN, alla definizione del rischio di ricorrenza, all'impiego dello schema di prevenzione più appropriato, ad un *counseling* medico più efficace.

Bibliografia

1. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338(8760):131-7.
2. Czeizel AE, Dudás. I Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-5.
3. Cockroft DL. Changes with gestational age in the nutritional requirements of postimplantation rat embryos in culture. *Teratology* 1998;38:281-90.
4. Groenen PM, Peer PG, Wevers RA, Swinkels DW, Franke B, Mariman EC, Steegers-Theunissen RP. Maternal myo-inositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:1713-9.
5. Greene ND, Copp AJ. Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat Med* 1997;3(1):60-6.
6. Cogram P, Tesh S, Tesh J, Wade A, Allan G, Greene ND, Copp AJ. D-chiro-inositol is more effective than myo-inositol in preventing folate-resistant mouse neural tube defects. *Hum Reprod* 2002;17(9):2451-8.
7. Cavalli P, Copp A J. Inositol and folate resistant neural tube defects. *J Med Genet* 2002;39(2):E5.
8. Cavalli P, Tedoldi S, Riboli B. Inositol supplementation in pregnancies at risk of apparently folate-resistant NTDs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2008;82(7):540-2.

MICRODOSI

Marcella Saponaro

Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

Introduzione

È possibile utilizzare un farmaco in dosi minime ottenendo lo stesso effetto terapeutico voluto?

La ricerca del medico messicano Eugenio Martinez dimostra che questo è possibile, confortato anche dall'esperienza clinica, ormai ventennale, di migliaia di medici in America Latina (1, 2). Nel mio libro recente su questo tema (3), espongo da vicino gli aspetti tecnici e clinici di questa ricerca, che apre uno scenario interessante nel campo medico e nel concetto stesso di dosaggio farmacologico. Le microdosi sono diluizioni ponderali di rimedi terapeutici (farmaci, tinte madri di pianta fresca, oli essenziali) che riducono anche di 1000 volte le dosi abituali utilizzate. Si ottengono i medesimi risultati terapeutici ma sono privi degli effetti secondari abituali e inoltre non producono alcuna dipendenza.

Preparazione

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 del numero di Avogadro), sia per la presenza del principio attivo, sia per la mancanza del criterio diagnostico del simile, sia per il veicolo diverso. Se il paziente è allergico al farmaco, lo sarà anche alla sua microdose. 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.

Meccanismo d'azione

Per questi rimedi si suppone valido il meccanismo d'azione della "via breve", che utilizza il sistema neuroendocrino (costituito dall'asse ipotalamo-pituitaria-surrene o IPS e dall'asse ipotalamo-pituitaria-gonadi o IPG). L'ipotalamo è una componente fondamentale dell'asse e un importante centro di smistamento: integra informazioni sullo stato interno del corpo, emozioni, stimoli ambientali, convertendoli poi in segnali ormonali, che hanno la funzione di mantenere uno stato di omeostasi degli organi. Il principale nucleo del SNC coinvolto nella regolamentazione dell'asse neuroendocrino è quello paraventricolare dell'ipotalamo (NPV). I neuroni del NPV rappresentano la componente finale di una rete neuronale specifica di collegamento. Molti risultati di laboratorio suggeriscono che stimoli chimici applicati alla cavità orale possono modulare la funzione dell'ipotalamo e del sistema nervoso autonomo. Questo è importante se si vuole comprendere il probabile meccanismo d'azione delle microdosi, dal momento che la loro via di somministrazione preferenziale è quella sopralinguale. La base anatomica è data dalle connettività neurali esistenti tra orofaringe e sistema nervoso autonomo.

L'innervazione della lingua e dell'orofaringe proviene da tre nervi cranici: il nervo facciale (VII), il nervo glossofaringeo (IX) e il nervo vago (X). Le fibre afferenti arrivano fino al midollo e terminano nel nucleo solitario omolaterale.

È stato dimostrato che:

- Le cellule del nucleo solitario comunicano con il NPV dell'ipotalamo (4, 5) e la stimolazione del nucleo solitario attiva le cellule dell'ipotalamo che secernono la vasopressina (6, 7).
- Il nucleo solitario si proietta anche al nucleo intermedio laterale del midollo spinale, dove influisce sulla componente simpatica del sistema nervoso autonomo.
- L'informazione gustativa che viene trasmessa tramite la *chorda timpani* (ramo del nervo facciale) attiva il sistema ipotalamico istaminergico (8).

Tutto ciò avvalorava la possibilità che piccole quantità di microdosi applicate per via sopralinguale possano attivare il sistema neuroendocrino e arrivare, attraverso il NPV ipotalamico, agli organi bersaglio.

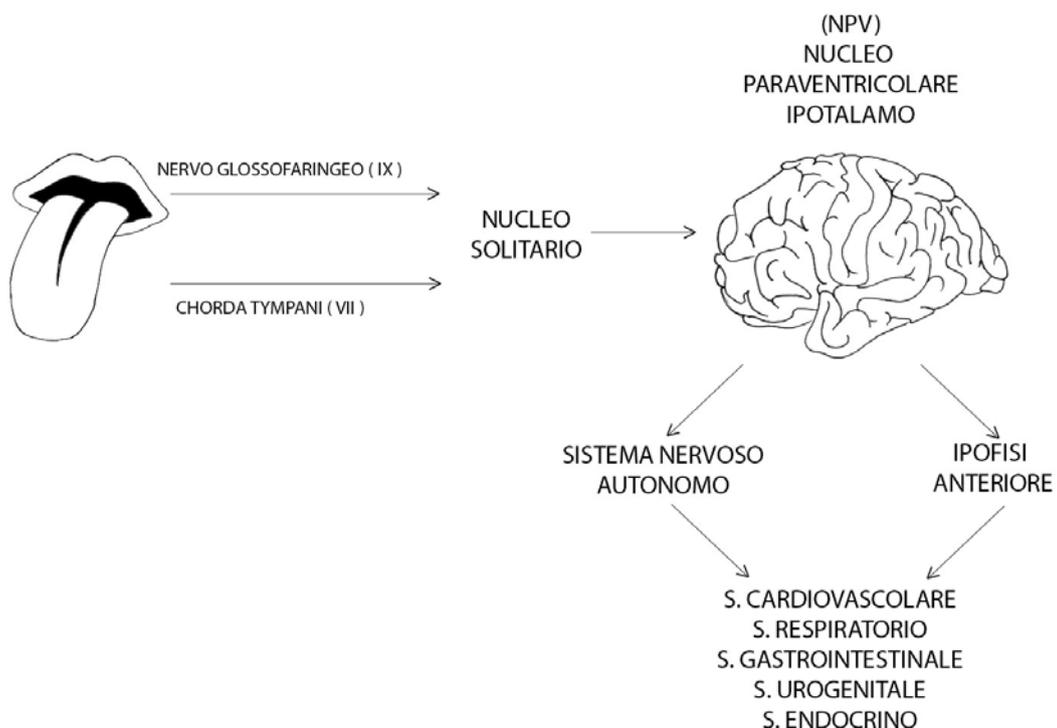


Figura 1. Asse neuro endocrino

Microdosaggi: futuro della farmacopea?

Cercando nelle pubblicazioni delle diverse riviste scientifiche accreditate, possiamo riscontrare già vari esperimenti ed esperienze cliniche effettuate con microdosaggi farmaceutici, quasi a dimostrare una tendenza o comunque un'intuizione crescente verso questa direzione. Basti pensare alla riduzione graduale della quota estrogenica nella pillola contraccettiva o all'utilizzo di piccole dosi di estrogeni in menopausa (9).

Nelle pubblicazioni presenti in tutta la bibliografia, non ci si riferisce propriamente alle diluizioni del dottor Martinez, (anche se le dosi sono di gran lunga inferiori a quelle ordinariamente usate, da 10 a 100 volte in meno). Ma questo è, in ogni caso, un segnale importante per la ricerca sulle microdosi. Interessante per esempio il trattamento della chetoacidosi diabetica con bassissime dosi di insulina (10, 11) o la iperstimolazione ovarica con bassissime dosi di GnRH (12).

Metodo di preparazione di farmaci

La preparazione delle microdosi (MD) è estremamente semplice, non richiede una tecnologia sofisticata e sta alla portata di qualunque medico o farmacista. Bisogna disporre di due miscele idroalcoliche, previamente pronte, costituite da acqua naturale senza cloro e alcool a 95°, chiamate per distinguerle veicolo 1 e veicolo 2. Il veicolo 1 è costituito dal 66% di alcool e 33% di acqua, mentre il veicolo 2 è costituito al contrario dal 66% di acqua e 33% di alcool.

Per prima cosa si mescola la dose diaria del farmaco in 20 mL di veicolo 1, ottenendo una miscela che si chiama SOLUZIONE BASE. Ovviamente la dose quotidiana del farmaco può variare a seconda della gravità della malattia, altrimenti si fa riferimento a quella normalmente consigliata dai protocolli ad un adulto di 60 kg nelle 24 ore. Ad esempio per preparare la MD dell'acido acetilsalicilico, si prende 1 grammo di aspirina e si mescola a 20 mL di veicolo 1 contenuto in una boccettina di vetro scuro con contagocce. Si ottiene così la SOLUZIONE BASE dell'aspirina, che agiteremo vigorosamente (non per potenziarla, come in omeopatia, ma per ottenere una miscela omogenea). Per ottenere la MICRODOSE da dare al paziente si prende un'altra boccettina di 20 mL contenente questa volta il veicolo 2 e diluiremo 150-200 (a seconda dei casi) gocce di soluzione base dell'aspirina, ottenendo la microdose (MD) di aspirina (1, 2). Questo procedimento è valido per qualunque farmaco, utilizzando sempre la dose di 24 ore di cui necessita il paziente. Una regola importante è quella di usare sempre un unico principio attivo per la preparazione (i farmaci composti da due o più principi non vengono utilizzati, per evitare interferenze o effetti spiacevoli).

Metodo di preparazione da estratti vegetali

Per le piante si diluirà direttamente nel veicolo 2 alcune gocce della tintura madre (T.M.) specifica. Il numero delle gocce varierà col grado di "potenza" della pianta stessa (ad esempio 60 gocce di T.M. di passiflora in 20 mL di veicolo 2 oppure 30 gocce di T.M. di artemisia in 20 mL di veicolo 2). Per gli oli essenziali bastano due gocce in 20 mL di veicolo 2.

Posologia

La posologia abituale è di 2 gocce sopralinguali 4 volte al giorno. Per aumentarne l'efficacia, il primo giorno del trattamento si prendono due gocce sopralinguali ogni 10 min la prima ora e poi ogni ora per il restante giorno.

Vantaggi

L'uso 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. In America Latina i risultati clinici sono così rilevanti che ormai migliaia di medici le utilizzano nelle varie strutture pubbliche, con diverse applicazioni (antidolorifici, antibiotici, psicofarmaci, antinfiammatori, ecc.).

Nel campo fitoterapico si può prevenire l'esaurimento e l'uso massivo di varie specie vegetali ma soprattutto si apre lo scenario di un uso orale sempre più allargato degli oli essenziali (finora visto giustamente con molta cautela). Microdosi di oli essenziali utilizzati non hanno mai presentato effetti collaterali, secondo i risultati clinici osservati con oli essenziali estratti dall'origano o dal timo, in caso di candidosi, infezioni respiratorie, malattie virali, infezioni batteriche o da achillea, ottima come antinfiammatorio in campo ginecologico per cisti ovariche, leucorrea, dismenorrea. Davvero buono poi l'uso della camomilla nelle dermatiti allergiche o del basilico negli stati depressivi lievi (3).

Prospettive di ricerca

Sulla base di quanto detto, sarebbe auspicabile una ricerca approfondita sul tema delle microdosi, con vari possibili obiettivi:

- approfondirne il possibile meccanismo d'azione neuromonale, finora forse poco studiato, allargando così l'approccio al tema dei dosaggi farmacologici necessari.
- effettuare una sperimentazione con principi attivi puri, senza interferenza di eccipienti, valutandone la diversa solubilità in veicolo alcolico.
- sperimentare nuovi preparati con veicoli non alcolici (o sotto forma di compresse).
- allargare la lista dei principi attivi e delle piante utilizzabili in microdose.
- monitorare l'efficacia della terapia con esami strumentali o batteriologici prima e dopo l'assunzione.
- applicare una ricerca clinica nel campo delle tossicodipendenze.

È un impegno che ci avvicinerebbe sempre più ad una maggiore qualità di cura, oltre che a quel giuramento che ci è ancora caro: "*Primum non nocere*".

Bibliografia

1. Martinez E B. *Guia terapeutica en microdosis*. Veracruz (Mexico): Herbal; 1998.
2. Martinez E B, Martinez Olivares D. *Farmacologia, Medicina Tradicional Y Microdosis*. Veracruz (Mexico): Herbal; 1994.
3. Santello M, Saponaro M. *Microdosi*. Roma: Marrapese; 2006.
4. Kannan H, Yamashita H. Connections of neurons in the region of the nucleus tractus solitarius with the hypothalamic paraventricular nucleus: their possible involvement in neural control of the cardiovascular system in rats. *Brain Res* 1985;329(1-2):205-12.
5. Lawrence D, Pittman QJ. Response of rat paraventricular neurones with central projections to suckling, haemorrhage or osmotic stimuli. *Brain Res* 1985;341(1):176-83.

6. Ciriello J, Calaresu FR. Monosynaptic pathway from cardiovascular neurons in the nucleus tractus solitarii to the paraventricular nucleus in the cat. *Brain Res* 1980;193(2):529-33.
7. Day TA, Ferguson AV, Renaud LP. Facilitatory influence of noradrenergic afferents on the excitability of rat paraventricular nucleus neurosecretory cells. *J Physiol* 1984;355:237-49.
8. Treesukosol Y, Ishizuka T, Yamamoto T, Yamatodani A. The effect of taste stimuli on histamine release in the anterior hypothalamus of rats. *Brain Res* 2003;964(1):51-5.
9. Prestwood KM, Kenny AM, Kleppinger A, Kulldorff M. Ultralow-dose micronized 17 beta-estradiol and bone density and bone metabolism in older women: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(8):1042-8.
10. Vanelli M, Chiarelli F. Treatment of diabetic ketoacidosis in children and adolescents. *Acta Biomed* 2003;74(2):59-68.
11. Navot D, Rosenwaks Z, Anderson F, Hodgen GD. Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced ovarian hyperstimulation: low-dose side effects in women and monkeys. *Fertil Steril* 1991;55(6):1069-75.

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

Maurizio Bagnato, Stefano Rizzo

Ispettorato Micologico Azienda Unità Sanitaria Locale Roma C, Roma

Introduzione

I funghi superiori sono stati utilizzati dal genere umano da millenni, inizialmente in ambienti rurali e a fini d'integrazione nutrizionale, successivamente, con il migliorare delle condizioni di vita e d'alimentazione, sono entrati nelle diete perlopiù per meriti culinari (sapore e odore), contenendo comunque anche minerali, vitamine e nutrienti quali proteine e polisaccaridi e un basso tenore in grassi. Ma usi medicinali sono noti da migliaia d'anni soprattutto in Cina e in altri paesi dell'estremo oriente. Nella pratica medica tradizionale asiatica ma anche nella medicina moderna nei paesi come Cina, Giappone e Corea e altri ancora, si usano i funghi nel trattamento delle più importanti malattie.

Epidemiologia

Gli antichi e tradizionali usi medici attualmente sono stati confermati dalla ricerca clinica e i BAM (metaboliti biologicamente attivi) dei funghi Basidiomiceti sono oggetto di una forte e 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. In Giappone la conoscenza di attività biologiche dei funghi è la medesima della Cina e vi sono 4 specie molto popolari nelle cure mediche: lo Shitake (*Lentinus edodes*) Reishi (*Ganoderma lucidum*) Maitake (*Grifola frondosa*) ed Enokitake (*Flammulina velutipes*). Discorso a parte va fatto per il *Coriolus versicolor*, che proprio in Giappone e per svariati tipi di tumori, è divenuto farmaco di elezione in ambiente ospedaliero in associazione alla chemioterapia e con ottimi risultati.

Nei paesi occidentali lo studio e le evidenze sulle proprietà biologiche dei funghi è di più recente acquisizione in particolare su *Fomes officinalis* e *fomentarius* e *Inonotus obliquus* (Chaga) la cui ricerca è stata sviluppata a seguito dell'uso nella medicina tradizionale e in alcune popolazioni dell'Est Europa nella cura dei tumori gastrointestinali. Ma grande scalpore, con recente rinnovato interesse, hanno suscitato tra i ricercatori occidentali le indagini epidemiologiche fatte proprio sui tumori attraverso l'uso in Giappone della *Flammulina velutipes* e in Brasile dell'*Agaricus blazei* Murrill (ABM).

Come noto, fino a pochi decenni fa, il Giappone era il Paese al mondo con la più alta incidenza di cancro gastrico; varie sono state le spiegazioni che andavano dalla dieta ricca di sale e di pesci con alto contenuto di mercurio e considerando anche la maggior frequenza nella popolazione nipponica del gruppo sanguigno tipo 0 ma spiegazioni certe non ve ne sono mai state; fino a che in una regione del Paese si è cominciato a notare che il coltivatori di funghi e in particolare della *Flammulina velutipes*, avevano una bassa incidenza di cancro gastrico. Da

questo dato epidemiologico sono partite le ricerche attraverso le quali il Giappone è diventato il Paese con il maggior consumo di funghi a scopi non alimentari, riportando l'incidenza del cancro gastrico a quelli di altri Paesi sviluppati. Tutto questo, senza particolari modifiche alimentari, se non per l'utilizzo di massa dei miceti.

Nella Regione del Piedade (in Brasile) nella foresta amazzonica viveva una popolazione indigena che, assumendo un particolare fungo del genere *Agaricus* (ABM), dimostrava una maggior resistenza alle malattie infettive e una sopravvivenza media superiore alle popolazioni limitrofe. Questo avveniva intorno agli anni '60. Attualmente questo fungo è coltivato in Brasile (*Cogumelo do sol*) e in tutto il mondo con ottimi risultati a livello di proprietà salutari, non essendovene comunque più alcuno allo stato naturale essendo andata distrutta la foresta amazzonica dove esso si riproduceva.

Fenomenologia

L'uso dei funghi con potenzialità terapeutiche, in seno alla comunità scientifica internazionale, ha suscitato enorme interesse per due ordini di motivi; il primo e più importante è perché i funghi hanno dimostrato la loro efficacia verso numerose malattie cronico degenerative. Questi effetti terapeutici sono dovuti da azioni farmacologiche multiple e complesse su differenti cellule e target molecolari. I componenti fungini combinano una azione sulla superficie cellulare, con una in profondità su specifici trigger che scatenano una cascata di eventi che portano ad un'alta specificità ed efficienza farmacologica. Secondariamente, i metaboliti fungini bioattivi (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. Sono migliaia oramai le pubblicazioni riguardanti gli effetti anti-infiammatori, l'attività antiossidante, l'attività antimicrobica, l'attività immunostimolante e l'attività antitumorale dei funghi superiori. L'attività antitumorale è (ovviamente) l'applicazione terapeutica più importante dei funghi; è stata studiata su circa 50 specie, e sta avendo uno sviluppo (e dei risultati) di eccezionale rilievo. Si è già accennato al Giappone con il *Coriolus versicolor* e l'azione delle glicoproteine (o proteoglicani) PSP-PSK in aggiunta alla chemioterapia e radioterapia, delle quali si migliora l'efficacia terapeutica e la tolleranza con riduzione di effetti collaterali, rallentando inoltre la crescita tumorale e prevenendo la metastatizzazione. Un generale miglioramento delle condizioni di salute sono rilevate nei malati di cancro gastrici, intestinali e polmonari. Un preciso meccanismo molecolare di azione del PSP e PSK ancora non è stato chiarito, si pensa che i composti agiscano più attraverso uno stimolo immunitario che attraverso effetti citotossici. Il lentinano un beta glucano estratto dal *Lentinus edodes* dimostra attività intrinseca antitumorale e insieme azione protettiva e preventiva.

L'azione carcinostatica è stata provata, con buoni risultati, nel cancro gastrico; la somministrazione, per lo scarso assorbimento orale, è per via endovenosa o intratumorale. *Grifola frondosa* e *Albatrellus spp.* con le loro sostanze (frazione D e MD, grifolina) hanno azione antineoplastica nei tumori gastrointestinali, polmone, fegato e mammella e queste molecole hanno un buon assorbimento per os. *Omphalotus illudens* produce la tossina sesquiterpenica chiamata illudina, inizialmente utilizzata per la sua tossicità come un antibiotico, fu abbandonata e al suo posto quale derivato semisintetico (Irofulven) si è dimostrato un potente agente alchilante contro i tumori solidi; e inoltre, la citotossicità sembra essere molto specifica nei confronti delle cellule neoplastiche e con scarso tropismo per quelle normali, incrementando efficacia e tollerabilità nei protocolli terapeutici. *Clitocybe nebularis*

produce elicitocypin, inibitore della cisteina proteasi potenzialmente di interesse nel trattamento del tumore nei casi dove le cisteina proteinasi sono coinvolte nello sviluppo tumorale. *Ganoderma lucidum*, i cui metaboliti sono coinvolti nelle azioni anti neoplastiche, sono polisaccaridi beta-D-glucani, proteine come la LZ-8 e triterpenoidi che riducono la mitogenicità, l'angiogenesi, e le cellule tumorali *in toto*, oltre ad avere azione citotossica sulle cellule tumorali tipica dei triterpenoidi. *Pholiota spumosa* produce una poliamina (putrescina) che agisce sulle cellule del cancro alla prostata non ormono dipendente inibendone la crescita. Alti livelli di poliamine individuati nelle cellule tumorali e sintetici analoghi alla spermina o spermidina hanno dimostrato buoni risultati contro cellule cancerose come quelle prostatiche. *Agaricus blazei* Murrill è uno dei funghi tra i più studiati e tra i più controversi. Nella sua complessa azione racchiude capacità antitumorali pure, di stimolo del sistema immunitario e della respirazione e di incremento delle capacità reattive cellulari. Le frazioni ATF e HM3-G contenenti in diversi rapporti l'1-4-alfa-D-glucano e 1-6-beta-D-glucano sono responsabili dell'aumento dell'apoptosi esclusivamente delle cellule cancerose come pure dell'aumento dell'attività dei NK. Lo sterolo (ergosterolo) è responsabile dell'inibizione della neoangiogenesi mentre un altro sterolo, la blazeina, stimola l'apoptosi ma non in maniera selettiva. Questo, con la tossicità e cancerogenicità derivante dalla presenza della idrazina aromatica agaritina insieme con l'azione antiapoptosica dovuta all'alto contenuto di tirosinasi (da cui > di Co Q e Ubichinone) impone un uso molto accorto e ulteriori ricerche verso un fungo che ha già comunque dato interessanti contributi nella cura, in associazione con la chemioterapia, di pazienti con carcinomi cervicali, ovarici ed endometriali migliorandone tollerabilità ed efficacia. *Phellinus linteus* anche in questo caso il polisaccaride attivo per os estratto in acqua calda (Meshima) stimola l'apoptosi cellulare inibendo l'angiogenesi in tumori ormonodipendenti (prostata e mammella). I meccanismi di azione non sono del tutto chiariti, si ipotizza però un ruolo dei Composti Attivi Esoso Correlati (AHCC). *Schizophyllum commune* anche in questo caso è il beta-D-glucano schizofillano e vi sono buone evidenze cliniche in associazione alla CHT per cancri allo stomaco, cervello e cervice uterina. *Poria cocos* oltre ai beta-D-glucani è stata riportata azione antineoplastica di composti triterpenoidi tipo lanostano attivi su cancro del polmone. Tra l'altro è componente della famosa formula erboristica anticancro cinese *Shi Quan Da Bu Tang* (molto utilizzata in malati neoplastici del mondo dello spettacolo statunitense). Per brevità non sono citati funghi con più spiccate attività immunostimolanti che comunque rientrerebbero a pieno titolo nella terapia antineoplastica. Per ultimo il *Pleurotus ostreatus* nel quale una lectina ha dimostrato attività antitumorale su animali da esperimento ma che, per i BAM presenti, per il complesso delle sue azioni, l'assenza di controindicazioni e la facile reperibilità anche fresco (è facilmente coltivabile), 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.

Solo un cenno all'aspetto fenomenologico su scala mondiale, dagli anni 70 vi è stato un progressivo incremento degli studi e dell'utilizzo dei funghi nei pazienti oncologici in molti paesi, soprattutto in Oriente dove si può trovare l'utilizzo in associazione alla chemioterapia negli ospedali pubblici giapponesi dell'estratto di PSK (*Coriolus versicolor*) farmaco riconosciuto nella loro farmacopea, al fungo nero – shiitake (*Lentinus edodes*) prescritto dai medici di base per la prevenzione del cancro, all'estratto di PSP (*Coriolus versicolor*) molto utilizzato negli ospedali coreani e cinesi, al *Ganoderma lucidum* nella MTC, al *Phellinus linteus* utilizzato soprattutto in Corea e Thailandia, al *Pleurotus ostreatus* nei Piani Sanitari per sfamare e immunizzare la popolazione di numerosi paesi africani e del sud America fino al Chaga (*Inonotus obliquus*) utilizzato negli ospedali russi e dell'ex blocco dei paesi dell'est. Sembra quasi che ogni paese abbia "sposato" un genere di fungo. Nei paesi occidentali (con esclusione degli Stati Uniti dove c'è di tutto e dove le comunità hanno da sempre apportato contributi dal paese di provenienza, fino a Paul

Stamets, micologo, che negli anni '90 ha riscoperto i funghi medicinali studiandoli dapprima come “divoratori” di petrolio nei disastri ambientali diventando poi il “vate” dei funghi su scala planetaria) si fa molto poco, e ciò risulta paradossale per un paese come l'Italia che non ha eguali per legislazione e attenzione nel mondo dei funghi e dove, unica al mondo, esiste una figura sanitaria inserita a pieno titolo nel SSN quale quella del Micologo operante negli Ispettorati Micologici diffusi capillarmente nel territorio. Ma l'unico compito demandato al micologo è quello di “riconoscere” un fungo tra quelli inseriti nella lista tra i commestibili e non e velenosi, e questo ha fortemente condizionato il nostro modo di guardare al fungo e limitato la ricerca da chi, per motivi sanitari, deve studiarli (mico-fungo logos pensiero-studio) cioè il micologo. Per una qualificazione e una formazione della figura del micologo e una nuova “filosofia” di approccio al mondo dei funghi sotto l'aspetto sanitario rivisitando l'assetto legislativo e organizzativo delle strutture pubbliche che si occupano di funghi, è da anni impegnato l'Ispettorato Micologico della ASL RMC e che, con le proposte e i progetti pionieristici che ci hanno sempre contraddistinto nel panorama sanitario italiano del settore (vedasi elenco funghi officinali da aggiungere a quelli commestibili), si pone come riferimento pubblico nazionale nel settore nell'ambito della ricerca micologica applicata alla salute.

Bibliografia

1. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Mushroom, Tumors, and Immunity: An Update. *Exp Biol Med* 2004;229:393- 406.
2. Poucheret P, Fons F, Rapior S. Biological and Pharmacological Activity of Higher Fungi: 20 Year Retrospective Analysis. *Cryptogamie, Mycologie*. 2006;27(4):311-33.

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

Ashraf Virmani (a), Franco Gaetani (a), Aleardo Koverech (a), Giovanni Laviola (b)

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

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

Malattia di Parkinson

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. A livello molecolare sono coinvolte nella patogenesi una serie di disfunzioni a livello mitocondriale e nei lipidi di membrana. PD è una malattia neurologica degenerativa per la quale nessun trattamento si è ancora rilevato in grado di rallentarne la progressione. PD è stata descritta da James Parkinson nel 1817. I principali sintomi sono:

- Tremore
- Bradicinesia (lentezza nel movimento)
- Rigidità muscolare
- Perdita di movimenti automatici
- Difficoltà di linguaggio
- Difficoltà deglutizione
- Demenza

Attualmente esistono numerosi farmaci per il controllo dei sintomi ma nessuno è in grado di rallentare o fermare la patologia. Non sono ancora conosciute le cause del PD ma sono ben descritti i fattori di rischio:

- Età: rischio maggiore nell'anziano
- Genere: rischio maggiore nell'uomo
- Stato ormonale: rischio maggiore con ridotti livelli di estrogeni
- Tossine ambientali: rischio maggiore in seguito ad esposizione ad insetticidi e diserbanti

Tra i principali fattori di rischio vi è l'età: PD compare generalmente nell'anziano o nel vecchio. Fattori ambientali e genetici causano un progressivo danno neuronale che porta alla perdita di neuroni dopaminergici nell'area del cervello chiamata *substantia nigra*.

La disfunzione mitocondriale potrebbe condurre a un danno cellulare (danno al DNA, alterata sintesi proteica e funzionalità di membrana) dovuto in parte alla ridotta produzione di energia dalla catena respiratoria mitocondriale così come l'aumentata liberazione di radicali liberi.

Composti naturali. Il Coenzima Q10

Numerosi composti esercitano un ruolo fondamentale nelle funzioni mitocondriali. Tra questi ha certamente un ruolo primario il Coenzima Q10 (CoQ10). Il CoQ10 è presente in prodotti vegetali, quali spinaci, fagioli, semi di soia e oli.

Il CoQ10 è un componente fondamentale nella catena respiratoria mitocondriale. Inoltre riduce l'apoptosi ed ha attività antiossidanti che proteggono la membrana cellulare dal danno ossidativo. In particolare:

- Nella catena respiratoria, l'attività catalitica del CoQ10 nel trasferimento degli elettroni e la traslocazione dei protoni, contribuisce in modo essenziale alla sintesi di ATP e all'attività bioenergetica della cellula.
- La proprietà antiapoptotica è dovuta alla diretta inibizione, da parte del CoQ10, dell'apertura del poro di permeabilità mitocondriale di transizione (mPTP) (1).

Bassi livelli di CoQ10 sono associati a varie patologie come la cardiomiopatia e l'encefalopatia (2, 3). Ridotti livelli di CoQ10 sono stati descritti anche nel plasma, nelle piastrine e nella corteccia cerebrale di pazienti con PD.

Ruolo del Coenzima Q10 in PD

Abbiamo esaminato la possibile azione antiossidante e il ruolo svolto nella catena respiratoria del CoQ10, valutandone la capacità di protezione nei riguardi della neurotossicità associata all'inibizione del complesso mitocondriale II.

È noto l'effetto neuroprotettivo dell'acetil-L-carnitina, una sostanza endogena, sulla neurotossicità indotta dall'esposizione a MPP+ (MPTP, 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine) o al rotenone valutata su cellule PC12 (NGF-differenziate) o in colture primarie di cellule corticali (4).

Studi su cellule IMR32 hanno evidenziato una riduzione significativa, da parte del CoQ10 (5 µM), della tossicità indotta dall'inibizione della Succinato Deidrogenasi (SDH) – complesso II da parte dell'acido 3-nitropropionico (3-NPA).

Questi risultati *in vitro* suggeriscono che il potenziamento del metabolismo energetico mitocondriale da parte di CoQ10 può prevenire la neurotossicità associata alla disfunzione mitocondriale.

Anche negli studi clinici CoQ10 ha ridotto significativamente la sintomatologia del PD ma solo ad alte concentrazioni (>1200 mg) (5). Il prodotto usato in questi studi clinici è una formulazione contenente 1200 mg di CoQ10 e 1200 mg di vitamina E utilizzata per migliorarne l'assorbimento.

Nutrigenomica e CoQ10

In pazienti affetti da PD, numerosi studi hanno evidenziato una disregolazione genica.

Sono state dimostrate mutazioni in almeno 6 geni: alpha-synuclein, dardarin (LRRK2 o leucine-rich repeat kinase 2), parkin, DJ-1, PINK-1 (PTEN *induced putative kinase* 1) e UCHL1 (ubiquitin carboxyl-terminal esterasi L1). In corso di identificazione sono altri geni che potrebbero essere mutati, come NURR1 (Nur-related factor 1) e HTRA2. Non è ancora stato valutato l'effetto del CoQ10 sulla disregolazione genica.

Conclusione: ruolo del CoQ10 nella neuroprotezione

Il potenziamento del metabolismo energetico mitocondriale da parte di CoQ10 può prevenire la neurotossicità. Nella terapia del PD, merita ulteriori indagini lo studio di possibili associazioni di questo prodotto naturale con altri agenti neuroprotettivi.

Bibliografia

1. Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Orlandini S, Orlandini G, Carella G, Brancato R, Capaccioli S. Coenzyme Q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem* 2003;278(30):28220-8.
2. Virmani A, Gaetani F, Binienda Z. Effects of Metabolic Modifiers Such as Carnitines, Coenzyme Q10, and PUFAs against Different Forms of Neurotoxic Insults: Metabolic Inhibitors, MPTP, and Methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1053:183-91.
3. Virmani A, Gaetani F, Binienda Z, Ali S. Coenzyme Q10 and the metabolic approach to neuroprotection. *Agro Food Industry Hi-tech* 2006;17:20-2.
4. Virmani A, Gaetani F, Binienda Z, Xu A, Duhart H, Ali SF. Role of mitochondrial dysfunction in neurotoxicity of MPP+: partial protection of PC12 cells by acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1025:267-73.
5. Shults, CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompoliti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL, Kurlan R, Molho E, Harrison M, Lew M; Parkinson Study Group. Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline. *Arch Neurol* 2002;59:1541-50.

SESSIONE VI

Profilo di sicurezza e aspetti regolatori

INTEGRATORI ALIMENTARI A BASE DI PIANTE ED ESTRATTI VEGETALI

Brunella Carratù, Elisabetta Sanzini

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

Introduzione

L'epidemiologia nutrizionale ha fatto considerevoli progressi negli ultimi decenni e, al momento attuale, risulta incontestabile che un elevato consumo di alimenti di origine vegetale è inversamente correlato all'incidenza di molte patologie, quali malattie cardiovascolari, metaboliche, neurovegetative e patologie infiammatorie. I nutrienti essenziali presenti nel regno vegetale non possono da soli essere titolari di questi effetti benefici sull'uomo, altri componenti esercitano evidentemente potenti attività biologiche oltre a proteine, grassi, carboidrati e micronutrienti essenziali quali vitamine e minerali. Tali sostanze vengono denominate composti fitochimici (*phytochemicals*) e comprendono decine di migliaia di molecole appartenenti a svariate classi chimiche e a famiglie botaniche anche estremamente differenti.

In seguito a queste osservazioni la comunità scientifica ha dettato una serie di raccomandazioni volte a incrementare l'assunzione di alimenti di origine vegetale, visti gli effetti positivi esercitati sull'organismo umano. Tali esortazioni sono state raccolte anche dal mondo dell'industria alimentare che ha proposto prodotti alternativi contenenti parti o estratti di piante con finalità salutistiche, dove convivono borderline formulazioni con effetti fisiologici, terapeutici e farmacologici.

Normativa

In Italia i prodotti a base di piante o estratti vegetali con valenza salutistica devono rispondere agli stessi requisiti richiesti ad un integratore alimentare sia per quanto riguarda le modalità produttive sia per quanto riguarda i controlli. Si intendono per integratori 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 e il confezionamento degli integratori alimentari deve essere effettuata solo in stabilimenti autorizzati dal Ministero della Salute. 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 e aggiorna periodicamente.

Criteri di ammissibilità

Fino a marzo del 2009 sono stati notificati al Ministero 41.000 prodotti, di questi solo 24.000 hanno concluso favorevolmente la procedura e sono stati inclusi nel registro degli integratori alimentari. Tra questi 10.000 integratori contengono solo piante e 2000 hanno come ingredienti nutrienti e piante.

Sul portale del Ministero è stata riportata fino ad aprile 2009 una lista di piante (circa 240) impiegabili come ingredienti di integratori alimentari che era stata da tempo approvata dalla Commissione Consultiva per i prodotti destinati ad una alimentazione particolare e che comunque non includeva tutte le piante utilizzate negli integratori. Per l'aggiornamento e l'ampliamento di tale elenco il Ministero ha chiesto all'Istituto Superiore di Sanità un parere tecnico-scientifico su una lista di circa 1.200 piante, comprendenti piante già presenti nella lista del Ministero, nella tabella B del disegno di legge sull'erboristeria, più altre ammesse come ingredienti in integratori già notificati dalla Commissione Unica per la Dietetica e la Nutrizione. A tale scopo un gruppo di lavoro "Piante e derivati destinati al consumo umano", composto di esperti del Dipartimento del Farmaco e del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare ha espresso come Istituto un parere operando nel seguente modo.

In via preliminare ha proceduto ad esaminare le piante che compaiono anche nei due compendi dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) relativi alle piante utilizzate negli integratori alimentari (EFSA/SC/BOTA 445 e 446 rev). In queste due liste vengono riportate piante per cui sono state segnalate o la presenza di sostanze tossiche o psicotrope o l'utilizzo come medicinale. Dalle indagini effettuate sono emersi giudizi sicuramente positivi, negativi o favorevoli purché siano rispettate alcune indicazioni per il loro impiego negli integratori. Per quanto riguarda le indicazioni a cui dovranno assoggettarsi le aziende produttrici, il Gruppo si è riferito ad organismi operanti a livello internazionale quali WHO/JEFCA, EFSA, Consiglio d'Europa (1-8) o a legislazioni comunitarie e nazionali. In alcuni casi sono state riportate le dosi massime della sostanza considerata da assumere in una giornata tramite l'integratore, in altri sono stati indicati dei livelli che possono essere presenti in alcune categorie di alimenti; in quest'ultima circostanza si è ritenuto che potesse essere la Commissione Unica per la Dietetica e la Nutrizione, operante presso il Ministero, a decidere il limite opportuno in base alla tipologia del prodotto. Inoltre non sono state prese posizioni rispetto alle piante in cui sono presenti gli antrachinoni, in quanto la problematica è già all'attenzione del Ministero.

Problemi connessi all'uso di integratori a base vegetale

L'uso di derivati delle piante è diventato molto diffuso, a volte eccessivo, per colpa dell'idea comune o errata che i prodotti derivati dalle piante siano "naturali" e, quindi, privi di effetti

nocivi. In realtà ci possono essere alcuni problemi relativi alla sicurezza d'uso dei prodotti di origine vegetale, tra cui:

- errori di identificazione;
- utilizzo di una specie differente;
- aggiunta di sostanze non ammesse;
- contaminazione con piante diverse;
- contaminazioni di origine ambientale;
- contaminazioni di origine biologica;
- contaminazioni di origine microbiologica;
- additivi, coloranti, aromatizzanti non permessi o utilizzati a concentrazioni superiori a quelle previste;
- trattamenti non consentiti o non dichiarati (ad es. irraggiamento).

Interventi dell'Istituto Superiore di Sanità

Come organo tecnico scientifico del Servizio Sanitario Nazionale questo Istituto svolge una molteplice serie di attività per garantire la sicurezza del consumatore che utilizza gli integratori a base di piante ed estratti vegetali.

Per quanto riguarda l'espletamento di pareri tecnico-scientifici relativamente alla sicurezza d'uso, risponde ai quesiti del Ministero della Salute, all'Autorità Giudiziaria, all'Autorità Garante della Pubblicità e agli Enti istituzionali periferici.

Per quanto attiene la parte analitica procede alle revisioni di analisi (legge 283/62), agli accertamenti analitici richiesti dal NAS e dall'Autorità Giudiziaria, alla consulenza per i Laboratori del controllo ufficiale e partecipa al sistema di allerta comunitario.

Gli esempi di intervento operati dall'Istituto, e qui di seguito riportati, rendono testimonianza che i rischi connessi all'uso degli integratori vegetali sono molto più numerosi rispetto a quelli che si riscontrano nei normali integratori di sostanze nutritive o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico:

- Allerta comunitario per l'Anice stellato giapponese (*Illicium anisatum*) miscelato a quello cinese (*Illicium verum*), metodo per rilevare la presenza di safrolo.
- Revisione di analisi per la presenza di corpi estranei nella *Achillea millifoglie*, trovate feci di roditori.
- Revisione di analisi per la presenza di corpi estranei in foglie di alloro, trovati filamenti di plastica, piume e semi.
- Revisione di analisi in integratore liquido per la presenza di corpi estranei, in microscopia SEM corpuscoli di magnesio, elemento dichiarato come costituente del prodotto.
- Semi di *Prunus armeniaca*: analisi e parere sulla quantità di amigdalina naturalmente presente in capsule e tavolette.
- Integratori contenenti come ingredienti semi di pompelmo e benzetonio cloruro, sale ammonico quaternario di sintesi: parere sulla sicurezza d'uso in seguito ad allerta comunitaria.
- Richiesta di analisi per la presenza di sostanze stupefacenti, psicotrope e sostanze farmacologicamente attive (Leggi n. 309/1990 e 376/2000) in integratori destinati agli sportivi e contenenti estratti vegetali.
- Revisione di analisi per la presenza di additivi non ammessi, solitamente trovati benzoati, in elisir di piante o bevande energetiche a base erboristica.

- Integratore con *Coleus forskohlii* (energetico/termogenico): segnalazione di reazione avversa, trovate scopolamina e atropina.
- Integratore con partenio e artiglio del diavolo (antinfiammatori): trovata nimesulide.
- Integratore con *Adhatoda vasica* (coadiuvante della tosse): trovata bromexina.
- Integratori contraffatti.
- Ricerca di piante non ammesse in Italia: *Eurycoma longifolia* (afrodisiaca).

Conclusioni

L'impiego di integratori alimentari potrebbe ingenerare un falso senso di sicurezza nei riguardi della propria salute e potrebbe ridurre l'attenzione nel seguire una dieta corretta, l'attività fisica e stili di vita salutari è bene ricordare che l'Organizzazione Mondiale della Sanità raccomanda l'assunzione giornaliera di 400 grammi di frutta e verdura suddivisa in due porzioni di frutta e tre porzioni di verdura e che tale indicazione è sintetizzata nello slogan: "5 al giorno per migliorare la salute" (9).

Bibliografia

1. Consiglio d'Europa - *Committee of Experts on Flavouring Substances. Active principles (constituents of toxicological concern) contained in natural sources of flavourings*. Health Protection of the Consumer Series, Ottobre 2005 Disponibile all'indirizzo: http://www.coe.int/t/e/social_cohesion/soc-sp/public_health/flavouring_substances/Active%20principles.pdf; ultima consultazione 07/10/2011.
2. European Commission - Scientific Committee on Food. *Opinion of the Scientific Committee on Food on glycyrrhizinic acid and its ammonium salt* 4 aprile 2003.
3. EFSA – Panel AFC . *Coumarin* . *Question number EFSA-Q-2003-118*. *The EFSA Journal*, 2004; 104:1-36.
4. WHO- JEFCA *Eugenol and related hydroxyallylbenzene*. Food Additives Series n. 56; 2005; P. 155-200
5. WHO- JEFCA - Food Additives Series n. 42;1998.
6. European Commission - Scientific Committee on Food. *Opinion of the Scientific Committee on Food on methyleugenol*. 26 settembre 2001.
7. Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives. *Sixty-fifth report. Quillaia extracts*. Geneva:World Health Organization . Technical Report Series 934; 2006. p. 28-33.
8. Joint WHO/FAO Expert Committee on Food Additives. *Fifty-first report. Trans-anethole*. Geneva:World Health Organization Technical Report Series 891; 2000. p. 18-21.
9. Joint WHO/FAO Expert Consultation. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Geneva: World Health Organization. Technical Report Series 916; 2003.,

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

Roma, ottobre-dicembre 2011 (n. 4) 2° Suppl.