

STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTINFIAMMATORIA DELLA CURCUMINA VERSO *TOXOPLASMA GONDII* E CONTROLLO DELLA TOXOPLASMOSI CONGENITA

Maria Cristina Angelici (a), Andrea Matteucci (b), Serena Celani (a), Fiorella Malchiodi-Albedi (b)

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

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

La curcumina

La curcumina è un diferuloilmetano (C₂₁H₂₀O₆, nome IUPAC (1E,6E)-1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-epta-1,6-dien-3,5-dione) ricavato dal rizoma carnoso della pianta erbacea perenne *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*, stessa famiglia del Ginger), volgarmente detta Turmerico, che cresce nei climi tropicali ed è coltivata in India, Indonesia, Cina, Haiti e Giamaica. Essa rappresenta il componente principale del curry, ed è quindi normalmente utilizzata come spezia, ma per centinaia di anni ha costituito, in quei Paesi, un rimedio tradizionale il cui utilizzo in campo medico è documentato in scritti risalenti a oltre 2000 anni fa. Oggi la curcumina è usata in vari Paesi come additivo per la conservazione e come colorante (E100) dei cibi ma anche come integratore alimentare dalle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie: viene commercializzata come integratore alimentare per la prevenzione delle malattie neurovegetative, contro la caduta dei capelli e per la cura di distorsioni e infiammazioni muscolari, specialmente a livello sportivo.

Le diverse potenzialità di questo principio attivo sono state studiate e documentate anche a livello scientifico allo scopo di identificarne un'applicabilità in campo terapeutico nella cura delle malattie infettive e non. I meccanismi d'azione della curcumina più descritti sono quelli di tipo antinfiammatorio, quali l'inibizione di COX-2 e 5-LOX (1) delle citochine infiammatorie e delle chinasi (PKA, PKC, CaMKII) (2) ma anche l'inibizione della proliferazione e trasformazione cellulare, la regolazione dell'induzione dell'apoptosi e l'attività antivirale. È descritta un'azione diretta sul fattore di trascrizione NF-κB con il blocco della produzione di TNF-α e AP-1 (3). Interagisce con i segnali della risposta infiammatoria non solo attraverso i recettori Toll-like, ma anche attraverso i recettori del TNF e della IL-1. Quindi è stato proposto che la curcumina blocca sia la produzione che l'azione del TNF-α.

Tali meccanismi d'azione suggeriscono la sua applicazione come principio attivo di tipo preventivo e curativo in campo oncologico (circa 800 lavori ne documentano tale attività *in vitro* e *in vivo*), contro malattie neurodegenerative, il morbo di Crohn, e l'AIDS (4). La curcumina è stata sperimentata anche contro diversi parassiti, Protozoi (*Plasmodium*, *Leishmania*, *Giardia*, *Eimeria*) e Nematodi (*Angiostrongylus cantonensis*), e diverse pubblicazioni ne documentano la capacità parassitocida al pari di quella battericida (5-13). Il dosaggio nell'uomo è stato già valutato tramite trials di fase I che hanno valutato una tolleranza e una non tossicità della curcumina fino al dosaggio massimo di 800mg/die, e trials di fase II che, trattando con questa concentrazione, hanno registrato un'ampia risposta nel trattamento del cancro, la psoriasi e la malattia d'Alzheimer (14-17).

A tutt'oggi sono 688 gli studi indicizzati su PubMed (oltre 400 dei quali pubblicati negli ultimi quattro anni) che confermano le notevoli proprietà anticancerogene, antiossidanti e antinfiammatorie della curcumina. Alcuni di questi studi segnalano anche un'attività di DNA-

damaging di questa sostanza e di induzione dell'apoptosi cellulare che essendo correlata con l'aumento di ROS intracellulare è un'attività pro-ossidante della curcumina. Tale attività la rende attiva contro il bersaglio della cellula cancerogena, ma essendo dose-dipendente viene valutata in genere per la sua somministrazione. L'assorbimento e l'utilizzazione a livello ematico della curcumina è attestato da alcuni lavori di farmacocinetica (18) che ne rivelano i metaboliti (glucoronidi e solfati di curcumina) nel plasma di volontari sani e di malati avanzati di cancro rispettivamente trattati con dosi massicce (10-12 g/die) e con dosi canoniche (3,6 g/die). È stata anche dimostrata una attività sinergica della curcumina con alcuni farmaci (19) e questo fatto è di particolare interesse in una previsione d'uso in associazione con terapie convenzionali. L'*American Food and Drug Administration* classifica la curcumina come sostanza GRAS (*General Recognition And Safety*), ovvero "Generalmente Riconosciuta Sicura" in quanto non teratogena e priva di effetti secondari, almeno all'interno dei dosaggi consentiti.

Dal 2005 a tutt'oggi i trials clinici avviati con curcumina sono 26 (clinicaltrials.gov) per la cura sia di vari tipi di cancro sia di malattie neurodegenerative (20), ma nessuno è stato finora proposto per la valutazione di efficacia dell'attività antivirale e parassitocida della curcumina.

Sono stati infine prodotti sia alcuni analoghi sintetici della curcumina (21, 22), con modificazioni della struttura finalizzate a migliorarne le proprietà farmacologiche naturali, sia molecole ingegnerizzate della curcumina molto interessanti per il disegno futuro di nuovi farmaci a base di questo principio attivo (23, 24).

Toxoplasmosi e terapie convenzionali

L'attività antinfiammatoria della curcumina può risultare utile nelle infezioni che coinvolgono la risposta cellulo-mediata dell'ospite come sono quelle di tipo parassitario. Un organismo eucariote infettante, anche se unicellulare, come nel caso dei Protozoi, conduce la sua vita da parassita attraverso varie fasi di un ciclo vitale complesso che comprende diversi stadi e sviluppa raffinati meccanismi di "escape" alla risposta immunitaria dell'ospite per sopravvivere. Nel caso di *Toxoplasma gondii*, il protozoo parassita agente patogeno della toxoplasmosi nell'uomo e negli animali, forme libere e infettanti si alternano a forme cistiche dormienti dello stesso organismo unicellulare per consentire al parassita di superare la fase in cui, internamente all'ospite, viene aggredito dalla cascata citochinica e infiammatoria della risposta tissutale. Tale forma cistica ha una grande valenza patogenetica sia perché è un passaggio del ciclo biologico nel quale il parassita rimane solo in vita latente, e quindi potenzialmente infettante, sia perché il mantenimento dello stadio cistico è dovuto al perdurare dello stato infiammatorio nel tessuto del paziente, con tutte le conseguenze dell'infiammazione cronica in termini di infiltrazione, modificazione e necrosi cellulare. Dato che *T. gondii* è un parassita con tropismo neurale e localizzazione delle cisti principalmente cerebrale (toxoplasmosi cerebrale) e oculare (toxoplasmosi oculare), il danno più grave a carico di questi tessuti nel corso di un'infezione cronica dovuta a questo parassita deriva proprio dagli effetti dell'infiammazione generata dalla risposta immunitaria dell'ospite a livello locale che porta alla formazione di consistenti foci necrotici e perdita della funzionalità dell'organo colpito (ascite, compromissione neurologica, cecità).

Da ciò è evidente quale importanza possa avere la possibilità di controllare tale stadio infiammatorio, oltre che l'infezione vera e propria da parte del parassita nella fase invasiva. Le terapie antinfiammatorie convenzionali non sono, però, applicabili nel caso delle parassitosi, perché, abbassando la barriera immunitaria dell'ospite in maniera drastica e generalizzata determinano un'invasività maggiore del parassita che può portare a infezione diffusa ed *exitus* negativo (toxoplasmosi opportunista). Tali terapie, inoltre, producono i ben noti effetti secondari,

indesiderabili, specialmente in stato di gravidanza. Poiché è tipico della toxoplasmosi l'evento di trasmissione verticale madre-figlio dell'infezione (toxoplasmosi congenita), nel caso di una prima infezione in corso di gravidanza della madre non immune è di primaria importanza:

- 1) avere a disposizione un farmaco che oltre a combattere la prima infezione della madre serva ad impedire la trasmissione del parassita al feto attraverso la placenta;
- 2) avere la possibilità di impedire l'incistamento del parassita già trasmesso nei tessuti neurali del feto, con il successivo classico sviluppo dei danni a breve (aborto spontaneo, ascite, cretinismo) e a lunga distanza (corioretinite e cecità).

Il principio attivo della medicina tradizionale, la spiramicina, macrolide con effetto parassitostatico su *T. gondii* non è efficace contro la trasmissione in gravidanza perché non passa del tutto la barriera placentare, ma è il farmaco d'elezione per la toxoplasmosi attiva perché è molto efficace contro la forma libera del parassita. Lo schema terapeutico, comunque, nel caso di accertata prima infezione in gravidanza (25), consiste nella somministrazione di spiramicina, (3gr/die per almeno un mese) mantenuta per tutto il resto della gravidanza, meno che nei casi di provata trasmissione dell'infezione al feto tramite diagnosi prenatale (liquido amniotico positivo per la ricerca del parassita). In questi casi viene somministrata una terapia con farmaci in grado di diffondere attraverso la placenta (terapia "in utero") ovvero l'associazione di pirimetamina e sulfadiazina (26), entrambi inibitori del metabolismo dei folati, interferenti con la sintesi del DNA e parassitocidi. La supplementazione con acido folinico (pirimetamina + sulfadiazina per 21 giorni, // 21 giorni spiramicina + acido folinico fino al parto) è obbligatoria in questa terapia a causa della depressione midollare da essa indotta con rischio reale di anemia megaloblastica.

Entrambi i protocolli mostrano difetti gravi, se si pensa che la spiramicina raggiunge solo in piccole dosi il feto, non passa la barriera mesencefalica e, soprattutto non è efficace del tutto contro le cisti delle quali si dimostra la non totale soppressione in corso di trattamento (27). La pirimetamina, invece, supera le barriere ed è efficace contro le cisti, perché diffonde nella parete cistica, ma è teratogena e non può essere usata prima della 18ª settimana di gestazione. Quindi non copre le infezioni periconcezionali e quelle del primo trimestre che sono quelle a maggior rischio d'aborto (25, 26). La sulfadiazina, infine, è di nota tossicità epatica, per cui in corso di terapia si rendono necessari continui controlli sugli effetti secondari alla madre e al nascituro.

Toxoplasmosi e terapie non convenzionali: nostro studio preliminare sull'uso della curcumina

La già documentata attività battericida e parassiticida ma soprattutto l'attività antinfiammatoria della curcumina, ci ha suggerito una sperimentazione *in vitro* della potenzialità di questa sostanza di origine naturale contro *T. gondii*. In particolare la capacità inibitoria sulla produzione del TNF- α , tramite l'interferenza con il fattore di trascrizione genica NF-kB consentirebbe, con un meccanismo molecolare e non ormonale, di impedire la cascata citochinica deprimendo la risposta infiammatoria. Questa azione potrebbe controllare la formazione delle cisti costringendo il parassita a non incistarsi e quindi ad essere aggredibile con la terapia convenzionale. Il modello, tutto da sperimentare, potrebbe portare a disegnare una terapia con curcumina in associazione con spiramicina, nei casi di prima infezione in gravidanza e quindi con rischio di trasmissione al feto. La fattibilità del disegno è assolutamente confortata dal fatto che questo principio naturale ha già passato tutti i controlli per l'antiteratogenicità ed è dichiarato sicuro.

La parte sperimentale di questo nostro studio è stata resa possibile dalla messa a punto di un modello cellulare *in vitro*, del tutto nuovo, costituito da una coltura primaria di cellule di retina espianata da embrioni di ratto e sperimentalmente infettata *in vitro* con un ceppo cistogeno di *T.*

gondii, mantenuto in laboratorio. In un precedente studio, è stata dimostrata la capacità di queste cellule retiniche di rimanere vitali (28) e di produrre per un breve periodo dopo la semina, e sotto stimolazione dell'infezione con *T. gondii* citochine quali il TNF- α , che, a loro volta, inducono la trasformazione del parassita in forma cistogena (29). Con questo modello, è stato possibile osservare lo svolgimento del processo infettivo così come si verifica naturalmente nei tessuti dell'ospite e quindi la formazione di cisti mature da parte di questo parassita con una parete cistica evidenziata tramite marcatura immunocitochimica.

Per valutare un'eventuale influenza della curcumina sulla formazione di cisti da parte del parassita, a causa dell'interferenza del principio attivo con la produzione del TNF- α da parte delle cellule retiniche infettate, abbiamo proceduto a trattare le colture con curcumina concentrata 15 μ M e sciolta in etanolo con dose e tempo di somministrazione già utilizzati su queste cellule in esperimenti simili (30), in due modi distinti (Figura 1):

- 1) pre-trattando con curcumina per 1 ora prima dell'infezione e per 1 ora insieme all'infezione con il ceppo cistogeno ME49, per poi sostituire il mezzo di cultura, sottraendo la curcumina, e lasciare crescere il parassita per altre 12 ore;
- 2) trattando le cellule con curcumina e, allo stesso tempo, infettando con il parassita per poi protrarre trattamento e infezione insieme per 12 ore.

Questi esperimenti sono stati condotti previa valutazione sperimentale che il quantitativo di etanolo in cui era sciolta la dose di curcumina utilizzata non fosse tossico da solo per le cellule. In entrambi i casi la rivelazione del risultato è data sia dalla quantizzazione del TNF- α prodotto dalle cellule prima e dopo il trattamento con metodo di rilevamento ELISA che utilizza un monoclonale anti-TNF- α di ratto (R&B), sia dall'osservazione delle cisti stesse al microscopio ottico e a fluorescenza, previa marcatura in immunofluorescenza di una proteina della parete cistica.

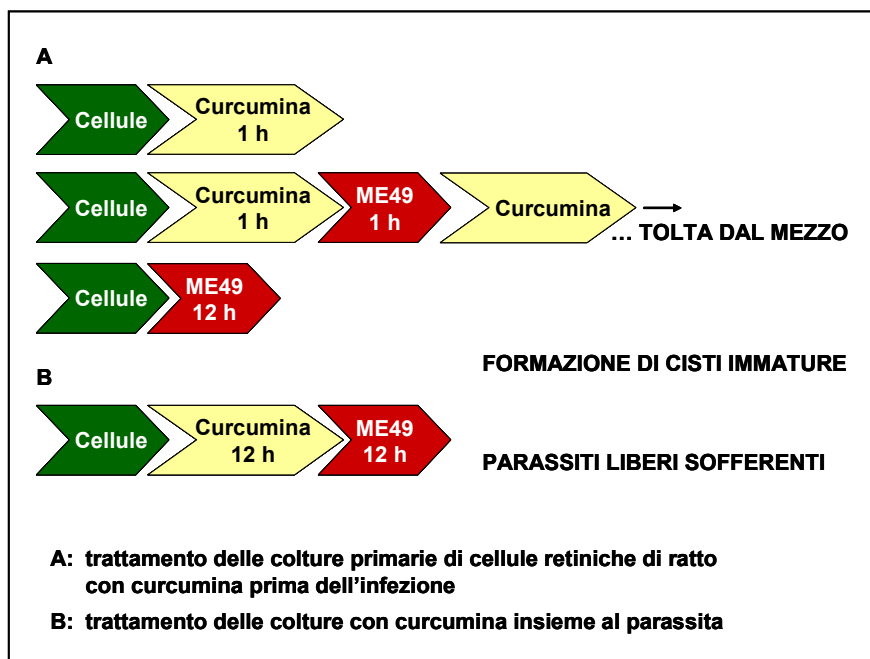


Figura 1. Schema del trattamento con curcumina delle colture cellulari di retina infettate con *Toxoplasma gondii* secondo le due modalità: A) colture incubate per 2 ore con curcumina prima di essere infettate per ulteriori 12 ore con il parassita e senza curcumina. B) colture infettate con *Toxoplasma gondii* e trattate con curcumina insieme per 12 ore

I risultati di questo semplice e duplice modello (confermati con la sua ripetibilità) hanno dimostrato che, dopo 12 ore di infezione, il pretrattamento delle cellule (caso A nella Figura 2) conduce, in termini di pg/mL, ad un modesto incremento seguito da una drastica riduzione della produzione della citochina anche in presenza del parassita, mentre il trattamento contemporaneo all'infezione (caso B nella Figura 2) porta ad un modesto decremento e successivo incremento della produzione della citochina.

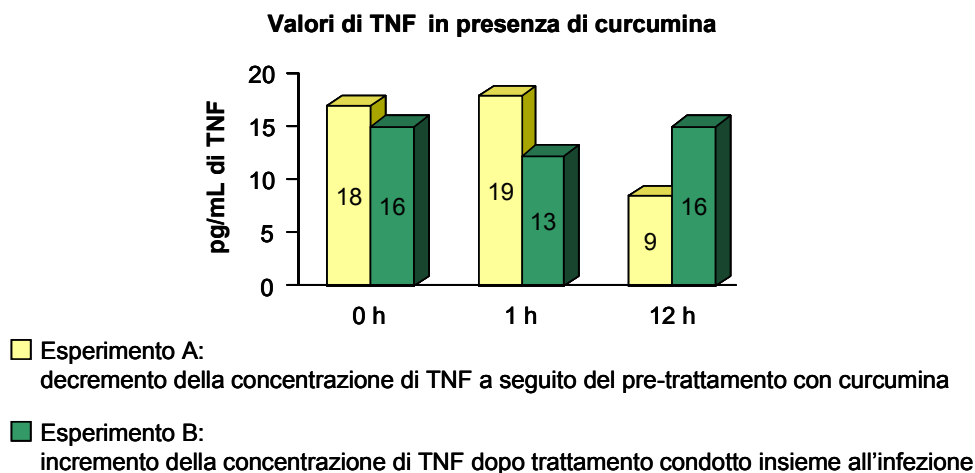


Figura 2. Variazione di produzione della citochina TNF- α nelle colture di retina infettate con *Toxoplasma gondii* e trattate con curcumina secondo protocolli sopra descritti A e B

L'osservazione dei parassiti e delle eventuali cisti, nei due casi A e B (dati non riportati) ci ha fatto registrare nel caso A una mancanza pressoché totale di cisti e, anzi, la presenza di un elevato numero di parassiti poco vitali e citologicamente trasformati (per la presenza di una protrusione del rostro, parte anteriore del parassita, probabilmente dovuta ad un disequilibrio ionico intracellulare) e nel caso B una presenza di cisti non mature (pseudocisti). La differenza tra i due casi è spiegabile in questo modo: nel primo caso, i parassiti infettanti non sono riusciti a formare cisti in un ambiente in cui la risposta infiammatoria non ha raggiunto, in presenza di curcumina, un livello sufficiente per indurre la conversione del parassita nello stadio cistico, e inoltre hanno subito un danno citoplasmatico diretto dovuto all'attività parassitostatica della curcumina; nel secondo caso i parassiti hanno trovato una certa concentrazione di TNF- α nel terreno, già prodotto dalle cellule non trattate, che li ha indotti a formare cisti, mai arrivate a maturazione (pseudo cisti) perché la produzione della citochina pur essendo continua è controllata dalla presenza di curcumina.

Queste osservazioni suggeriscono un'attività sia parassiticida che anticistogena da parte della curcumina nei confronti del parassita studiato e lasciano supporre che il pretrattamento della cultura conduca ad un impedimento dello sviluppo dell'infezione stessa. In questo modo si è sfruttata la qualità sia antinfiammatoria che citostatica mostrata dalla curcumina in molte altre applicazioni e settori della medicina, per controllare l'infezione da *Toxoplasma gondii*.

La migliore attività del principio attivo nell'esperimento A piuttosto che nell'esperimento B suggerisce la possibilità teorica di utilizzarlo come principio preventivo della toxoplasmosi in donne suscettibili in corso di gravidanza o anche semplicemente in epoca feconda con progetto di maternità, per poi proseguire all'assunzione in associazione con la spiramicina, nei casi d'infezione attiva. Questo protocollo terapeutico consentirebbe di prevenire la formazione delle

cisti da parte della sostanza naturale, senza abbassare lo stato immunitario della paziente e consentire, nello stesso tempo, l'impedimento della replicazione dei parassiti liberi, prima che raggiungano la barriera placentare.

Questo corrisponde all'ipotesi di vedere la curcumina come un integratore coadiuvante della terapia classica con spiramicina, se assunta sin dall'inizio dell'infezione.

Disegno sperimentale futuro

Pur sottolineando il fatto che le colture primarie *in vitro* di cellule di retina di ratto, rappresentano un modello particolarmente interessante in quanto utilizza cellule non trasformate, non stabilizzate e produttrici di segnali di comunicazione intercellulare, che, quindi, per un breve arco di tempo, mostrano la valenza di un modello *in vivo*, è ovvio che i nostri risultati devono essere valutati con la sperimentazione nel modello *in vivo*.

È necessario allestire un sistema di trattamento farmacologico del modello murino nel corso d'infezione sperimentale della femmina gravida, con uno studio caso-controllo su individui trattati con la sola terapia classica (gruppo di controllo) e con l'associazione proposta, sia per valutare l'efficienza dell'associazione che per conoscerne gli eventuali effetti secondari dose-dipendenti su gravida e feto di cui ancora non si sa nulla. Volendo stabilire, inoltre, la valenza preventiva della sostanza naturale, sarà necessario anche allestire un altro studio caso-controllo in cui gli esemplari siano trattati e non, prima e dopo lo stato gravidico e l'infezione sperimentalmente indotta.

Comunque questi studi risultano stimolanti nel difficile percorso di scelta dei metodi di controllo di un'infezione che, essendo sia della madre che del figlio, ed essendo dovuta ad un parassita in grado di sfuggire all'azione protettiva della risposta immunitaria della madre, ancora oggi pone molte difficoltà terapeutiche.

Bibliografia

1. Rao CV. Regulation of COX and LOX by curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:213-26. Review.
2. Cheung KL, Khor TO, Kong AN. Synergistic Effect of Combination of Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane or Curcumin and Sulforaphane in the Inhibition of Inflammation. *Pharm Res* 2009;26(1):224-31.
3. Sandur SK, Ichikawa H., Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B., Sethi G., Aggarwal BB. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med* 2007;43(4):568-80.
4. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, auto-immune, and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(1):40-59.
5. Cui L, Miao J, Wang J, Li Q, Cui L. *Plasmodium falciparum*: development of a transgenic line for screening antimalarials using firefly luciferase as the reporter. *Exp Parasitol* 2008;120(1):80-7.
6. Das R, Roy A, Dutta N, Majumder HK. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* 2008;13(7):867-82.
7. Shih PC, Lee HH, Lai SC, Chen KM, Jiang ST, Chen YF, Shioh SJ. Efficacy of curcumin therapy against *Angiostrongylus cantonensis*-induced eosinophilic meningitis. *J Helminthol* 2007;81(1):1-5.

8. Cui L, Miao J, Cui L, Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(2):488-94.
9. Pérez-Arriga L, Mendoza-Magana ML, Cortés-Zarate R, Corona-Rivera A, Bobadilla-Morales L, Troyo-Sanromán R, Ramirez-Herrera MA. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. *Acta Trop* 2006;98(2):152-61.
10. Nandakumar DN, Nagaraj VA, Vathsala PG, Rangarajan P, Padmanaban G. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(5):1859-60.
11. Reddy RC, Vatsala PG, Keshamouni VG, Padmanaban G, Rangarajan PN. Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326(2):472-4.
12. Alves LV, do Canto-Cavalheiro MM, Cysne-Finkelstein L, Leon L. *In vitro* antiproliferative effects of several diaryl derivatives on *Leishmania* spp. *Biol Pharm Bull* 2003;26(4):453-6.
13. Allen PC, Danforth HD, Augustine PC, Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int J Parasitol* 1998;28(7):1131-40. Review.
14. Hsu CH, Cheng AL. Clinical studies with curcumin. *Adv Exp Med Biol* 2007;595:471-480 Review.
15. Kelley BJ, Knopman DS. Alternative medicine and Alzheimer disease. *Neurologist* 2008;14(5):299-306.
16. Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, Rock CL, Pruitt MA, Yang F, Hudspeth B, Hu S, Faull KF, Teter B, Cole GM, Frautschy SA. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;326(1):196-208.
17. Baum L, Lam CW, Cheung SK, Kwok T, Lui V, Tsoh J, Lam L, Leung V, Hui E, Ng C, Woo J, Chiu HF, Goggins WB, Zee BC, Cheng KF, Fong CY, Wong A, Mok H, Chow MS, Ho PC, Ip SP, Ho CS, Yu XW, Lai CY, Chan MH, Szeto S, Chan IH, Mok V, Six-month randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot clinical trial of curcumin in patients with Alzheimer disease. *J Clin Psychopharmacol* 2008;28(1):110-3.
18. Vareed SK, Kakarala M, Ruffin MT, Crowell JA, Normolle DP, Djuric Z, Brenner DE. Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 ;17(6):1411-7.
19. Danilenko M, Studzinski GP. Enhancement by other compounds of the anti-cancer activity of vitamin D(3) and its analogs. *Exp Cell Res* 2004;298(2):339-58. Review.
20. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke D.N, Shafayat A., Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM, Pirmohamed M, Gescher AJ, Steward WP. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004;10(20):6847-54.
21. Kasinski AL, Du Y, Thomas SL, Zhao J, Khuri FR, Wang CY, Shoji M, Sun A, Snyder JP, Liotta D, Fu H. Inhibition of IkappaB kinase-nuclear factor-kappaB signaling pathway by 3,5-bis(2-fluorobenzylidene)piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Mol Pharmacol* 2008 ;74(3):654-61.
22. Pae HO, Jeong SO, Kim SH, Song YS, Kim SK, Chai KY, Chung HT. Dimethoxycurcumin, a synthetic curcumin analogue with higher metabolic stability, inhibits NO production, inducible NO synthase expression and NF-kappaB activation in RAW264.7 macrophages activated with LPS. *Mol Nutr Food Res* 2008;52(9):1082-91.
23. Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, Horinouchi S. *In vitro* synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*. *J Biol Chem*. 2007;282(52):37702-9.
24. Katsuyama Y, Matsuzawa M, Funa N, Horinouchi S. Production of curcuminoids by *Escherichia coli* carrying an artificial biosynthesis pathway. *Microbiology* 2008;154(Pt 9):2620-8.
25. Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* 1999;318:1511-4 .

26. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 2008;47(4):554-66.
27. Grujić J, Djurković-Djaković O, Nikolić A., Klun I., Bobić B., Effectiveness of spiramycin in murine models of acute and chronic toxoplasmosis. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25(3):226-30.
28. Malchiodi-Albedi F, Matteucci A, Bernardo A, Minghetti L. PPAR-gamma, Microglial Cells, and Ocular Inflammation: New Venues for Potential Therapeutic Approaches. *PPAR Res* 2008;2008:295784.
29. Angelici MC, Celani S, Malchiodi Albedi F, Matteucci A. Primary cultures of rat retina as a cell model for studying *Toxoplasma gondii* interconversion. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2005;52(2):38S.
30. Matteucci A, Frank C, Domenici MR Balduzzi M, Paradisi S, Carnovale-Scalzo G, Scorcìa G, Malchiodi-Albedi F. Curcumin treatment protects rat retinal neurons against excitotoxicity: effect on N-methyl-D: -aspartate-induced intracellular Ca(2+) increase. *Exp Brain Res* 2005;167(4):641-8.