

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Convegno

**Sostanze naturali, farmaci e alimenti:
azioni e interazioni**

Istituto Superiore di Sanità
Roma, 14 dicembre 2010

RIASSUNTI

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

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

ISSN 0393-5620
ISTISAN Congressi
10/C8

Istituto Superiore di Sanità

Convegno. Sostanze naturali, farmaci e alimenti: azioni e interazioni. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 14 dicembre 2010. Riassunti.

A cura di Andrea Geraci, Francesca Mondello e Annarita Stringaro
2010, iv, 27 p. ISTISAN Congressi 10/C8

Questo convegno nazionale è organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in seguito alla costituzione del gruppo di studio "Terapie Innovative e Sostanze Naturali" (TISNa) nel 2008. L'obiettivo principale del convegno è di presentare e discutere gli aspetti scientifici relativi all'impiego delle sostanze naturali. Il notevole aumento da parte della popolazione dell'utilizzo di prodotti naturali, a scopo sia terapeutico che come integratori alimentari, impone l'incremento ed il coordinamento delle attività di ricerca volte a chiarire: l'efficacia terapeutica, le interazioni con i farmaci di sintesi e gli alimenti e le eventuali azioni sinergiche, mediante l'impiego di rigorosi metodi scientifici. Questo convegno potrà favorire l'acquisizione di importanti conoscenze e lo scambio di informazioni sulle ricerche in corso.

Parole chiave: Prodotti naturali, Farmaci, Alimenti, Interazioni

Istituto Superiore di Sanità

Meeting. Natural products, drugs, food: actions and interactions. Istituto Superiore di Sanità. Rome, December 14, 2010. Abstract book.

Edited by Andrea Geraci, Francesca Mondello and Annarita Stringaro
2010, iv, 27 p. ISTISAN Congressi 10/C8 (in Italian)

This national meeting is organized by the Italian National Institute of Health (Istituto Superiore di Sanità, ISS), following the formation of the ISS intramural study group "Innovative Therapies and Natural Products (TISNa)" in 2008. The principal aim of the meeting is to present and discuss about the scientific aspects of natural products focusing on therapeutic activities and interaction with drugs and food. A significant increase in the use of natural products by the population, either for therapeutic purposes or dietary supplement, call for rigorous methods for the enhancement and coordination of related activities focusing for: healing effectiveness, interaction with drugs and food, and potential synergic actions. This meeting will favour the acquisition of important information about in on-going research, accounting for the expertise within and without the ISS.

Key words: Natural products, Drugs, Food, Interactions

Responsabili scientifici: Andrea Geraci, Francesca Mondello, Annarita Stringaro

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

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

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

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

© 2010 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Programma	iii
Prima sessione	1
Seconda sessione	11
Indice degli autori	27

PROGRAMMA

Martedì 14 dicembre 2010

09.00 Registrazione dei partecipanti

09.30 Indirizzo di benvenuto

Enrico Garaci

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità

Stefano Vella

Direttore del Dipartimento del Farmaco

Giovanni Rezza

Direttore del Dipartimento di Malattie, Infettive Parassitarie ed Immunomediate

Velio Macellari

Direttore del Dipartimento di Tecnologie e Salute

Prima sessione

Moderatori: Andrea Geraci, Francesca Mondello, Annarita Stringaro

09.50 Introduzione ai lavori

Antonio Cassone

10.10 *Integratori alimentari e claims*

Lucia Guidarelli

10.30 *Resveratrolo & c.: non solo antiossidanti*

Giampietro Ravagnan

10.50 *Efficacia ed interazione delle sostanze naturali con i farmaci di sintesi*

Giovan Battista La Sala

11.10 Coffee break

11.30 *La determinazione moderna delle droghe vegetali*

Francesca Romana Gallo

11.50 *Efficacia e interazione delle sostanze bioattive presenti negli alimenti di origine vegetale*

Elisabetta Sanzini, Brunella Carratù

Seconda Sessione

Moderatori: **Marcello Nicoletti, Vittorio Unfer**

12.10 *Composti bioattivi presenti nel miele: azioni e confronto con farmaci nella chemoprevenzione*

Antonella Canini

12.30 *La lattoferrina nella prevenzione e cura dell'ipoferrimia e dell'anemia da carenza di ferro in donne in gravidanza*

Rosalba Paesano

12.50 *Piperitone ossido e farmaci azolici: interazioni e loro impiego nella farmaco-resistenza*

Letizia Angiolella

13.10 Pranzo

14.10 *Sviluppo di formulazioni contenenti probiotici in grado di bloccare la trasmissione del virus dell'HIV nei bambini allattati al seno*

Cinzia Cecchini

14.30 *Terapia oncologica: uso di farmaci naturali in oncologia*

Massimo Bonucci

14.50 *Ottimizzazione della chemioterapia mediante sostanze naturali*

Stefania Meschini

15.10 *La Zeolite clinoptilolite attivata, un nuovo riattivatore cellulare come approccio innovativo alla medicina rigenerativa*

Fedele Manna

15.30 *Tavola Rotonda*

Moderatori: **Giuseppe Arancia, Paolo Aureli**

Interventi pre-ordinati

Umberto Agrimi, Carla Fiorentini, Maria Pia Fuggetta, Agnese Molinari

16.30 Conclusione dei lavori

Prima sessione

Moderatori

Andrea Geraci, Francesca Mondello, Annarita Stringaro

INTEGRATORI ALIMENTARI E *CLAIMS* DI SALUTE

Lucia Guidarelli

Direzione Generale Sicurezza degli Alimenti e Nutrizione, Ministero della Salute, Roma

Il ruolo degli integratori alimentari oggi è al centro di un ampio dibattito e occupa spazi notevoli in termini di ampiezza e di frequenza sugli organi di informazione. Si mette spesso in discussione la legittimità dell'esistenza di tali prodotti in termini di utilità, considerato che il panorama è sensibilmente mutato e accanto ai tradizionali prodotti a base di vitamine e minerali, il mercato oggi presenta molte e varie tipologie di integratori a base di altre sostanze. A volte, emergono questioni connesse alla loro sicurezza d'uso, sulla base di una valutazione molto critica dei messaggi pubblicitari che rivendicano proprietà in modo enfatico e scorretto.

In effetti, la promozione pubblicitaria di integratori e prodotti "naturali" o "salutistici" non solo non è sempre rispondente a criteri razionali e scientifici, ma sfugge spesso anche alle più elementari regole del buon senso, legando l'uso del prodotto al conseguimento di risultati strabilianti senza alcun altro tipo di modifiche comportamentali o alcuna altra condizione. In questo contesto, particolare importanza assume il Regolamento CE n. 1.924 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 20 dicembre 2006, relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari, che si applica dal 1° luglio 2007.

Tale regolamento è volto ad elevare il livello di tutela dei consumatori, consentendo scelte alimentari maggiormente consapevoli e orientando al consumo degli alimenti più adatti a costituire una razione alimentare adeguata nel contesto di un sano stile di vita. Nel mercato europeo sono già in uso da tempo *claims* riferiti non solo ad aspetti nutrizionali della composizione dell'alimento o dell'integratore alimentare, ma anche in modo più o meno specifico al benessere dell'organismo.

La norma restringe la possibilità di comunicare con toni eccessivi e/o mirabolanti effetti attribuiti ad un nutriente o ad un alimento *in toto*. Le disposizioni ora impongono una valutazione della base scientifica di quanto viene dichiarato in etichetta, al fine di adottare comuni criteri di chiarezza, trasparenza e fondatezza, nonché di garantire veridicità e comprensibilità da parte del consumatore "medio". Quest'ultimo potrà disporre delle informazioni necessarie per operare delle scelte oculate, finalizzate al miglioramento della dieta nel contesto di un più sano stile di vita; l'industria alimentare si troverà ad operare in condizioni paritarie di concorrenza e potrà essere incoraggiata nella promozione e tutela di prodotti innovativi.

Un ruolo importante viene attribuito nel Regolamento 1.924/2006 all'Autorità Europea per la sicurezza alimentare - EFSA - di Parma, alla quale spetta il compito di verificare la fondatezza scientifica dei *claims* di salute già presenti sul mercato europeo o delle nuove istanze di autorizzazione, presentate sulla base di dossier scientifici, predisposti dalle singole imprese e veicolati attraverso gli Stati Membri. I primi risultati di tale valutazione hanno messo in evidenza una serie di problemi, in particolare nei riguardi dei cosiddetti integratori erboristici, le cui rivendicazioni in etichetta non soddisfano i consueti parametri di fondatezza scientifica e ai quali non viene riconosciuto il ruolo dell'uso tradizionale, accettato invece dall'EMEA per il farmaco vegetale tradizionale.

RESVERATROLO & C.: NON SOLO ANTIOSSIDANTI

Giampietro Ravagnan
Università degli Studi Cà Foscari, Venezia

Gli Oligostilbeni sono un variegato gruppo di molecole naturali estratte da diverse piante che hanno funzione protettiva delle loro parti germinative e nei frutti avverso stress ambientali e infettivi.

Sono classificati come potenti antiossidanti per la loro capacità di reagire con i ROS e quindi di ridurre gli effetti della cascata radicalica; in particolare il glucoside naturale del resveratrolo, denominato comunemente come polidatina e/o piceide, ha una spiccata capacità di *scavenger* ed inibisce la perossidazione lipidica.

I risultati delle ricerche prodotte in questi anni (oltre 3.600 lavori recensiti da *PUBMED*) hanno messo in evidenza altre peculiari caratteristiche quali la capacità antinfiammatoria, cardioprotettiva, antitumorale, *antiaging* e neuro protettiva; di particolare interesse ancora le caratteristiche della polidatina che è più resistente del resveratrolo all'ossidazione enzimatica, penetra nella cellula mediante un meccanismo di trasporto attivo che utilizza i trasportatori di glucosio, ed inoltre grazie alla sua solubilità in acqua, viene assorbita con maggior efficienza dall'intestino. Queste proprietà conferiscono alla molecola del piceide le caratteristiche di una maggiore biodisponibilità e di una maggiore stabilità.

Recenti studi hanno dimostrato la capacità di queste molecole di inibire la produzione di IL-17, regolatore della sintesi di istamina e di potenziare in cellule epiteliali la produzione di difensine, peptidi con proprietà antibatteriche.

Molti recenti lavori inoltre attengono all'uso combinato di queste molecole con altri farmaci tradizionali in oncologia, nelle infezioni croniche ed in malattie del metabolismo: la possibilità di disporre di queste molecole con qualità farmaceutica e senza documentati effetti collaterali nella loro somministrazione e/o impiego topico le candida in un loro utilizzo quali farmaci coadiuvanti di terapie tradizionali in campo oncologico, infettivo cronico e nelle vaccinazioni per il loro effetto immunomodulatore.

IL CRANBERRY NELLE INFEZIONI URINARIE

Giovanni Battista La Sala, Debora Pirillo

Struttura Complessa di Ostetricia Ginecologia, Arcispedale S. Maria Nuova Azienda Ospedaliera, Reggio Emilia

Il *Cranberry* è una piccola bacca rossa che cresce bene nei terreni paludosi; frutto nativo degli USA e del Canada, contiene più dell'80% di acqua, 10% di carboidrati e altri importanti costituenti come flavonoidi, catechine, acidi organici e antocianine. Alle antocianine sono state associate attività antitumorali, antiossidanti e antiflogistiche. L'impiego del *Cranberry* nelle affezioni del tratto urinario risale a quasi 100 anni fa; oggi viene utilizzato soprattutto come profilassi nelle UTI (*Urinary Tract Infection*) ricorrenti. Presente in commercio in diverse forme, la più utilizzata è quella del succo zuccherato con aggiunta di acqua e Vitamina C. Le UTI sono le più comuni infezioni batteriche nella donna; è stato calcolato che solo negli USA ogni anno 11 milioni di donne sviluppano una UTI e che il 25% di loro sviluppa una recidiva. I batteri responsabili originano spesso dalla flora intestinale e perineale. In condizioni fisiologiche, i batteri sono eliminati dal tratto urinario mediante efficaci meccanismi protettivi; se i suddetti meccanismi sono alterati, i batteri possono colonizzare il basso tratto urinario (uretra, vescica) determinando le UTI "basse" e, in rari casi, possono, attraverso gli ureteri, colonizzare i reni dando le UTI "alte". Solitamente le infezioni batteriche del tratto urinario sono cistiti e la progressione dell'infezione a pielonefrite è infrequente e legata a caratteristiche dell'ospite (immunodeficienza) e alla virulenza del microrganismo patogeno. Le cistiti ricorrenti (3 o più episodi sintomatici nel corso di 12 mesi o 2 episodi in sei mesi) sono comuni nelle donne giovani, solitamente legati a fattori di rischio (rapporti sessuali, utilizzo di contraccettivi, antimicrobici, estrogeni, fattori genetici, fattori anatomici). L'*Escherichia coli* (*E. coli*) è l'agente patogeno più frequente nelle UTI non complicate ed è causa del 75-95% di tutte le UTI. Il trattamento di scelta delle UTI è la terapia antibiotica ma lo sviluppo di resistenze e le alterazioni della flora intestinale e vaginale successive alla antibiotico-terapia, hanno ridotto la *compliance* delle donne, spingendole a richiedere trattamenti più "naturali". Per diversi anni l'efficacia del *Cranberry* è stata attribuita all'escrezione urinaria di acido ippurico, un agente batteriostatico capace di acidificare le urine. Nel 1984 Sobota fu il primo a suggerire che i benefici legati all'utilizzo del succo di *Cranberry* potevano essere correlati alla sua capacità di inibire l'adesione batterica. Studi recenti hanno dimostrato che il succo di *Cranberry* inibisce l'adesione di cloni di *E. coli* patogeni e di altri gram-negativi uropatogeni alle cellule uroepiteliali interferendo, almeno in parte, con specifici recettori leganti i fattori di adesione batterica. In un recente studio *ex-vivo* doppio cieco randomizzato placebo-controllo condotto su 24 donne Tempera, ha dimostrato che l'assunzione di adeguate dosi di *Cranberry* ha una attività anti-adesione sull'*E. coli* uro patogeno. L'uso del *Cranberry* nelle infezioni del tratto urinario è stato ed è tuttora oggetto di numerosi studi, soprattutto per quanto riguarda la prevenzione delle UTI ricorrenti. Kontiokari, in uno studio randomizzato aperto condotto su 150 donne giovani sessualmente attive con una storia di precedenti UTI, ha dimostrato una riduzione significativa della ricorrenza di UTI in pazienti sottoposte a terapia con 50 ml/*die* di succo

di *Cranberry-lingoberry* per 6 mesi. Bailey nel 2007 ha pubblicato uno studio pilota condotto su 12 donne di età compresa fra i 25 e i 70 anni con una storia di almeno 6 infezioni ricorrenti, trattate con 400 mg/*die* di un concentrato di *Cranberry* per 4 mesi. Nel periodo di osservazione nessuna delle pazienti ha sviluppato una UTI. Nel 2009 Mc Murdo, in uno studio doppio cieco randomizzato su 139 donne di età superiore a 45 anni, con almeno 2 cistiti trattate con terapia antibiotica nei precedenti 12 mesi, ha dimostrato una percentuale di ricorrenza di UTI simile in donne trattate con 500mg di estratto di *Cranberry* in capsule una volta/*die* o con 100 mg di Trimethoprim/*die* per sei mesi. Una metanalisi della Cochrane del 2008 conclude che il *Cranberry* è efficace nella prevenzione delle UTI ricorrenti in donne sessualmente attive dopo 12 mesi di trattamento. A nostra conoscenza esiste un unico studio sull'utilizzo del *Cranberry* per la prevenzione della batteriuria asintomatica e delle UTI in gravidanza; si tratta di uno studio randomizzato controllato su 188 gravide che ha mostrato una riduzione della batteriuria asintomatica e di tutte le UTI in donne trattate con multiple dosi giornaliere di succo di *Cranberry*. Una *review* della Cochrane del 2000 giunge alla conclusione che non esistono forti evidenze a favore della efficacia del *Cranberry* nel trattamento delle infezioni urinarie. Gli effetti collaterali più comuni legati all'assunzione di *Cranberry* sono i disturbi gastrointestinali. L'assunzione di *Cranberry* è associata ad un aumento del rischio di calcoli di ossalato di calcio e di acido urico. È stato riportato un allungamento dell'INR in soggetti che assumevano contemporaneamente Warfarin e *Cranberry*.

Conclusioni: il *Cranberry* è efficace nella prevenzione delle UTI in donne sessualmente attive e con storia di UTI ricorrenti. Non esistono evidenze forti a favore dell'utilizzo del *Cranberry* per la prevenzione della batteriuria asintomatica e delle UTI in gravidanza. Il *Cranberry* non è efficace nel trattamento delle UTI. Il grosso limite di tutti gli studi è la mancanza di uniformità nel dosaggio utilizzato, nella forma (succo, cocktail, capsule, ecc.) e nella durata del trattamento. I batteri possono colonizzare il basso tratto urinario (uretra, vescica) determinando le UTI "basse" e, in rari casi, possono, attraverso gli ureteri, colonizzare i reni dando le UTI "alte". Solitamente le infezioni batteriche del tratto urinario sono cistiti e la progressione dell'infezione a pielonefrite è infrequente e legata a caratteristiche dell'ospite (immunodeficienza) e alla virulenza del microrganismo patogeno. Le cistiti ricorrenti (3 o più episodi sintomatici nel corso di 12 mesi o 2 episodi in sei mesi) sono comuni nelle donne giovani, solitamente legati a fattori di rischio (rapporti sessuali, utilizzo di contraccettivi, antimicrobici, estrogeni, fattori genetici, fattori anatomici).

LA DETERMINAZIONE MODERNA DELLE DROGHE VEGETALI

Francesca Romana Gallo, Giuseppina Multari, Giovanna Palazzino
Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'obiettivo di studio di una pianta ai nostri giorni si è ampliato: l'interesse per l'identificazione del singolo principio attivo si è spostato verso l'osservazione della pianta *in toto*. L'attenzione si sta focalizzando infatti sul fitocomplesso visto come l'insieme dei componenti attivi e non attivi di una droga vegetale. D'altra parte, l'entrata nel mercato mondiale di nuove specie vegetali ha comportato la ricerca di un nuovo approccio di studio capace di affiancare i classici saggi farmacognostici con metodi di misurazione strumentali meccanizzati per ridurre al minimo l'errore umano, grazie all'intervento di nuove e sofisticate tecniche analitiche. I nuovi metodi analitici, tuttavia, devono affrontare lo scoglio della validazione per affermarsi in modo definitivo e soppiantare gli ormai obsoleti precedenti approcci.

Le piante officinali, sia che vengano utilizzate come farmaci, alimenti o cosmetici, devono soddisfare particolari requisiti di qualità e sicurezza. Tali requisiti vengono rispettati quando il produttore garantisce che i processi di raccolta, produzione e fabbricazione dei suoi prodotti avvengono con metodi standardizzati e convalidati secondo le Norme di Buona Fabbricazione e Produzione (GMP, 2009; Direttiva 2001/95/CE, 2002) o secondo metodi di analisi e di controllo qualità ufficiali descritti in Farmacopea. L'OMS, con *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicines* per definire la qualità di una pianta (WHO/EDM/TRM/2000.1), o di un prodotto a base di piante, 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* definito come impronta digitale specifica della pianta. L'utilizzo quindi della tecnica del *fingerprint* sembra essere molto utile al fine diagnostico qualitativo e immediato di un preparato vegetale. Tale tecnica può essere utilizzata indifferentemente su piante impiegate nel campo farmaceutico ed alimentare. Sebbene la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) sia tuttora da considerare la tecnica d'elezione per l'analisi di miscele complesse di vario tipo, è tuttavia necessario esplorare le potenzialità e le qualità di metodi analitici alternativi per l'individuazione del *fingerprint* nella determinazione della qualità in materiali di partenza di origine vegetale e/o loro prodotti derivati. Nell'ambito dei farmaci, nel nostro laboratorio, su richiesta del Direttorato di Farmacopea Europea per la Qualità dei Medicinali del Consiglio d'Europa, è stato eseguito un controllo di qualità su materiali vegetali dichiarati essere *Equisetum arvense L.* presenti in commercio.

Su 10 campioni reperiti, solo 2 in confronto con l'Equiseto di riferimento di Farmacopea Europea, sono risultati rientrare nelle specifiche riguardanti il Titolo, i Caratteri macro-microscopici e l'Identificazione tramite TLC. Ciò ha destato interesse nel nostro laboratorio e ci ha spinti a continuare tale indagine di mercato e a valutare l'idoneità alla commercializzazione di altri campioni di *E. arvense* in corrispondenza a quanto dichiarato in etichetta. Tecniche cromatografiche HPLC e HPTLC, spettroscopiche e spettrofotometriche sono state messe a confronto su campioni diversi dichiarati contenere *Equiseto arvense L.* La

messa a punto di un metodo rapido in HPTLC ha fornito un *fingerprint* cromatografico per il campione di riferimento di *E. arvense* di Farmacopea e ha permesso di individuare *fingerprint* diversi per specie di *Equisetum* differenti. L'Equiseto, infatti, può essere facilmente inquinato dall'*Equisetum palustre* L. contenente l'alcaloide piperidinico palustrina, agente fortemente tossico, da cui deve essere assolutamente esente e da altri Equiseti di specie diverse dall'*arvense* magari meno pregiati. Alcuni prodotti commerciali dichiarati essere *Equisetum arvense*, in realtà dalla lettura dei loro *fingerprint*, hanno dimostrato essere costituiti da altre specie quali il *maximum* e il *ramosissimum* probabilmente meno costosi e più comuni.

Sono state studiate, anche, le possibilità di impiego della tecnica *fingerprint*, tramite l'HPTLC densitometrica e la spettroscopia NMR per identificare i costituenti più caratteristici e rilevare eventuali sofisticazioni con altre piante in campioni commerciali etichettati come "Uva ursina". Lo studio ha riguardato il controllo di qualità di Uva ursina foglie (*Arctostaphylos uva-ursi* L.), proveniente da diverse ditte produttrici di *Herbal drugs*. La droga vanta un antico uso nella medicina tradizionale e popolare in diversi Paesi, impiegata soprattutto come diuretico e disinfettante urinario ma ultimamente il suo utilizzo si è allargato anche agli integratori alimentari. La richiesta conseguente di questa droga vegetale ha registrato l'impiego crescente di specie congeneri o collaterali, facilitato dalla sua somiglianza con altre droghe. Dall'analisi effettuata è stato possibile individuare due tipologie di *fingerprint* attribuibili a due specie differenti di *Arctostaphylos* rispettivamente *A. uva ursi* e *A. pungens* una contenente il principio attivo arbutina e l'altra no. La sofisticazione di una specie con l'altra implica un contenuto in principi attivi sostanzialmente diverso con la possibilità di avere anche possibili implicazioni differenti per quanto riguarda l'attività biologica.

Nell'ambito dei cosmetici la *Lawsonia inermis* L. (*Lythraceae*), comunemente conosciuta come *Hennè*, è stata studiata al fine di determinare quantitativamente il *lawsone* (2-idrossi-1,4-naftochinone), il cui contenuto deve essere accuratamente controllato data la sua potenziale tossicità (anemia emolitica, antifertilità, dermatiti allergiche, genotossicità dimostrata *in vitro*). Tale pianta usata per tingere capelli, unghie e per fare tatuaggi in varie parti del corpo, contiene resine, tannini, acido gallico, glucosio, mannitolo, grassi, mucillagini e i glucosidi primari hennoside A, B, e C, il cui prodotto di idrolisi e di autossidazione è il *lawsone*. L'azione colorante è dovuta a quest'ultimo. Altre piante erroneamente chiamate *Hennè* vengono utilizzate per tingere i capelli come la *Cassia obovata* Collad e l'*Indigofera tinctoria* L.

La Commissione Scientifica Europea sui Prodotti Cosmetici ed i Prodotti non alimentari destinati ai consumatori, con il documento SCCNFP/0798/04 "Evaluation and opinion on: lawsone" nel 2004 fornisce una valutazione e caratterizzazione tossicologica del *lawsone* definendolo come sostanza che può costituire un rischio per la salute e inserendolo nella lista 2, tra le sostanze che non devono essere presenti nei cosmetici perché potenzialmente rischiose. Della *Lawsonia inermis* L. è stato possibile delineare il *fingerprint* caratteristico in HPLC e HPTLC e distinguerlo da quello della *Cassia obovata* Collad e della *Indigofera tinctoria* L. erroneamente chiamate *Hennè*, alle quali per conferire il potere colorante rosso, possono essere aggiunte sostanze di sintesi quali il picrammato di sodio, coloranti ad ossidazione o lo stesso *lawsone*.

EFFICACIA E INTERAZIONE DELLE SOSTANZE NATURALI PRESENTI NEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE

Brunella Carratù, Elisabetta Sanzini

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

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.

Tuttavia questo insieme estremamente disomogeneo annovera alcune caratteristiche comuni. Tutte le sostanze appartengono al regno vegetale, sono prodotti del metabolismo secondario con limitato o nullo livello di polimerizzazione e quindi con basso peso molecolare, possiedono meccanismi di azione complementari e sovrapponibili. Questi composti non sono indispensabili per l'uomo, che non è in grado di sintetizzarli.

È da sottolineare che una parte di queste molecole può svolgere anche un'azione antinutrizionale o tossica quando sono ingerite da organismi erbivori o onnivori, tuttavia in questo intervento si vuole trattare solo di alcune problematiche legate a quei composti fitochimici che sono assunti quotidianamente con la dieta e per i quali recenti ricerche hanno evidenziato un ruolo benefico sulla salute umana.

I composti fitochimici esercitano diverse funzioni biologiche quali l'attività antiossidante, la modulazione degli enzimi detossicanti, la stimolazione del sistema immunitario, la riduzione dell'aggregazione piastrinica, la modulazione del metabolismo ormonale, la riduzione della pressione sanguigna, l'attività antibatterica e antivirale.

Dei 100.000 metaboliti secondari distribuiti sul pianeta le piante ne sintetizzano 80.000. Per tale miriade di composti, alcuni ubiquitari, altri propri di quella specie o genere, risulta difficile applicare un criterio di classificazione; nell'intervento vengono presi in esame i gruppi di composti ritenuti attualmente più significativi o emergenti quali polifenoli, flavonoidi, fitoestrogeni, isoflavoni e glucosinolati.

La maggior parte delle sostanze è stata studiata relativamente alla struttura chimica, all'attività *in vitro* o all'evidenza epidemiologica, mentre la cinetica è stata a lungo trascurata; un'indagine completa dovrebbe invece includere lo studio dell'assorbimento, della distribuzione, del metabolismo, dell'emivita effettiva, dell'escrezione: un composto giudicato interessante per una certa attività biologica *in vitro* potrebbe *in vivo* essere non biodisponibile o essere metabolizzato velocemente e di conseguenza essere inefficace.

Il crescente interesse per le svariate classi dei composti peculiari del mondo vegetale è ben evidenziato anche dalla pluralità delle tematiche esaminate in questo convegno, comunque argomenti come l'assunzione, la definizione dell'attività biologica, il metabolismo e l'identificazione strutturale anche dei metaboliti necessitano di ulteriore approfondimento. Numerosi studi *in vivo* hanno evidenziato sostanziali differenze tra l'attività della molecola, quando isolata o quando presente nell'alimento; inoltre l'effetto protettivo di frutta e vegetali, assunti abitualmente con la dieta, non è lo stesso di quello riscontrato in studi epidemiologici basati sull'uso di supplementi. Sarebbe quindi la matrice alimentare a svolgere una funzione fondamentale nel modulare l'attività fisiologica di tali componenti.

Seconda sessione

Moderatori

Marcello Nicoletti, Vittorio Unfer

COMPOSTI BIOATTIVI PRESENTI NEL MIELE: AZIONI E CONFRONTO CON FARMACI NELLA CHEMOPREVENZIONE

Elena Pichichero, Antonella Canini

Centro Ricerche Miele, Dipartimento di Biologia, Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Il miele ha una lunga tradizione di uso nella medicina popolare per vari scopi che sono stati ampiamente descritti anche nella letteratura medica di Egitto e la Grecia. Negli ultimi anni vi è stato un ritorno di interesse nelle proprietà mediche e benefiche del miele da parte della comunità scientifica, in quanto mostra un ampio spettro di attività biologiche come ad esempio attività antibatterica, antifungina, citostatica, cicatrizzante e, in ultimo ma non meno importante, attività antiossidante, antitumorale e chemopreventiva. La maggior parte degli effetti biologici che il miele mostra sono principalmente dovuti alla presenza di composti bioattivi di origine vegetale, quali acidi fenolici e flavonoidi. Ogni tipo di miele è caratterizzato da un particolare *pattern* di metaboliti secondari che rispecchiano l'origine botanica del miele stesso; tuttavia i metaboliti maggiormente rilevabili sono apigenina, crisina e quercetina per la classe dei flavonoidi e, acidi cloro genico, acido cumarico e acido gallico, per la classe degli acidi fenolici. Tutti questi metaboliti secondari sono ampiamente studiati per il loro potenziale come "buone molecole" nella chemoprevenzione.

I modi in cui i flavonoidi possono operare come agenti chemiopreventivi possono essere suddivisi in tre distinti meccanismi: 1) prevenendo l'attivazione metabolica delle molecole cancerogene; 2) prevenzione della proliferazione delle cellule tumorali da parte di disattivazione o *down*-regolazione di enzimi pro-ossidanti o enzimi di trasduzione del segnale; 3) inducendo la morte delle cellule tumorali (apoptosi).

Nelle nostre ricerche abbiamo centrato l'attenzione sulla crisina. Questa è un flavonoide caratteristico del miele di acacia, in quanto costituisce circa il 50% del totale dei metaboliti secondari presenti in questo miele monoflorale. In diversi studi è stato dimostrato che la crisina è un potente inibitore dell'enzima aromatasi, è in grado di modulare i recettori GABAA e GABAC, ha inoltre un effetto inibente la crescita di cellule maligne in diversi tipi di cancro attraverso un'azione pro-apoptotica, modulando proteine ed enzimi chiave della vitalità cellulare come ad esempio le MAPK p38 ed ERK 1/2, Bax e Caspasi, ed interferendo con la progressione del ciclo cellulare.

Il primo inibitore dell'aromatasi utilizzato nella pratica clinica è stata l'aminoglutetimide, farmaco inizialmente usato come anticonvulsivante. Il principale inibitore dell'aromatasi di seconda generazione è rappresentato dal formestane. Il formestane è un composto appartenente agli inibitori di tipo I (inattivatori enzimatici). Si tratta di una molecola dotata di buona efficacia clinica, il cui limite è rappresentato principalmente dalla via di somministrazione (iniezione intramuscolare).

Gli inibitori dell'aromatasi di terza generazione sono rappresentati dall'anastrozolo (Arimidex), dal letrozolo (Femara) e dall'exemestane (Aromasin). Tali composti non influenzano in modo significativo la steroidogenesi surrenalica (e non modificano quindi i

livelli basali di cortisolo ed aldosterone) ed hanno il vantaggio di poter essere somministrati per via orale.

Gli inibitori dell'aromatasi hanno dimostrato una elevata efficacia nel trattamento (terapia neoadiuvante, terapia adiuvante, terapia di prima e seconda linea del carcinoma avanzato) delle neoplasie mammarie con recettori estrogenici positivi, in donne in postmenopausa. La loro buona tollerabilità li rende farmaci discretamente maneggevoli ed adatti, almeno per quanto fino ad oggi noto, a trattamenti prolungati. Il problema principale dei farmaci inibitori dell'aromatasi è, che essendo dei farmaci di sintesi, la presenza di importanti effetti collaterali. Uno dei più popolari, Arimidex, ha una lista di effetti collaterali come: nausea, debolezza o stanchezza, cefalea, artrite, dolore generalizzato, dolori articolari, mal di gola, dolore alle ossa, mal di schiena, tosse, difficoltà respiratorie, l'osteoporosi, vomito, ossa rotte, insonnia, gonfiore o ritenzione idrica alle braccia o alle gambe, dolori addominali, stitichezza, diarrea, colesterolo alto, infezioni, aumento di peso, dolore al petto, vertigini, infezioni del tratto urinario, e perdita di appetito. Alcuni di questi effetti collaterali come dolore alle ossa e artrite non può andare via anche quando l'uso del farmaco è interrotto. In uno studio condotto presso l'Università del Minnesota, la crisina e molti altri flavonoidi sono stati confrontati con un farmaco inibente dell'aromatasi utilizzato per trattare i tumori ormonesensibile. La crisina è risultato essere il più efficace di tutti i flavonoidi testati, ed è stato trovato che ha un effetto uguale in potenza al farmaco. La crisina offre ulteriori vantaggi, che farmaci inibitori dell'aromatasi non hanno. È un potente antiossidante che possiede attività simile alle vitamine nel corpo, ed inoltre è un efficace anti-infiammatorio agendo sull'inibizione del pathway di Cox-2.

Molti farmaci antitumorali di nuova generazione agiscono infatti sui meccanismi che attivano l'apoptosi cellulare. Tuttavia, alcuni tumori, e tra questi diverse leucemie, sono resistenti sia alla normale chemioterapia sia a farmaci pro-apoptotici in fase sperimentale. È stato dimostrato in recenti studi che i flavonoidi come, crisina, apigenina e quercetina, sono in grado di sensibilizzare le cellule tumorali più resistenti all'azione dei farmaci pro-apoptotici di nuova generazione.

LA LATTOFERRINA: UNA SOSTANZA NATURALE DI GRANDE EFFICACIA NELLA PREVENZIONE E CURA DELL'IPOFERREMIA E DELL'ANEMIA

Rosalba Paesano

Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia, Clinica Fabia Mater, Università di Roma Sapienza, Roma

La carenza di ferro e l'anemia da carenza di ferro sono, nel mondo, i più comuni disordini dell'omeostasi sistemica del ferro. Negli stati di carenza di ferro, le concentrazioni sieriche del ferro e della ferritina diminuiscono, mentre i livelli dell'emoglobina e dei globuli rossi rimangono nella norma. Nell'anemia, il *deficit* di ferro è così severo che le scorte di questo elemento appaiono diminuite od assenti, risultando in una significativa diminuzione dei livelli di emoglobina e del numero dei globuli rossi. Pertanto, globuli rossi <4.000.000/mL, emoglobina ≤ 11 g/dL, ferro serico totale ≤ 30 mg/dL e ferritina serica ≤ 12 ng/mL sono i parametri ematologici che definiscono la carenza di ferro e l'anemia da carenza di ferro.

L'omeostasi sistemica del ferro è strettamente regolata dall'assorbimento, sequestro e trasporto di questo elemento.

L'assorbimento del ferro avviene nella parte apicale degli enterociti, dove, una volta trasportato all'interno della cellula, viene sequestrato dalla ferritina e successivamente esportato al circolo attraverso la ferroportina, una proteina presente nella parte basolaterale degli enterociti. La ferroportina, la sola proteina conosciuta essere in grado di trasportare il ferro dalle cellule al circolo, è stata isolata negli enterociti, negli epatociti, nelle cellule placentari e nei macrofagi che, per l'eritropoiesi, ogni giorno riciclano 20 mg di ferro dagli eritrociti lisati.

Un altro importante componente dell'omeostasi sistemica del ferro è l'epcidina, un peptide sintetizzato dagli epatociti e secreto nel sangue e nell'urine. L'epcidina regola l'entrata del ferro nel plasma attraverso la ferroportina. Il legame tra ferroportina ed epcidina implica la formazione di un complesso che porta alla degradazione della ferroportina, con conseguente inibizione del trasporto del ferro al circolo. Il ferro, in assenza di trasporto dalla cellula al circolo, si accumula all'interno delle cellule dell'ospite. Ne consegue che, la carenza di ferro e l'anemia da carenza di ferro, disordini dell'omeostasi del ferro, appaiono strettamente correlati ai disordini della sintesi dell'epcidina e/o della ferroportina.

Nonostante la scoperta dell'epcidina e della ferroportina abbia chiarito i complessi meccanismi che sovrintendono all'omeostasi del ferro, la carenza di ferro e l'anemia da carenza di ferro sono ancora trattate mediante somministrazione orale di notevoli quantità di ferro a causa della sua scarsa bio-disponibilità. La somministrazione orale di ferro è molto spesso inefficace e, frequentemente, causa effetti indesiderati quali disturbi gastrointestinali, nausea, vomito, diarrea e costipazione. Questi dati fortemente supportano l'idea che il ferro somministrato per via orale non sia esportato al circolo, ma si accumuli all'interno delle cellule dell'ospite. Il sovraccarico di ferro nelle cellule induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (superossidi), il danno cellulare e l'infiammazione.

Tutto questo rende ragione della necessità di trovare nuovi approcci, che, senza effetti indesiderati, siano in grado di prevenire e curare gli stati di carenza di ferro e l'anemia da carenza di ferro, evitando la tossicità associata all'accumulo di ferro intracellulare.

Recentemente, la lattoferrina, una glicoproteina naturale in grado di chelare con alta affinità due ioni ferrici per molecola, sta emergendo come un importante regolatore dell'omeostasi sistemica del ferro. Nell'uomo, la lattoferrina è sintetizzata dalle ghiandole esocrine e dai neutrofili nei siti d'infezione e d'infiammazione.

Recenti *trial* clinici, da noi condotti, hanno dimostrato come la somministrazione orale di una lattoferrina, estratta da latte bovino, sia in grado di ripristinare il fisiologico trasporto del ferro dai tessuti al circolo, prevenendo e curando con grande efficacia gli stati di carenza di ferro e l'anemia da carenza di ferro, senza alcun effetto indesiderato.

L'efficacia della lattoferrina comparata a quella del solfato ferroso è stata mostrata in più di 1000 soggetti affetti da disordini nell'omeostasi del ferro. La lattoferrina, infatti, già dopo 30 giorni di terapia, aumenta significativamente il numero dei globuli rossi ed i valori dell'emoglobina, del ferro serico totale e della ferritina serica, mentre il solfato ferroso non aumenta significativamente i suddetti parametri ematologici.

Abbiamo anche dimostrato che, differentemente dal solfato ferroso, la lattoferrina, somministrata oralmente, modula la sintesi della ferroportina e dell'epcidina, ripristinando così l'omeostasi sistemica del ferro.

PIPERITENONE OSSIDO E FARMACI ANTIMICOTICI: INTERAZIONI E LORO IMPIEGO NELLA FARMACO RESISTENZA

Letizia Angiolella (a), Elisabetta Vavala (a), Rino Ragno (b), Marisa Colone (c), Annarita Stringaro (c)

(a) Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Università di Roma Sapienza, Roma

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

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

In questi ultimi anni, si è assistito ad un aumento significativo delle infezioni opportunistiche di natura fungina specialmente in pazienti trattati con farmaci immunosoppressivi, con chemioterapia o in soggetti affetti da AIDS. *Candida albicans* rappresenta la più frequente causa di infezioni opportunistiche nell'uomo, ed è responsabile di una varietà di manifestazioni patologiche che vanno dalle lesioni superficiali della pelle ad infezioni disseminate. La scoperta di farmaci anticandida ha eradicato molte infezioni fungine, ma l'uso prolungato o non adeguato delle terapie, ha provocato l'instaurarsi di ceppi di *C. albicans* farmaco resistenti. L'aumento di resistenza fungina, ai classici farmaci, la loro tossicità ed il costo elevato dei trattamenti giustifica la ricerca di nuove strategie. L'utilizzo di erbe mediche nel mondo rappresenta una lunga storia dell'interazione umana con l'ambiente. Le piante usate per la medicina tradizionale contengono una grande varietà di sostanze che possono essere usate per trattare differenti malattie infettive. Gli oli essenziali rappresentano uno dei gruppi più importanti dei composti di origine naturale per il loro elevato potere antimicrobico riconosciuto fin dall'antichità. Gli oli essenziali posseggono un largo spettro di attività antimicrobica attribuibile nella maggior parte dei casi all'alto contenuto di terpeni. Allo scopo di aumentare l'efficacia dei farmaci antifungini di sintesi, potrebbe rappresentare una strategia vincente, l'uso combinato con gli oli essenziali. Diversi studi si sono indirizzati in questa direzione ed è stato dimostrato in molti casi, un effetto sinergico come per esempio tra l'olio essenziale di timo in associazione con l'amfotericina B o il fluconazolo, oppure la nistatina in associazione con l'olio essenziale di origano. In entrambe le associazioni si è ottenuto un effetto sinergico, permettendo quindi di poter ridurre al minimo la dose di farmaco, riducendo così gli effetti tossici o collaterali dei farmaci antifungini. Oltre ad abbassare sostanzialmente i costi delle terapie mediche. Studi svolti in precedenza hanno evidenziato l'attività antifungina dell'olio essenziale di *Mentha suaveolens*, sia su cellule lievito come *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* che su diversi funghi filamentosi come *Trichophyton mentagrophyte*, e *Microsporum canis*. Lo studio condotto sulle diverse specie fungine ha messo in evidenza una forte attività fungicida riportando dei valori di MIC molto bassi intorno allo 0,03% nei ceppi di *Cryptococcus neoformans* e nei dermatofiti. Mentre l'attività antimicotica saggiata su ceppi di *Candida albicans* di diversa provenienza e con differente sensibilità ai comuni farmaci antimicotici ha evidenziato una buona risposta fungicida intorno allo 0,25%.

Studi preliminari condotti con l'olio essenziale di *Mentha suaveolens* in associazione con il fluconazolo, l'amfotericina B ed il micafungin hanno messo in evidenza un

abbassamento dei valori delle MIC in particolar modo nei ceppi farmaco resistenti, producendo un evidente effetto sinergico dal calcolo dell'indice di concentrazione frazionata inibitoria (*FIC index*) $\leq 0,5$. Osservazioni TEM rivelano significative alterazioni strutturali dei microrganismi in seguito al trattamento combinato con farmaci di sintesi e sostanze naturali. Una caratteristica peculiare di questo olio essenziale è quella di essere composto al 92% da un solo costituente, il piperitenone ossido è possibile quindi attribuirgli quasi completamente l'attività antimicrobica. Questa molecola è riconosciuta per le sue proprietà antispastiche, antiossidanti, miorilassante e larvicide, dai risultati da noi riscontrati è possibile individuarne anche l'attività antimicotica. L'utilizzo del piperitenone ossido in associazione con i farmaci di sintesi, potrebbe ridurre la dose efficace dei farmaci convenzionali e minimizzarne gli effetti collaterali. Inoltre, l'utilizzo degli oli essenziali o dei soli principi attivi potrebbe risolvere rapidamente lo sviluppo della farmaco resistenza e delle interazioni farmaco-farmaco, che sono problematiche comuni e ricorrenti nelle terapie antifungine.

SVILUPPO DI FORMULAZIONI CONTENENTI PROBIOTICI IN GRADO DI BLOCCARE LA TRASMISSIONE DEL VIRUS DELL'HIV NEI BAMBINI ALLATTATI AL SENO

Cinzia Cecchini (a), Celestine Chidi Ogbonna (b), Stefania Silvi (a), M. Cristina Verdenelli (c), Carla Orpianesi (c), Francois Zambou Ngoufack (d), Alberto Cresci (c,e), Vittorio Colizzi (e,f)

(a) *Scuola di Bioscienze e Biotecnologie, Università degli Studi di Camerino, Camerino, Macerata*

(b) *School of Advanced Studies, Università degli Studi di Camerino, Camerino, Macerata*

(c) *Synbiotec srl, Spin-off di UNICAM, Camerino, Macerata*

(d) *Dipartimento di Biochimica, Facoltà di Scienze, Università di Dschang, Camerun*

(e) *Afroinnova s.o., Nkolbisson, Yaoundé, Camerun*

(f) *International Reference Centre for AIDS, CIRCB, Yaoundé, Camerun*

Attualmente il trattamento dell'infezione da HIV si basa su una combinazione di farmaci con diversi meccanismi di azione antivirale (ARV). Questo tipo di trattamenti prevengono la trasmissione madre-figlio in utero e durante il parto naturale. Una delle vie di trasmissione del virus dell'HIV da madre a figlio può essere anche attraverso l'allattamento al seno, per cui i neonati possono contrarre la malattia da madri HIV positive. Nel 2010 le linee guida della *World Health Organization* (WHO) raccomandano fortemente di applicare un trattamento ARV continuativo, non meno di 3-4 mesi durante l'allattamento. In Africa, la situazione socio-economica non permette di scegliere fra molteplici alternative per l'alimentazione dei neonati da parte di madri infette da HIV, che sono quindi costrette a nutrire i figli con l'allattamento al seno. Inoltre le terapie ARV non sono generalmente accettate dai soggetti infetti e, d'altra parte, tali farmaci non sono facilmente disponibili nei villaggi e, qualora resi disponibili dal governo, non raggiungono mai un numero sufficientemente elevato per trattare tutti i malati. In questo contesto, i probiotici rappresentano una misura alternativa per ridurre il rischio di trasmissione del virus dell'HIV ai bambini durante l'allattamento al seno.

Le formulazioni contenenti probiotici aumentano il benessere di individui sieropositivi esercitando un'azione antinfiammatoria sulle cellule epiteliali intestinali. Inoltre ci sono crescenti evidenze scientifiche che dimostrano che i probiotici sono capaci di produrre peptidi che legano ed interferiscono con le cellule *target* inibendo così l'ingresso dell'HIV nei macrofagi e linfociti. Il legame dei peptidi batterici con tali cellule *target* determina una stimolazione dell'immunità naturale e specifica nei confronti dell'HIV. Infine i probiotici del genere *Lactobacillus* possono produrre peptidi immunogeni, che reagiscono con le proteine dell'*envelope* dell'HIV (gp41 e gp120) in modo da formare complessi capaci di stimolare la produzione di anticorpi neutralizzanti e cellule T citotossiche capaci di distruggere il virus.

Lo scopo del presente progetto è quello di saggiare, *in vitro* e *in vivo*, l'attività di batteri probiotici in grado di inibire la trasmissione del virus dell'HIV ai neonati da madri sieropositive durante l'allattamento al seno e, di mettere a punto formulazioni innovative, in

grado di mantenere la vitalità e la stabilità dei probiotici anche nelle condizioni climatiche dell'Africa Sub Sahariana.

Ceppi probiotici brevettati (*Lactobacillus rhamnosus* IMC501® e *Lactobacillus paracasei* IMC502®) forniti dalla Synbiotec srl e lactobacilli della collezione del laboratorio di Microbiologia Generale dell'Università di Camerino sono stati studiati per la capacità di produrre peptidi e di interagire contro il virus dell'HIV analizzando *pool* di plasma di individui infetti applicando un protocollo standard di *real-time* PCR. Per l'esecuzione del test sono stati utilizzati sia le sospensioni cellulari alla concentrazione di 106-107 UFC ml⁻¹ che i sopranatanti dei ceppi batterici probiotici test.

Inoltre sono state testate per le loro proprietà probiotiche ed antivirali ulteriori specie batteriche di lattobacilli, isolate sia da campioni fecali che da flora orale di soggetti camerunensi sieropositivi, e identificate con metodi fenotipici, biochimici e molecolari presso il Centro CIRCB (Yaoundé) e l'Università di Dschang in Camerun.

I ceppi testati nelle prove *in vitro* e risultati potenzialmente più attivi contro il virus dell'HIV verranno prodotti dalla Synbiotec srl, *spin off* di UNICAM, nella formulazione di microgranulato in grado di mantenere la vitalità e la stabilità anche nelle condizioni climatiche dell'Africa Sub Sahariana. I probiotici così formulati (microgranulato) verranno saggiati in uno studio pre-clinico, analizzando campioni di sangue o plasma di soggetti infetti prelevati sia prima che dopo il trattamento con probiotici, per valutarne l'efficacia antivirale determinando la carica virale, i livelli di CD4+ e linfociti T.

Successivamente verrà effettuato uno studio clinico in cui i probiotici verranno somministrati alle mamme e ai bambini durante l'allattamento sia per *os*, attraverso gocce orali, che con pasti a base di farine di cereali comunemente disponibili per la popolazione.

I risultati fino ad ora ottenuti ci hanno permesso di progettare presso il centro di ricerca CIRCB (Yaoundé) uno studio pre-clinico per valutare la capacità dei ceppi probiotici selezionati di interferire con i processi infettivi e la replicazione del virus dell'HIV. I risultati ottenuti da tale studio consentiranno di eseguire uno studio clinico per valutare la capacità dei probiotici selezionati di colonizzare la mucosa intestinale dei bambini e di inibire la trasmissione del virus dell'HIV dalla madre al bambino durante l'allattamento al seno. La somministrazione di tali formulati probiotici permetteranno inoltre di studiare l'aumentata immunità contro le infezioni virali, oltre che una protezione nei confronti di entero-patogeni che causano condizioni gastro-infiammatorie causa di elevata mortalità nei Paesi sottosviluppati.

I lattobacilli probiotici rappresentano una fonte di proteine immunogeniche per il controllo della trasmissione del virus dell'HIV e dell'insorgenza dell'AIDS. Il presente studio usufruisce delle professionalità e strumentazioni del centro di ricerca CIRCB a Yaoundé, dell'Università di Dschang, dell'Università di Camerino insieme alle competenze di *Technology transfer* dell'azienda Synbiotec srl. Ulteriori studi sull'effetto benefico dei probiotici sui bambini nati da madri infette da HIV verranno condotti allo scopo di ampliare le conoscenze e trovare possibili strategie nei confronti del trattamento della trasmissione del virus dell'HIV. C'è un forte bisogno di sviluppare interventi semplici e di basso impatto economico con un ampio spettro di applicazione, per prevenire la trasmissione del virus dell'HIV da donne infette ai loro figli soprattutto in un mondo in via di sviluppo.

TERAPIA ONCOLOGICA: USO DI FARMACI NATURALI IN ONCOLOGIA

Massimo Bonucci

Patologia Clinica ed Anatomia Patologica, Casa di Cura San Feliciano, Roma

La battaglia contro i tumori non è ancora vinta. Nella pratica medica quotidiana assistiamo ad un fenomeno dilagante a livello mondiale che in Italia ha assunto dimensioni notevoli: la ricerca di percorsi alternativi alla medicina convenzionale. Circa il 50% dei nostri pazienti si affida a pratiche di tipo alternativo, o sceglie percorsi complementari. Proprio per non lasciare i pazienti in mani spesso "non mediche" il mondo scientifico ha cominciato ad approfondire la conoscenza delle tecniche e metodologie cosiddette alternative e complementari onde cercare di comprendere l'eventuale utilità delle stesse e per salvaguardare i pazienti da pratiche potenzialmente rischiose. Per questo è nata una nuova branca: la medicina integrata.

Di particolare interesse è il campo oncologico poiché i pazienti oncologici si dimostrano ovunque nel mondo grandi fruitori di percorsi non convenzionali. Nasce così l'Oncologia Integrata. La chemioterapia e radioterapia da sole non riescono ad avere i risultati sperati. Ecco che nel mondo si sono sviluppati pensieri e non solo per riuscire a dare maggior aspettative. Nel 2003 nasce la S.I.O. Society for Integrate Oncology, la NCCAM (*National Center Complementary and Alternative Medicine*), patrocinata e voluta dai più importanti centri oncologici ed università americane. Nasce per rispondere ad esigenze dei pazienti che chiedono di stare meglio ed eventualmente anche più risultati. È formata da oncologi, medici specialisti, nutrizionisti che rispondono alla domanda di aiuto dei pazienti. Nasce per la lenta progressione dei risultati ed alto carico di sofferenza, e le persone si rivolgono spontaneamente a tecniche non convenzionali. Circa il 50-80% dei malati nei Paesi ricchi ci si rivolgono non con l'aspettativa miracolistica ma per alleviare problematiche che le terapie classiche non risolvono. La Terapia Oncologica Integrata vuole essere anche in Italia un approccio multidisciplinare atto a migliorare i risultati ottenuti dalla metodologia convenzionale. Ogni terapia antitumorale ha in sé effetti benefici ma anche effetti indesiderati. La terapia integrata cerca non solo di risolvere questi problemi, ma propone un uso combinato, cosiddetto complementare, di farmaci o metodologie al fine di raggiungere maggiori risultati. Come è successo in America anche in Italia è nata l'associazione ARTOI (Associazione per la Ricerca per Terapie Oncologiche Integrate) che si prefigge gli stessi scopi: curare ed informare. In campo medico ed ancora di più in quello oncologico, nessuno può dire di avere in mano la soluzione miracolosa, ma proprio per questo qualsiasi apporto sia esso farmacologico che di metodologia, necessaria la sua validazione scientifica, dovrebbe essere valutato. L'oncologia integrata ha conoscenze multidisciplinari ed è una medicina basata su evidenze scientifiche, integra percorso convenzionale con il complemento di farmaci o altre metodologie allo scopo di intensificare l'efficacia del trattamento e migliorare il controllo dei sintomi e ridurre la sofferenza. È a misura di paziente.

In Italia esistono realtà singole di trattamenti integrati che trovano difficoltà, anche culturali per lavorare. È servito l'unione per avere visibilità. Questa associazione vuole promuovere un nuovo approccio terapeutico alla malattia oncologica: la conoscenza e lo

studio di terapie non solo antiblastiche, per curare il cancro. Esistono molecole di estrazione naturale, fitoterapica e non solo, per curare la neoplasia. Un esempio è la lactoferrina. Il farmaco, molto studiato in Giappone, non solo è capace di ridurre la diffusione metastatica, ma riduce la capacità di trasformazione neoplastica delle cellule del distretto gastroenterico. Il resveratrolo, la curcuma, l'epigallocatechina gallato, l'inositolo ed altre sostanze hanno una azione sulle cellule neoplastiche analoga per esempio alla gemcitabina o al taxolo, che come sappiamo è un estratto derivato da una pianta, e sintetizzato in laboratorio. Sono oramai presenti numerosi studi scientifici che parlano della interazione sinergica di questi farmaci naturali con i farmaci antiblastici o con i farmaci biologici. Non possiamo permetterci di perdere conoscenze per poter lottare contro una malattia così invalidante e diffusa. Dobbiamo riuscire a vedere nel lavoro e conoscenze altrui l'opportunità per trattare meglio i nostri pazienti. L'uso combinato di chemioterapia con farmaci naturali è e deve essere approfondito per trovare definitivamente un modo univoco di lotta contro il cancro: la integrazione. La ricerca in campo oncologico sta facendo molti passi avanti, non ultimo quello sul riconoscimento delle cellule staminali neoplastiche come fonte della diffusione metastatica. Il nostro impegno è e sarà quello di riuscire ad individuarle e trattarle con farmaci specifici, anche biologici o farmaci naturali affinché non possano svilupparsi, cercando di stimolare l'attività del nostro sistema immunitario, che sappiamo essere l'altra componente per la crescita neoplastica. La terapia oncologica integrata si propone come valido supporto per la conoscenza e la terapia per la lotta ai tumori.

OTTIMIZZAZIONE DELLA CHEMIOTERAPIA MEDIANTE L'IMPIEGO DI SOSTANZE NATURALI

Stefania Meschini (a), Maria Condello (a), Pasquale Lista (a,b), Giuseppe Arancia (a)

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

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

La maggior parte dei tumori possono presentare, sia *in vitro* che *in vivo*, una scarsa sensibilità agli agenti chemioterapici risultando, quindi, difficilmente aggredibili con i tradizionali trattamenti farmacologici. Uno dei principali obiettivi della ricerca oncologica è perciò quello di individuare nuove strategie terapeutiche efficaci nei confronti dei tumori farmacoresistenti. A tal scopo, numerosi prodotti naturali di diversa origine e struttura chimica sono stati usati, da soli o in associazione con i convenzionali farmaci antitumorali, nella speranza di inibire, o almeno ridurre, la farmacoresistenza delle cellule tumorali.

Il fenomeno della farmacoresistenza (MDR: *Multidrug Resistance*) è spesso dovuto alla capacità della cellula tumorale di estrudere gli agenti citotossici riducendo la loro concentrazione intracellulare. In questo complesso meccanismo, un ruolo molto importante è svolto dalla molecola di trasporto P-glicoproteina (P-gp) che è generalmente sovraespressa sulla superficie delle cellule MDR.

Nel corso dei nostri studi abbiamo dimostrato che l'alcaloide bisindolico voacamina, isolato dalla pianta *Peschiera fuchsiaefolia*, è in grado di esercitare *in vitro* un marcato effetto chemiosensibilizzante su cellule tumorali farmacoresistenti trattate con la doxorubicina. In particolare, le cellule resistenti pretrattate con la voacamina mostrano un aumentato accumulo intracellulare del farmaco, essenzialmente localizzato all'interno del nucleo, paragonabile a quello osservato nelle cellule farmacosensibili. L'analisi della sopravvivenza cellulare e le osservazioni di microscopia ottica ed elettronica hanno evidenziato un notevole aumento dell'effetto citotossico della doxorubicina nei confronti delle cellule resistenti pretrattate con l'estratto vegetale. Abbiamo successivamente dimostrato che la voacamina è in grado di esercitare tali effetti essendo un substrato della P-gp ed agendo quindi quale antagonista competitivo nei confronti dell'agente chemioterapico.

Nel corso di tale ricerca, alcune evidenze sperimentali hanno suggerito che l'aumento dell'effetto citotossico indotto dall'alcaloide vegetale non è dovuto al potenziamento del processo apoptotico ma piuttosto all'induzione di morte cellulare per autofagia.

Numerosi studi, sia *in vitro* che *in vivo*, supportano l'ipotesi che differenti programmi di morte possono essere innescati in funzione dello stress cellulare indotto. L'autofagia è un processo che viene indotto dalla cellula in risposta a differenti stimoli citotossici. Questo processo può proteggere le cellule tumorali dall'apoptosi dopo trattamento con farmaci antitumorali o essere un meccanismo di morte per cellule che presentano un deficit nel loro programma apoptotico. Si è dunque valutato se il trattamento chemiosensibilizzante della voacamina potesse scatenare, sulle linee farmacosensibili e farmacoresistenti, un processo di morte cellulare per autofagia. Primo obiettivo di questo studio è stato quello di esaminare la presenza di vacuoli acidi intracitoplasmatici mediante coloranti vitali quali arancio di acridina (AO) e monodansilcadaverina (MDC). La valutazione è stata effettuata mediante microscopia ottica e confocale, la quantificazione mediante analisi citofluorimetrica. Il

colorante MDC, *marker* fluorescente specifico per la presenza di autofagolisosomi (organelli contenenti enzimi lisosomiali, fosfatasi acide e forme mature di catepsina D) ha rivelato un aumento della percentuale di strutture autofagosomiali nelle linee farmacoresistenti dopo trattamento per 24 ore con voacamina. Inoltre, osservazioni mediante microscopia elettronica a trasmissione hanno rivelato, in cellule resistenti trattate con voacamina, sia da sola che in combinazione con la doxorubicina, la presenza di alterazioni mitocondriali e di numerosi vacuoli circondati da doppia membrana con all'interno organuli citoplasmatici degenerati. Per dimostrare ulteriormente la presenza dei vacuoli autofagici nelle cellule trattate con voacamina è stata valutata la presenza di un recente *marker* dell'autofagia: la proteina MAP-LC3 (*Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*). La proteina LC3, normalmente localizzata a livello citoplasmatico, durante l'autofagia viene tagliata, lipidata e posizionata esclusivamente a livello degli autofagosomi. È stata quindi valutata e dimostrata la maggiore espressione della frazione lipidica LC3-II della proteina rispetto alla frazione citoplasmatica LC3-I nei campioni trattati con la sostanza chemiosensibilizzante. Tali dati confermano il ruolo chiave svolto dall'autofagia nei meccanismi di morte delle cellule tumorali trattate con la voacamina, sia singolarmente sia in combinazione con l'agente chemioterapico.

In conclusione, le capacità della voacamina di chemiosensibilizzare le cellule tumorali MDR e di modulare il processo autofagico rendono questo agente naturale particolarmente promettente ai fini dell'ottimizzazione della chemioterapia. Infatti, sebbene il ruolo dell'autofagia nelle cellule tumorali in risposta agli agenti citotossici è ancora poco chiaro e molto dibattuto, l'impiego di un prodotto naturale capace di modulare il processo autofagico potrebbe avere interessanti applicazioni cliniche.

LA ZEOLITE CLINOPTILOLITE ATTIVATA, UN NUOVO RIATTIVATORE CELLULARE COME APPROCCIO INNOVATIVO ALLA MEDICINA RIGENERATIVA

Fedele Manna

Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Università di Roma Sapienza, Roma

È noto che molte sostanze estranee al nostro organismo ne modificano l'omeostasi generando patologie di varia natura che lo danneggiano a volte in modo irreversibile dando origine anche a mutazioni cellulari che possono portare all'insorgenza di tumori.

La medicina rigenerativa che studia le possibili applicazioni delle cellule staminali sta avendo uno sviluppo notevole come via alternativa alla terapia farmacologica accompagnata, in genere, da reazioni avverse e caratterizzata da un costo sempre più elevato derivante dall'incremento dei consumi di farmaci dovuto all'invecchiamento della popolazione.

Una nuovo approccio al problema potrebbe essere costituito da un intervento preventivo mirato all'eliminazione dall'organismo umano delle sostanze tossiche generate dal metabolismo ed ancora di più di quelle che quotidianamente vengono immesse dall'esterno attraverso la respirazione, il contatto con la cute, i cibi o gli stessi farmaci, responsabili dell'insorgenza di varie patologie.

Una nuova strada è stata aperta da studi sull'uso di sostanze polifunzionali di origine minerale costituite da particelle attive, ma non assorbibili, di Zeolite clinoptilolite in grado di interagire nell'intestino con gli equilibri presenti nell'organismo, svolgendo così un'azione selettiva di eliminazione delle sostanze tossiche ("spazzino") attraverso le feci, senza modificare i componenti fisiologici. Le Zeoliti costituiscono una famiglia di alluminosilicati minerali strutturalmente diversi dai normali silicati o alluminati. La Clinoptilolite è costituita da due tetraedri di Silicio ed Alluminio legati mediante ponti ossigeno che genera ampi spazi liberi e canali nei quali possono essere accolti cationi e molecole relativamente grandi. È caratterizzata da un'elevata capacità di scambio cationico e rappresenta una delle caratteristiche preminenti della Clinoptilolite. Inoltre la sua caratteristica struttura elettronica e le cariche negative presenti in essa la rendono particolarmente attiva nel neutralizzare i radicali liberi e nell'adsorbimento di tossine (funzione di setaccio molecolare).

Un particolare processo di micronizzazione della Zeolite clinoptilolite brevettato ha dato origine alla Zeolite clinoptilolite attivata che è stata registrata come Dispositivo Medico a Livello Europeo (DM - TUV CE 0197 del 2006) date le sue caratteristiche azioni di tipo fisico di scambiatore di cationi, di blocco dei radicali liberi e di setaccio molecolare. Da tali caratteristiche deriva la sua fondamentale azione di riattivazione cellulare che ne consente l'uso come adiuvante in numerose patologie ed in terapie accompagnate da notevoli reazioni avverse quali la chemioterapia antitumorale. Recenti ricerche hanno evidenziato modificazioni strutturali della Zeolite clinoptilolite attivata derivanti dalla micronizzazione/attivazione che generano un netto incremento di attività delle particelle, come dimostrano i dati relativi alla capacità di cessione ed allo scambio cationico. È stata inoltre evidenziata la selettività dell'azione di setaccio molecolare nei confronti di tossine e la quasi totale assenza di interazioni con i farmaci che ne consentono l'uso anche durante terapie di varia natura.

INDICE DEGLI AUTORI

Angiolella, L.; 17
Arancia, G.; 23
Bonucci, M.; 21
Canini, A.; 13
Carratù, B.; 9
Cecchini, C.; 19
Chidi Ogbonna, C.; 19
Colizzi, V.; 19
Colone, M.; 17
Condello, M.; 23
Cresci, A.; 19
Gallo, F.R.; 7
Guidarelli, L.; 3
La Sala, G.B.; 5
Lista, P.; 23
Manna, F.; 25

Meschini, S.; 23
Multari, G.; 7
Orpianesi, C.; 19
Paesano, R.; 15
Palazzino, G.; 7
Pichichero, E.; 13
Pirillo, D.; 5
Ragno, R.; 17
Ravagnan, G.; 4
Sanzini, E.; 9
Silvi, S.; 19
Stringaro, A.; 17
Vavala, E.; 17
Verdenelli, M.C.; 19
Zambou Ngoufack, F.; 19

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

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

Roma, ottobre-dicembre 2010 (n.4) 11° Suppl.