

# Seminari

**S1** - “*L’elicriso come ‘pianta del sole’: dalla teoria delle signature alla medicina molecolare e clinica*”

(Moderatori: R. Pecorari, G. Appendino)

**S1.1** – **M. Ballero** (Dipartimento di Scienze Botaniche, Università degli Studi di Cagliari)

## **Botanica, coltivazione, raccolta e lavorazione**

L’elicriso è un suffrutice aromatico perenne appartenente alla famiglia delle *Compositae*.

Il portamento della pianta è piuttosto compatto con fusti legnosi contorti, alti 25-40 cm, rami arcuati, ascendenti, rivestiti di peli lisci che al tatto tendono a staccarsi.

Le foglie sono fitte, lineari, verde argentato, le inferiori patenti e tomentose, lunghe 1-5 cm e larghe circa 1 mm. I fiori sono prevalentemente tubulosi, di colore giallo chiaro riuniti in capolini conici, con 12-23 fiori per capolino in cui prevalgono quelli maschili.

I capolini sono a loro volta riuniti in corimbi densi di 25-35 infiorescenze. Le brattee dell’involucro florale sono caratteristiche, giallo brunastre e alla fine brune. Il frutto è un achenio ovale-oblungo con la superficie corrugata da numerosi piccoli tubercoli. Nella sua parte superiore è inserito il pappo di peli semplici.

È nativo del continente europeo (soprattutto Europa Orientale e Caucasia) e nord americano (soprattutto USA). In Italia è molto diffuso nelle regioni centro-meridionali. Predilige luoghi aridi e rocciosi, anche vicino al mare, ben soleggiati; cresce bene anche sulle pietraie formando caratteristiche macchie colorate per i suoi numerosi fiori giallo-arancio. È un arbusto di piccole dimensioni alquanto ramificata, ha fusto eretto, alto 10-50 cm, con foglie grigio verdi di forma lineare-lanceolata, con bordo ripiegato all’ingiù verso terra e fiori piccoli, raggruppati in fitti capolini. La parte della pianta utilizzata sono i capolini fioriti, raccolti in estate all’inizio della fioritura, da cui si ottengono la polvere e gli estratti standardizzati per gli utilizzi fitoterapici. L’aroma ricorda la camomilla; il sapore è amarognolo, metallico e persistente. Il colore è giallo brillante e persistente anche dopo essiccamento.

§1.2 – G. Appendino (DISCAFF, Università del Piemonte Orientale, Novara e Indena SpA, Milano)

### **Fitochimica, farmacologia e impieghi terapeutici dell'elicriso**

L'elicriso (*Helichrysum italicum* G. Don.) è una delle piante medicinali più note dell'area Mediterranea. Il suo profumo forte e persistente ricorda quello del curry, e, combinato al colore giallo e persistente dei fiori, rende questa pianta una vera e propria icona dell'ambiente mediterraneo. Nel sistema greco-romano della medicina, l'elicriso era usato come antiinfiammatorio ed antiinfettivo, e questi due usi sono ben radicati ancora oggi nella medicina tradizionale. I primi studi sistematici sulle proprietà medicinali dell'elicriso furono fatti negli anni quaranta da Santini, un medico di famiglia della Garfagnana, che li pubblicò in una serie di note pubblicate nel primo dopoguerra.<sup>1</sup> Nonostante i risultati promettenti ottenuti nel trattamento di molte patologie come artrosi, infezioni del cavo orale e afte, le ricerche di Santini non ricevettero il rilievo che avrebbero meritato, e la pianta cadde in una sorta di oblio farmacologico durato, in pratica, fino ad oggi. Dal punto di vista fitochimico, le piante del genere elicriso sono dei produttori prolifici di metaboliti secondari, ed alcuni composti dotati di proprietà antiinfiammatorie sono in effetti state descritte come costituenti di questa pianta. Tuttavia, le basse rese di isolamento e l'attività relativamente modesta di questi composti rendono probabile l'esistenza di principi, ancora non identificati, responsabili delle proprietà antiinfiammatorie della pianta. Dal momento che l'utilizzo etnofarmacologico e le proprietà antiinfiammatorie dell'elicriso sono ben documentate, è stato intrapreso uno studio sistematico sulla presenza di composti antiinfiammatori, focalizzandosi sull'elicriso della Sardegna (*H. italicum* (Roth) G. Don. ssp. *microphyllum* (Willd) Nyman), di cui esistono abbondanti popolazioni spontanee nell'isola. In questo modo, è stata scoperta una serie di derivati pironici omo- ed eterodimerici dotati di potente azione inibitrice sul fattore di trascrizione nucleare NF-kB, un elemento critico della cascata antiinfiammatoria.<sup>2</sup> Il più potente di questi composti è stato chiamato *arzanolo* in onore del piccolo paese dell'Ogliastra da cui proveniva la pianta utilizzata per queste ricerche. I risultati ottenuti supportano in pieno le osservazioni cliniche di Santini, qualificando l'elicriso come importante pianta medicinale.

1 - (a) Santini, L. *Considerazioni sugli Effetti Terapeutici dell'Elicriso*; Salvetti: Castelnuovo, 1948. (b) Santini, L. *Atti Soc. Lomb. Sci. Med. Biol.* **1949**, 5, 18.

2 - (a) Appendino, G. et al. Arzanol, an Anti-inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol alfa-Pyrone from *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. ssp. *microphyllum* (Willd.) Nyman. *J. Nat. Prod* **2007**, 70, 608-612.

(b) Rosa, A. et al. "Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activity of arzanol, a prenylated a-pyrone-phloroglucinol etherodimer from *Helichrysum italicum* subsp. *microphyllum*". *Chem. Biol. Interact.* **2007**, 165, 117-126.

### **Formulazioni galeniche di elicriso; prodotti sul mercato**

Il passaggio dalla teoria alla pratica, cioè dal mondo della ricerca alla prescrizione medica, rappresenta il momento di massima criticità perché si deve dar forma ad un progetto terapeutico trovando un prodotto che si avvicini alle proprie aspettative. Se questo processo è relativamente semplice nel mondo del farmaco perché è possibile fare ricerche per alberi (ATC, indicazioni terapeutiche, ditta ecc.) e perché esistono poderosi prontuari in grado di risolvere la maggior parte dei casi, non possiamo dire altrettanto quando cerchiamo prodotti commerciali fitoterapici al di fuori della categoria del farmaco. Dal momento che tale categoria presenta numerosi problemi per i prodotti naturali, che troviamo sostanzialmente nella categoria degli integratori, non essendoci prontuari con le caratteristiche di quelli del farmaco, la ricerca diventa veramente complessa e... demoralizzante. Al di là di pochi prodotti che riportano il titolo e danno indicazioni chiare nella maggioranza dei casi siamo di fronte a prodotti eterogenei e molto originali, spesso, poco chiari, per il medico, il farmacista ed il consumatore che ne vogliono far uso in fitoterapia o automedicazione. La situazione è comunque migliore per il té verde per il quale sono disponibili numerosi prodotti (da solo o in associazione) rispetto all'elicriso. Ben diverso è il caso delle preparazioni magistrali per le quali il medico può avere, in etichetta, le informazioni che lo interessano o comunque condizionare la prescrizione al rispetto di un titolo ben preciso. Non resta che augurarci che il successo commerciale degli integratori induca qualche editore esperto in materia a pubblicare un Prontuario fitoterapico che risolva il problema fornendo agli operatori del settore lo strumento di cui hanno bisogno.

## S2 – *Impieghi medicinali del tè verde* (Moderatore: P. Morazzoni)

S2.1 – R.. Della Loggia (DEMREP, Università degli Studi di Trieste)

### **Fitochimica e farmacologia del tè verde**

Con il termine di tè verde si intende qualsiasi preparazione ottenuta dalle foglie di *Camelia sinensis* (L.) KUNTZE con tecniche che riducono al minimo le fermentazioni post-raccolta. Viene assunto in vari modi, che vanno dall'infuso delle foglie alla sospensione in acqua delle foglie polverizzate.

I composti principali presenti sono da un lato le catechine - epicatechina (EC) epicatechina-3-gallato (ECG), epigallocatechina (EGC) ed epigallocatechina gallato (EGCG) - e dall'altro le metilxantie, soprattutto caffeina. Il consumo abituale di tè verde è stato messo in relazione con la prevenzione di una serie di malattie di tipo cronico, in genere legate al progredire dell'età; tra queste le malattie degenerative a livello cardiocircolatorio, la sindrome metabolica, i tumori ed altre ancora. I responsabili di queste proprietà sono stati individuati nelle catechine, composti polifenolici considerati caratteristici del tè verde, che talvolta sembrano assumere il ruolo di composti miracolosi in grado di arrestare l'inesorabile incedere dell'età. Le proprietà farmacologiche delle catechine sulle quali si potrebbe basare la protezione cardiocircolatorio sono principalmente di tipo anti-infiammatorio ed antiossidante: esse infatti inibiscono il danneggiamento del DNA a livello cellulare e l'ossidazione delle LDL. Il meccanismo d'azione appare essere multifattoriale e comprende l'effetto *radical scavenger* : ciò porta ad una riduzione dello stress ossidativo con contenimento della perossidazione lipidica. Sul versante anti-infiammatorio è da ricordare il blocco della NO-sintetasi inducibile, della produzione di citochine e mediatori pro-infiammatori e dell'attivazione di fattori come NF-kB. Studi nel topo hanno mostrato come la somministrazione orale di catechine riduca drasticamente la comparsa di tumori intestinali. Il meccanismo d'azione appare legato ad un'azione sulla *signaling pathway*. Per quanto riguarda la sindrome metabolica, a livello sperimentale sono stati osservati effetti positivi tanto sul controllo del peso corporeo quanto sui livelli di glicemia. Per valutare razionalmente le possibilità concrete che il tè verde ha nel prevenire una serie di patologie degenerative, restano ancora da definire vari problemi, in particolare per quanto riguarda la variabilità del contenuto in catechine delle varie preparazioni, il ruolo della caffeina, la biodisponibilità ed in generale la farmacocinetica delle catechine, ma soprattutto il significato clinico delle proprietà farmacologiche osservate e la definizione degli schemi posologici ottimali. Solo una seria, ma difficile, sperimentazione clinica potrà dare risposta a queste domande.

**S2.2** – **S. Bettuzzi, M. Coletta, F. Rizzi** (Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Biochimica, Università di Parma)

### **Il té verde nella chemoprevenzione oncologica**

The constant increase in the incidence of prostate cancer (CaP) in Western Countries has brought the disease to rank now second as leading causes of cancer-related death among men. Therefore it represents a major health and social problem. CaP is a slow progression disease and very often diagnosis is made late in elderly men. For this reason, CaP is an ideal target for chemoprevention strategies. At present, chemoprevention may be the best approach to fight CaP. A growing body of evidence has suggested that biologically active compounds from green tea (catechins: the most common are EGCG, EGC, ECG and EC) might possess anti-tumour activity. Recently we showed that a Green Tea Catechins extract (GTCs) was very effective at inhibiting cancer growth *in vitro* and in a transgenic animal model (A. Caporali, et al., 2004). In our hands, GTCs triggered death in cancer cells probably through induction of the nuclear form of Clusterin. Although results from the laboratory were promising, no definitive clinical data demonstrating the efficacy of GTCs at inhibiting CaP progression in humans were still available. Thus, in 2006 we performed a clinical trial in a cohort of 60 human volunteers bearing HG-PIN, the main pre-malignant lesion of CaP, demonstrating that about 90% inhibition of CaP development was achievable by oral administration of GTCs to humans for 1 year (S. Bettuzzi et al., 2006). No significant side or adverse effects were recorded. To our knowledge, this is the first study showing that GTCs are very effective for treating pre-malignant lesions before CaP develops. Obviously, this important achievement needs a confirmation with a larger study. But another important issue was still open, to our opinion: understanding whether CaP onset was definitively prevented or simply delayed by treatment. To deal with this issue, we performed another clinical study in which about 50% of the patients from both arms of the previous study have agreed to undergo another round of prostate mapping by needle biopsy 2ys after suspension of GTCs administration. Our follow-up study demonstrated that the incidence of CaP was still statistically different in the two arms which were previously GTCs- or placebo-treated. In fact, the clinical conditions of patients did not change after suspension of therapy, i.e. 3ys after the beginning of the study (Brausi et al., 2008). This novel data further strengthen our previous result, strongly suggesting that CaP development might be definitively inhibited in man bearing pre-neoplastic lesions by administration of GTCs for just 1y. This clinical approach can be envisaged as an early therapy which is highly effective on initial stage of cell transformation. Very interestingly, the molecular action of GTCs seems to require activation of pro-apoptotic, nuclear Clusterin, a novel tumor-suppressor gene (F. Rizzi and S. Bettuzzi, 2008; O. Chayka et al., 2009).

**S2.3** – **E. Stockfleth** (MediGene, Germania)

**Lo sviluppo di Veregen, il primo botanical drug approvato dalla FDA**

Veregen® (sinecatechins) Ointment, 15% is a botanical drug product for topical use. The drug substance in Veregen® is sinecatechins, which is a partially purified fraction of the water extract of green tea leaves from *Camellia sinensis* (L.) o Kuntze, and is a mixture of catechins and other green tea components. Catechins constitute 85 to 95% (by weight) of the total drug substance which includes more than 55% of Epigallocatechin gallate (EGCg), other catechin derivatives such as Epicatechin (EC), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin gallate (ECg), and some additional minor catechin derivatives i.e. Gallocatechin gallate (GCg), Gallocatechin (GC), Catechin gallate (Cg), and Catechin (C). In addition to the known catechin components, it also contains gallic acid, caffeine, and theobromine which together constitute about 2.5% of the drug substance. The remaining amount of the drug substance contains undefined botanical constituents derived from green tea leaves.

Veregen® is indicated for the topical treatment of external genital and perianal warts (*Condylomata acuminata*) in immunocompetent patients 18 years and older.

## **§2.4 S. Ricciuti e A. Rossi (S.I.FIT.)**

### **Estratti e formulazioni galeniche per i vari impieghi medicinali del té verde**

Il passaggio dalla teoria alla pratica, cioè dal mondo della ricerca alla prescrizione medica, rappresenta il momento di massima criticità perché si deve dar forma ad un progetto terapeutico trovando un prodotto che si avvicini alle proprie aspettative. Se questo processo è relativamente semplice nel mondo del farmaco perché è possibile fare ricerche per alberi (ATC, indicazioni terapeutiche, ditta ecc.) e perché esistono poderosi prontuari in grado di risolvere la maggior parte dei casi, non possiamo dire altrettanto quando cerchiamo prodotti commerciali fitoterapici al di fuori della categoria del farmaco. Dal momento che tale categoria presenta numerosi problemi per i prodotti naturali, che troviamo sostanzialmente nella categoria degli integratori, non essendoci prontuari con le caratteristiche di quelli del farmaco, la ricerca diventa veramente complessa e.... demoralizzante. Al di là di pochi prodotti che riportano il titolo e danno indicazioni chiare nella maggioranza dei casi siamo di fronte a prodotti eterogenei e molto originali, spesso, poco chiari, per il medico, il farmacista ed il consumatore che ne vogliono far uso in fitoterapia o automedicazione. La situazione è comunque migliore per il té verde per il quale sono disponibili numerosi prodotti (da solo o in associazione) rispetto all'elicriso. Ben diverso è il caso delle preparazioni magistrali per le quali il medico può avere, in etichetta, le informazioni che lo interessano o comunque condizionare la prescrizione al rispetto di un titolo ben preciso. Non resta che augurarci che il successo commerciale degli integratori induca qualche editore esperto in materia a pubblicare un Prontuario fitoterapico che risolva il problema fornendo agli operatori del settore lo strumento di cui hanno bisogno.

### S3 – *Il ruolo delle piante in oncologia* (Moderatore: G. Appendino)

#### S3.1 – M. Rindone (S.I.FIT.)

#### **Il mondo vegetale nuovamente protagonista e fonte di nuovi farmaci: antitumorali tetralinici e topotecano-derivati**

Numerosi farmaci largamente impiegati in clinica sono stati sviluppati da composti *lead* originariamente identificati in piante medicinali. Le medicine tradizionali sono infatti potenzialmente sempre fonte di nuovi farmaci, a partire da iniziali ricerche che si focalizzano sull'isolamento di nuovi composti *lead* biologicamente attivi. A questa fase seguono gli studi riguardanti la struttura chimica della molecola identificata, allo scopo di aumentarne l'attività, diminuirne la tossicità o migliorarne il profilo farmacologico. Questo anche l'iter seguito per la scoperta, l'isolamento e lo studio da un lato dei lignani ariltetralinici, composti *lead* per la scoperta dei derivati antineoplastici semisintetici etoposide, teniposide ed Etopophos (Ionkova, 2007) e dall'altro degli analoghi di prima generazione della camptotecina, topotecan e irinotecan (Kuo-Hsiung L., 2000).

#### Lignani ariltetralinici:

I primi, farmaci antineoplastici utilizzati nel trattamento di diverse forme tumorali incluso il carcinoma polmonare a piccole cellule, il cancro testicolare e il linfoma maligno, sono derivati del lattone ariltetralinico podofilotossina, non utilizzabile in terapia a causa della sua elevata tossicità. **Etoposide** veniva approvato dall'FDA nel 1983, ma sfortunatamente la sua biodisponibilità orale - compresa tra il 40 e il 75% - varia molto con la dose, e si osserva un'elevata variabilità interindividuale. Inoltre, poiché il farmaco risulta scarsamente solubile in acqua, la sua somministrazione endovenosa può richiedere elevate quantità di fluido, e questo può causare lo sviluppo di insufficienza cardiaca in soggetti predisposti (Hande, 1998). Reazioni di ipersensibilità ed ipotensione possono pure verificarsi a seguito della rapida somministrazione di etoposide, e sono probabilmente legate al veicolo utilizzato come solubilizzante. Questi problemi di solubilità sono stati superati con la sintesi di etoposide fosfato (Etopophos), un profarmaco di etoposide per uso endovenoso, approvato dalla FDA nel 1996. Etoposide fosfato può essere somministrato più rapidamente e sembra associato ad un numero ridotto di reazioni di ipersensibilità (Collier K. et al., 2008). Nei pazienti affetti da linfoma ricorrente e ad alto rischio, Etopophos si è mostrato bioequivalente ad etoposide (Reif et al., 2001).

**Teniposide** veniva approvato in USA nel 1993 e viene utilizzato primariamente nel trattamento delle leucemie e dei linfomi, soprattutto nel bambino. Il suo profilo di effetti tossici è identico a quello dell'etoposide: può indurre mielosoppressione- che rappresenta la tossicità dose-limitante di questi composti - alopecia, nausea, vomito di lieve entità e mucosite, oltre ad occasionali reazioni di ipersensibilità.

Analoghi della camptotecina:

Come per i tassani, il team di ricerca condotto da Monroe Wall e Mansukh Wani è responsabile della scoperta e dello sviluppo di questi composti (Oberlies e Kroll, 2004)- tra quelli di prima generazione topotecan e irinotecan- utilizzati principalmente nel trattamento del carcinoma ovarico e coloretale e approvati dall'FDA nel 1996. Nel febbraio 2006, l'EMEA approvava l'utilizzo clinico di **topotecan** per il trattamento dei pazienti con recidiva di carcinoma polmonare a piccole cellule (*Small Cells Lung Cancer* o microcitoma). Di rilievo la capacità del farmaco di passare la barriera ematoencefalica. In fase di valutazione è la sua attività in una particolare neoplasia del sangue, la sindrome mielodisplastica.

**Irinotecan** è uno dei farmaci più attivi nel trattamento dei pazienti con carcinoma del colon in fase avanzata, dove si usa sia come prima terapia che dopo fallimento della terapia iniziale. Numerosissimi analoghi della camptotecina di seconda generazione sono attualmente in diverse fasi di sviluppo clinico. Sia i derivati della podofillotossina che quelli della camptotecina non bloccano la mitosi interagendo con la tubulina, ma arrestano la duplicazione cellulare interagendo con le topoisomerasi (Botta et al., 2001), enzimi ubiquitari che hanno il compito di risolvere i superavvolgimenti del DNA per permettere lo svolgimento delle funzioni cellulari vitali, trascrizione e replicazione. Durante la duplicazione cellulare, la camptotecina si intercala tra le basi del DNA, bloccando l'attività catalitica della topoisomerasi di tipo I. Le ariltetraline etoposide e teniposide sembrano invece agire trasformando la topoisomerasi II in una tossina fisiologica che, accumulandosi, induce anomalie nel genoma delle cellule tumorali.

**Bibliografia essenziale**

- Botta B., Delle Monache G., Misiti D., Vitali A., Zappia G., *Current medicinal Chemistry* 8 (11): 1363-81, 2001  
Collier K., Schink C., Young A.M., How K., Seckl M., Savage P., *J. Oncol. Pharm. Pract.* 14 (1): 51-5, 2008  
Hande K.R., *Eur. J. Cancer* 34 (10): 1514-21, 1998  
Kuo-Hsiung L., *Antitumor Agents* 188, CRC Press LLC, 2000  
Ionkova I., *Pharmacognosy Reviews* 1 (1): 57-68, 2007  
Oberlies N.H. and David J. Kroll, Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research, *J. Nat. Prod.* 67: 129-35, 2004  
Reif S., Kingreen D., Kloft C., Grimm J., Siegert W., Schunack W., Jaehende U., *Cancer Chemoth. Pharmacol.* 48 (2): 134-40, 2001

### Glucosinolati e chemoprevenzione

I glucosinolati (GLs) costituiscono una classe di oltre 120 composti  $\beta$ -tioglucosidici esclusivi del regno vegetale fra i quali, i più importanti e studiati sono la glucorafanina e la sinigrina. Essi sono presenti in sedici famiglie di dicotiledoni angiosperme, che includono un vasto numero di piante del genere Brassica normalmente consumate con la dieta, come ad esempio broccoli, cavoli, rucola, ravanello giapponese, cavolfiori e rape (1). I GLs di per sé non sono molecole bioattive; a valori di pH prossimi alla neutralità essi sono idrolizzati in isotiocianati (ITC) per azione dell'enzima mirosinasi ( $\beta$ -glucosidasi glucoidrolasi, EC 3.2.1.147), anch'esso presente nei tessuti vegetali. Una correlazione diretta tra il consumo di Brassicaceae e la riduzione dell'incidenza di numerose forme tumorali è sostenuta sia da studi epidemiologici, sia da studi in vitro ed in vivo ed è attribuita agli ITC. Quando l'uomo si nutre di Brassicaceae crude, come ad esempio la rucola, il crescione o i germogli di broccoli, la masticazione provoca la perdita della compartimentalizzazione cellulare e i GLs sono rapidamente trasformati totalmente o parzialmente, dalla mirosinasi endogena, in ITC e sono prontamente assorbiti e metabolizzati in ditiocarbammati attraverso la via dell'acido mercapturico. Sebbene il meccanismo attraverso cui le Brassicaceae esercitano il loro effetto protettivo non sia ancora del tutto chiarito, si ritiene che gli ITC bioattivi, ottenuti dai GLs precursori, agiscano tramite un meccanismo multipotente. La loro attività chemoprotettiva è attribuita a diverse funzioni biologiche e numerosi lavori scientifici riportano che essi sono in grado di inibire lo sviluppo del cancro (2). L'idrolisi enzimatica della glucorafanina, il principale GLs dei broccoli, porta alla formazione del "sulforaphane", un ITC oggetto di numerosi studi e considerato un promettente composto per combattere il cancro (3). Tale peculiarità è stata ribadita anche in una recente review (4) in cui si riporta: "The time is right for clinical trials of purified and semipurified Sulforaphane, as well as whole broccoli."

### Bibliografia

- 1- Fahey J. et al. *Phytochemistry* 56 (2001) 5-51
- 2- Zhang Y. *Mutat. Res.* 555 (2004) 173-190.
- 3- Fimognari C. and Hrelia P. *Mutat Res.* 635 (2007) 90-104 .
- 4- Jeffery E.H. and Keck A-S *Mol. Nutr. Food Res.* 52, Suppl 1 (2008) 7-17

**§3.3** – **M. R. Ursino, E. Trapasso, G. Calapai, M. Navarra** (Dipartimento Farmaco-Biologico, Università degli Studi di Messina)

### **Meccanismi molecolari alla base dell'effetto antiproliferativo del succo di bergamotto (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau)**

Il bergamotto (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) è un piccolo agrume il cui habitat naturale è rappresentato dalla fascia costiera ionica della Calabria. Il frutto del bergamotto è utilizzato per la produzione dell'olio essenziale che trova impiego soprattutto nell'industria profumiera, mentre il succo è considerato solo un prodotto di scarto dell'industria delle essenze. Diversi studi hanno analizzato la composizione chimica del succo di bergamotto (Cautela e coll., J Agric Food Chem, 2008), ma pochi ne hanno valutato le proprietà biologiche.

E' noto che sostanze vegetali comunemente assunte con la dieta possono avere un ruolo importante nel prevenire alcuni tipi di tumore (Kris-Etherton e coll., Am. J. Med., 2002), ed una recente review di Newman e Cragg (J. Nat. Prod., 2007) ha documentato che più del 70% dei farmaci anticancerogeni sono prodotti di origine naturale o di semisintesi. Alla luce delle suddette osservazioni, l'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare l'effetto del succo di bergamotto (BJ) sulla proliferazione di cellule di carcinoma epatocellulare umano HepG2 e di neuroblastoma umano SH-SY5Y mantenute in coltura.

L'incubazione delle cellule HepG2 con diluizioni crescenti di BJ, comprese tra l'1 ed il 10% per 24, 48 e 72 ore, riduce la proliferazione cellulare in maniera tempo e concentrazione -dipendente ( $P < 0.001$  vs colture non trattate), come determinato attraverso il saggio dell'MTT e l'analisi delle curve di crescita. I dati sperimentali documentano che BJ alle concentrazioni più elevate (5 e 10 %) induce significativi effetti citotossici ( $P < 0.001$  vs cellule non trattate), valutati in termini di morte cellulare con il saggio dell'esclusione del trypan blu. Il saggio dell'Annexina V condotto mediante tecniche di citofluorimetria a flusso suggerisce che la morte cellulare indotta dal BJ è mediata dall'attivazione del programma di morte cellulare: la popolazione apoptotica aumenta in relazione alla concentrazione del BJ ed al tempo di esposizione, raggiungendo il 65% di cellule in apoptosi in seguito ad un trattamento di 72 ore con BJ 10%. Esperimenti di western blotting suggeriscono che l'apoptosi delle cellule HepG2 indotta dal BJ potrebbe essere dovuta alla riduzione dell'espressione genica di Bcl2 e BclXL, proteine ad attività anti-apoptotica, ed all'aumento di P53, un oncosoppressore coinvolto nei meccanismi pro-apoptotici e di arresto del ciclo cellulare. L'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare, infatti, mostra che l'esposizione delle HepG2 al BJ 10% determina un accumulo delle cellule in fase G2.

Lo stesso approccio sperimentale è stato utilizzato per valutare se il BJ fosse in grado di ridurre la proliferazione di cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y. I risultati dei nostri esperimenti hanno evidenziato che l'effetto antiproliferativo

indotto dal BJ su questa linea cellulare è scarsamente correlato con un aumento della morte cellulare, ma sembra, piuttosto, essere mediato da una riduzione tempo e concentrazione-dipendente della popolazione cellulare in fase G2. Inoltre, l'esposizione delle cellule SH-SY5Y al BJ determina una marcata modificazione della morfologia cellulare ed una importante riduzione dell'adesione cellulare, suggerendo che il meccanismo attraverso il quale il BJ riduce la proliferazione cellulare delle SH-SY5Y è profondamente diverso da quello innescato nelle HepG2.

I risultati della nostra ricerca dimostrano che il BJ riduce la proliferazione di cellule tumorali di origine diversa, attraverso l'attivazione di vie del segnale e meccanismi molecolari differenti. Nelle cellule di carcinoma epatocellulare umano HepG2 l'attività antiproliferativa del BJ è dovuta essenzialmente ad un effetto di tipo citotossico, mentre nel neuroblastoma umano SH-SY5Y sembra prevalere un effetto citostatico accompagnato da una marcata riduzione dell'adesione cellulare.

Ulteriori studi sono in corso per identificare i composti maggiormente coinvolti nell'attività antiproliferativa del BJ e per valutarne le potenzialità applicative in sistemi *in vivo*.

## S4 – Fitoterapia e tratto uro-genitale (Moderatore: R. Della Loggia)

S4.1 - P. Campagna (Coordinatore area medica Corso di Perfezionamento in Fitoterapia, Università della Tuscia, Viterbo)

### Gli oli essenziali per la terapia delle vaginosi batteriche

La vaginosi batterica è una delle più frequenti forme di infezione vaginale. Mediamente ne è affetto il 5-15% di tutte le donne in età fertile, anche in gravidanza, ma secondo alcuni Autori l'incidenza è notevolmente più elevata. In circa la metà delle donne, la vaginosi decorre asintomatica, negli altri casi l'infezione si manifesta generalmente con perdite vaginali bianche o grigio pallido, cremose o schiumose, caratterizzate da odore sgradevole, causato dalla presenza delle amine batteriche come la cadaverina e la putrescina, prodotte dal metabolismo batterico. Si tratta di una condizione caratterizzata dall'alterazione del normale ecosistema vaginale e del suo pH; ossia di uno squilibrio riguardante i microrganismi che, in condizioni fisiologiche, popolano e difendono l'ambiente vaginale stesso (la cosiddetta flora saprofitica). Dal punto di vista eziopatogenetico la vaginosi batterica è caratterizzata non solo da un'eccessiva crescita di germi commensali quali *Gardnerella vaginalis* e *Mycoplasma hominis* ma anche di numerose specie di anaerobi gram negativi e positivi a scapito della componente lattobacillare; tutto ciò favorito da numerosi fattori di rischio e da una certa predisposizione genetica. In questo lavoro vengono prese in considerazione le convenzionali terapie per os e per uso topico e messe poi a confronto con i rimedi fitoterapici più idonei, secondo dati di letteratura accreditati, in riferimento soprattutto ai vari oli essenziali proponibili. In ginecologia difatti gli oli essenziali sono stati spesso usati nel trattamento di infezioni acute, croniche o ricorrenti legate ad alcune patologie (infezioni causate dal lievito *Candida albicans*, infezioni vaginali o urinarie miste o causate da batteri coliformi e infezioni causate da streptococchi del gruppo B). Per il trattamento di infezioni ginecologiche di maggiore gravità, essi possono anche essere associati con gli antibiotici ed alcuni possono anche essere utilizzati nel trattamento di patologie meticillina resistenti di *Staphylococcus aureus* (MRSA).

In questa esperienza clinica l'Autore inoltre pone gli oli essenziali in una veste più complessa in quanto essi rivestono un nuovo, interessante presidio terapeutico nelle vaginosi, grazie alla contemporanea attività microbica, fungicida, riepitelizzante, immunostimolante ed antiossidante. L'analisi dei risultati ne evidenzia l'elevata attività antimicrobica e di alcuni oli essenziali tipizzati viene valutata la potenzialità batteriostatica e battericida tramite valori di MIC e MBC estrapolati da analisi di laboratorio. Nella disamina di tanti O.E.,

provenienti dalla nostra cultura tradizionale europea ma anche dall'etnomedicina, spiccano quelli di *Melaleuca alternifolia* (che ha mostrato altresì buona attività antimicrobica su vari ceppi batterici e fungini responsabili di VB e sul protozoo *Trichomonas vaginalis*) e di *Zataria multiflora* molto attivo su *Gardnerella vaginalis*. L'aromaterapia nelle vaginosi si può avvalere anche di altri presidi in associazione come lattobacilli, acido lattico, fibre e vari fitocomplessi in azione sinergica.

### **Sessualità femminile: ormoni, fitormoni e galenica**

Le caratteristiche biocomportamentali che esprimono l'attrazione sessuale dipendono dal clima estrogenico e dai fattori androgeno-dipendenti che modulano la componente ferormonica femminile.

Durante il ciclo mestruale, oltre alle oscillazioni degli steroidi e del progesterone, si evidenzia a metà ciclo un incremento degli androgeni ovarici, il cui scopo è agire a livello centrale attivando ancor di più il desiderio sessuale (*Turna et al. 2005*).

Donne con desiderio ipoattivo presentano livelli androgenici bassi rispetto a donne sane, anche se non sempre il desiderio ipoattivo è associato a bassi livelli di testosterone, o bassi livelli di testosterone sono sufficienti per distinguere donne con sessualità ipoattiva dalle sane. Non sempre la sindrome della deficienza androgenica può essere dimostrata biochimicamente (*Davis et al. 2005*), è però vero, come dimostrato da studi pilota sugli inibitori della 5-fosfodiesterasi, condotti in donne affette da disturbi della fase di eccitazione genitale, che un adeguato clima androgenico risulta indispensabile perché le terapie siano efficaci (*Caruso et al. 2001; Caruso et al. 2003*).

I preparati estrogenici e il contributo del testosterone, se ben bilanciati, sono di ottimo supporto all'attivazione della piattaforma dell'eccitazione sessuale. Nella medicina complementare alcuni fitoterapici hanno mostrato analoghe attività e trovano collocazione nella terapia del desiderio ipoattivo sia in donne fertili che in donne in età menopausale. *Lepidium meyenii*, *Dioscorea villosa*, *Tribulus terrestris*, la damiana, i fitoestrogeni e altri fitoterapici sono una risorsa complementare alla medicina tradizionale per migliorare la funzione sessuale.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

*Caruso S. et al. The function of sildenafil on female sexual pathways: a double-blind, cross over, placebo controlled study, Eur.J.Obst.Gyn. 110, 2003*

*Caruso S. et al. A prospective study evidencing rhinomanometric and olfactometric outcomes in women taking oral contraceptives, Hum.Reprod. 16, 2001*

*Turna et al. Women with low libido: correlation of decreased androgen levels with female sexual function index, Int.J.Import.Ros. 17, 2005*

§4.3 – S. Micali (U. O. di Urologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia)

### **Infezioni urinarie e ruolo della fitoterapia**

Le Infezioni Urinarie (I.U.) sono di frequente riscontro e per incidenza sono seconde soltanto a quelle dell'apparato respiratorio. Le I.U. hanno una prevalenza diversa a seconda dell'età, del sesso e della presenza di alcuni fattori predisponenti. Durante la vita, l'incidenza d'infezione è maggiore nelle femmine rispetto ai maschi con due importanti eccezioni: l'infanzia e l'età adulta. La cistite è la più nota, e frequente, delle I.U. ed almeno un terzo delle donne ha avuto un episodio cistitico nella sua vita. I sintomi urinari hanno un carattere irritativo: bruciori minzionali, aumento della frequenza minzionale diurna, impellenza minzionale, sensazione d'incompleto svuotamento vescicale e nelle forme più gravi macroematuria. Il germe più comunemente identificato è *Escherichia coli* (80% dei casi) e spesso è sensibile alla terapia antibiotica.

Il cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) è un piccolo arbusto di origine nord-americana, molto simile al mirtillo dal punto di vista botanico, che produce dei frutti rossi dal sapore acidulo e aspro. Gli indiani d'America utilizzavano comunemente queste bacche per curare le ferite cutanee e per prevenire e trattare le infezioni urinarie e lo scorbuto. Le bacche del cranberry contengono flavonoidi, antocianosidi, oligomeri proantocianidolici, acido benzoico e altri acidi organici che hanno proprietà antibatteriche. Studi hanno infatti dimostrato che queste sostanze hanno la capacità di rendere antiadesiva la superficie delle mucose, e pertanto di inibire l'adesione cellulare dei vari batteri patogeni responsabili delle infezioni urinarie, fra cui *Escherichia coli*.

In questo lavoro ci proponiamo di revisionare la letteratura corrente, e di valutare il ruolo del cranberry come terapia delle I.U. Inoltre, spazio sarà dato a tutti quelle piante, frutti e radici che svolgono un'azione antibatterica nelle urine.

§4.4 - N. Nesladek (Medico Specialista in Ostetricia e Ginecologia, Trieste)

### **Agnocasto, nuove acquisizioni ed esperienze cliniche**

**§4.5** - **M. C. Sighinolfi, S. Micali, A. Mofferdin, S. De Stefani, G. Bianchi** (U. O. di Urologia, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia)

### ***Ginkgo biloba*: potenziale applicazione nella disfunzione erettile**

#### Introduzione

*Ginkgo biloba* è un estratto derivante dalla foglia dell'albero di ginkgo cinese, nota ovunque per il suo benefico effetto sul trofismo cardio-vascolare. Il suo utilizzo in urologia è stato già descritto, in particolare in quei pazienti con deficit erettile associato a farmaci antidepressivi. Lo scopo del presente lavoro è di valutare l'efficacia di una terapia con *Ginkgo biloba* in soggetti affetti da deficit erettile derivante da un'alterazione endoteliale.

#### Metodi

Quaranta uomini di età compresa fra 25 e 45 anni (media 36.5) sono giunti all'osservazione andrologica per disfunzione erettile perdurante da almeno tre mesi, e verificata mediante International Index of Erectile Function (IIEF-5). Nessuno dei pazienti presentava fattori di rischio cardiovascolari o anomalie dei genitali esterni. Tutti i pazienti presentavano un modico deficit veno-occlusivo all'Eco Color Doppler preliminare basale e dinamico (EDV = 6-9 cm/sec). Successivamente sono stati sottoposti a terapia con *Ginkgo biloba* (estratto secco: 120 mg; contenuto in bioflavonoidi 24%) per tre settimane. Alla visita di controllo a 20-30 gg, i soggetti sono stati invitati a compilare il medesimo questionario. I dati sono stati quindi inseriti in un data base ed analizzati mediante t test di student per campioni appaiati (SPSS 12).

#### Risultati

Tutti i pazienti hanno completato lo studio. Lo score IIEF-5 preliminare era pari a 7.4 +/- 1.6; dopo trattamento con *Ginkgo biloba* lo stesso score è risultato di 20.8 +/- 1.3 (p=0.00). Alla visita di controllo, a tutti i pazienti è stata somministrata una terapia con inibitori delle fosfodiesterasi 5 (sildenafil e tadalafil) al bisogno; tuttavia 36 di 40 pazienti hanno contemporaneamente proseguito la terapia con ginkgo come adiuvante negli intervalli fra le assunzioni di inibitori PDE-5.

#### Conclusioni

*Ginkgo biloba* può costituire un'utile terapia di supporto al trattamento convenzionale della disfunzione erettile. Come precedentemente descritto nell'ambito di reviews internazionali, l'estratto di ginkgo possiede un'azione rilassante la muscolatura liscia a livello cardiaco, encefalico e penieno, ove sembra aumentare la disponibilità di ossido nitrico. Ulteriori studi sono tuttavia necessari per comprovare l'utilità di questo trattamento, da solo o in combinazione, all'interno di trial clinici prospettici e randomizzati.