



Rapporti

ISTISAN

11/19



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



ISSN 1123-3117

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

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

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

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

ATTI

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

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

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN
11/19**

Istituto Superiore di Sanità

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

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

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

Parole chiave: Prodotti naturali; Farmaci; Alimenti; Interazioni

Istituto Superiore di Sanità

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

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

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

Key words: Natural products; Drugs; Food; Interactions

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

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

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

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

Citare questo documento come segue:

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

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

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2011



FATTORE ANTI-LPS DA *PARIETARIA JUDAICA*

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

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

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

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

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

Introduzione

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

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

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

Caratterizzazione di un peptide in grado di legare LPS batterico

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

Tabella 1. Saggi di determinazione della quantità di endotossina endogena

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

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

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

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

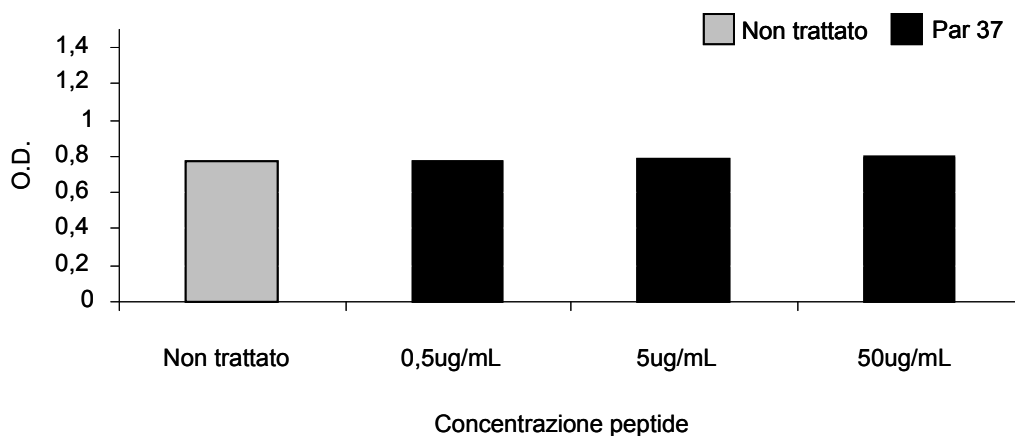


Figura 1. Test di citotossicità con cellule HeLa

Tabella 2. Test di emolisi

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

Conclusioni

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

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

Bibliografia

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