



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

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

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

Introduzione

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

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

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

Metodi

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

Risultati

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

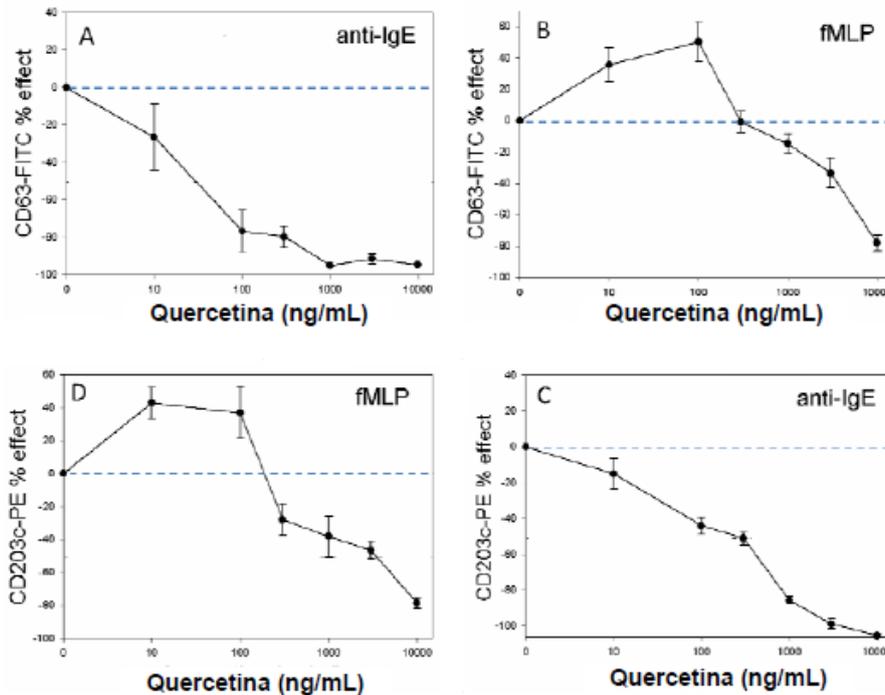


Figura 1. Dose-response di diverse concentrazioni di quercetina espressa come % di effetto sulla espressione dei marcatori CD63 (A e B) e CD203c (C e D) nei due diversi protocolli sperimentali (medie \pm SEM). A e C: effetto su cellule stimulate con anti-IgE (modello "allergico" o "anafilattico"), B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

Discussione

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

Conclusioni

Dato che il contenuto in quercetina nei vegetali citati è dell'ordine del centinaio di µg/g di peso secco il lavoro suggerisce che un possibile ruolo anti-allergico sui granulociti basofili di alcune sostanze naturali potrebbe essere dovuto al loro contenuto in quercetina e mediato dall'attività regolatoria di questo flavonoide sui basofili.

Ringraziamenti

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

Bibliografia

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