

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA  
DI VITERBO**



**DOTTORATO DI RICERCA  
IN GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE**

**XXIII CICLO**

**“Estratto e molecole da foglie di *Aloe arborescens*  
saggiati su cellule di mieloma murino (P3X) e  
cellule umane di leucemia promielocitica (HL60).  
Indagini chimiche e citologiche”**

**Coordinatore:**

Prof. Giorgio Prantera

**Tutor:**

Prof. Antonio Tiezzi

**Dottoranda:**

Dott.ssa Donatella Ceccarelli

<b>INDICE</b>	2
<b>1 INTRODUZIONE</b>	
1.1 La pianta di Aloe	5
1.2 Scopo della tesi	5
	7
<b>CAPITOLO 1</b>	
<b>1 INTRODUZIONE</b>	9
1.1 Composizione chimica e studi farmacologici dell' <i>Aloe arborescens</i>	9
<b>2 MATERIALI E METODI</b>	18
2.1 Preparazione degli estratti di epidermide da foglie di <i>Aloe arborescens</i>	18
2.2 Colture cellulari	18
2.2.1 Congelamento delle cellule	19
2.2.2 Scongelo delle cellule	20
2.3 Conte cellulari	20
2.4 Saggi biologici: trattamenti di cellule di mieloma murino della linea P3X e della linea umana di leucemia promielocitica HL60 con estratti di epidermide di <i>Aloe arborescens</i>	21
2.5 Saggi MTT (bromuro di metil tiazolil difenil tetrazolio)	21
2.6 Analisi Immunofluorescenza	22
2.7 Western blot	23
2.8 Indagini di microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)	24
2.9 Cromatografia su strato sottile degli spot costituenti l'estratto (Thin Layer Chromatography, TLC)	25
2.10 Eluizione e saggi delle frazioni e degli spot	26
2.11 Cromatografia liquida ad alta pressione (ReversePhase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC).	27

2.12 Spettrometria di massa dell'estratto totale di epidermide da foglie di Aloe arborescens	27
2.13 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) dello spot E	28
2.14 Determinazione quantitativa dell'aloenina, della barbaloina e dell' isobarbaloina	29
2.15 Trattamenti con le singole molecole	29
2.16 Trattamenti con le tre molecole in soluzione	30
<b>3 RISULTATI</b>	31
3.1 Somministrazione dell' estratto di epidermide fogliare di Aloe arborescens su cellule delle linee P3X e HL60 e test vitalità cellulare (MTT)	31
3.2 Cromatografia su strato sottile (TLC).	34
3.3 Studi di immunofluorescenza	37
3.4 Microscopia elettronica: SEM e TEM	39
3.4.1 Cellule P3X trattate con estratto di epidermide fogliare di <i>Aloe arborescens</i>	39
3.4.2 Cellule HL60 trattate con estratto di epidermide fogliare di <i>Aloe arborescens</i>	40
3.5 Valutazione dell'espressione della P53	43
3.5.1 Immunofluorescenza	43
3.5.2 Western Blot	43
3.6 Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)	44
3.7 Spettrometria di massa.	45
3.8 Risonanza magnetica nucleare. (NMR)	49
3.9 Quantificazione delle molecole contenute nell'estratto mediante gli standard molecolari	50
3.10 Trattamenti delle P3X e HL60 con aloina a, aloina b e aloenina	50
3.11 Trattamenti delle P3X e HL60 con diverse soluzioni degli standard molecolari	52
<b>4 DISCUSSIONE</b>	56

## **CAPITOLO 2**

<b>1 INTRODUZIONE</b>	63
<b>2 MATERIALI E METODI</b>	63
2.1 Isolamento di cellule resistenti al trattamento prolungato con estratto di epidermide a basse concentrazioni	65
2.2 Attività biologica del mezzo di coltura di cellule di mieloma murino sottoposte a trattamenti prolungati di estratto.	65
2.3 Immunofluorescenza su cellule di mieloma murino (P3X) – Visualizzazione dell' $\alpha$ -tubulina, della glicoproteina P e della p53	66
2.4 Western blot	67
2.5 Microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)	67
2.6 Trattamento cellulare con Vinblastina	67
<b>3 RISULTATI</b>	68
3.1 Curve di crescita di cellule P3X sottoposte a trattamento prolungato	68
3.2 Microscopia elettronica	71
3.2.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	71
3.2.2 Microscopia elettronica a trasmissione	71
3.3 Studi di immunofluorescenza su cellule “resistenti”	74
3.4 Induzione della resistenza nelle cellule di mieloma murino mediante medium delle cellule “resistenti”	76
3.5 Valutazione dell'espressione della Glicoproteina P	77
3.5.1 Immunofluorescenza	78
3.5.2 Western blot	78
3.6 Trattamento cellulare con Vinblastina	80
3.7 Valutazione dell'espressione della P53	81
3.7.1 Immunofluorescenza	81
3.7.2 Western Blot	81
<b>4 DISCUSSIONE</b>	83
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	89

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 La pianta di Aloe

Negli ultimi tempi stiamo assistendo ad un aumento dell'interesse sia scientifico che popolare verso molecole, o più in generale verso principi attivi di origine vegetale, dotate di proprietà medicinali. Il perdurare però di affermazioni generiche e imprecise ha fatto sì che questi principi potenzialmente attivi, in molti casi diventassero un "business" ancor prima di essere seriamente investigati.

In effetti, attualmente, un largo numero di farmaci derivati da piante sono usati dall'uomo in tutto il mondo e recentemente, in vista dei bisogni umani e delle ampie prospettive di marketing, l'attività di ricerca è stata estesa alla scoperta di nuove potenziali molecole vegetali utili per le malattie umane.

Sempre più frequentemente si torna a prendere in considerazione le proprietà terapeutiche di specie vegetali che per tanto tempo hanno accompagnato la storia dell'uomo e che poi sono state ignorate o dimenticate. L'*Aloe arborescens*, annoverata nella lista di piante medicinali redatta dall' Organizzazione Mondiale della Sanità, è da tempo oggetto di



**Fig. 1** Disegno di infiorescenza e foglia di *Aloe arborescens*

interesse e di studio per le molteplici proprietà cosmetiche e medicinali imputabili a composti presenti nelle foglie.

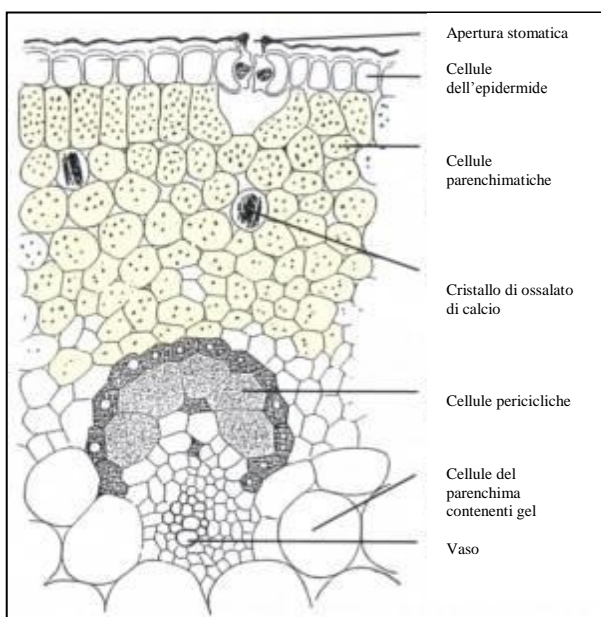
L'Aloe (Fig.1) è una pianta fanerogama angiosperma, appartenente alla classe delle Monocotiledoni. Il genere *Aloe* si colloca nell'ordine delle *Liliales*, famiglia *Liliaceae*. Questa famiglia, comprendente il genere *Aloe*, conta piante succulente, spesso ornitofile, produttrici di resine e sostanze amare.

Si conoscono circa 600 specie di Aloe (Kawai *et al.*, 1993) diffuse in prevalenza nelle regioni calde e desertiche del Sud Africa, in Botswana e nel deserto del Kalahari, in Namibia, ma anche in zone dell'Africa equatoriale.

In Asia sono presenti in: Arabia Saudita, nello Yemen (isola di Socotra), in India, in Cina e Giappone. L'Aloe si è inoltre ben adattata alle regioni più calde dell'Europa del Sud e in America Latina, nonché in Australia e Nuova Zelanda.

Cresce in zone secche e rocciose dai 700 ai 1800 m s.l.m. Il genere Aloe comprende piante perenni dall'andamento erbaceo, arbustivo o arborecente. La pianta di *Aloe arborescens* può avere un fusto ben sviluppato, che in natura può raggiungere anche i 4-9 metri di altezza. Le foglie, lunghe anche fino a mezzo metro, verdi, lanceolate, carnose, dentellate e spinose, sono disposte a rosetta e incurvate verso il basso. Sono rivestite da un'epidermide fortemente cuticularizzata con stomi numerosi su entrambe le superfici, sotto la quale si trovano un parenchima contenente clorofilla, amido, cristalli di ossalato di calcio e le cellule pericicliche che secernono un succo giallo-rossastro.

All'interno, ad occupare quasi i 3/5 dello spessore della foglia, si trova il tessuto parenchimatico capace di immagazzinare acqua, trasformandola in un gel incolore, per far



**Fig 2:** sezione schematica della foglia di *Aloe arborescens*

fronte ai periodi di siccità (Fig.2).

L'Aloe è infatti una pianta xerofita e, tra gli adattamenti al clima arido, presenta la capacità di non perdere acqua né dagli stomi né da eventuali ferite poiché è in grado di produrre una speciale sostanza autosigillante.

L'infiorescenza, di grandi dimensioni, è costituita da fiori a simmetria radiale, pendenti, actinomorfi, con ovario supero e tepali saldati, riuniti in racemi o spighe rilevate e dai colori vistosi: dal bianco verdastro al rosso, passando per il giallo e l'arancio. I fiori sono ornitofili e pertanto

privi di profumo, ma contengono grandi quantità di nettare. Il frutto è una capsula a tre logge contenente numerosi semi nerastri e appiattiti (Maugini, 1994; Strasburger, 1995; Capasso *et al.*, 1998).

Le specie più conosciute e studiate per l'uso medicinale sono: *Aloe barbadensis* Miller o *Aloe vera* Linnè, *Aloe socotrina*, *Aloe africana*, *Aloe saponaria* Miller, *Aloe ferox*, *Aloe arborescens* Miller.

## 1.2 Scopo della Tesi

In tempi recenti la pianta di Aloe ha trovato largo impiego in prodotti farmaceutici, parafarmaceutici e cosmetici. Numerosi sono i messaggi in larga parte pubblicitari relativi ai suoi prodigiosi effetti curativi per le malattie più disparate.

Nel nostro Paese negli anni passati la pianta ha trovato anche ampio utilizzo come cura di tipo popolare contro i tumori e del suo utilizzo se ne sono interessati in maniera ampia i mezzi di comunicazione.

Cercando di contribuire ad ampliare le conoscenze scientifiche riguardo la pianta di *Aloe arborescens*, questa Tesi di Dottorato si proponeva di individuare composti chimici presenti nella pianta dotati di attività citotossica e che potessero avere un potenziale interesse per lo sviluppo di farmaci antitumorali. Rappresentava, allo stesso tempo, anche un tentativo per passare da una conoscenza empirica ad una conoscenza supportata da reali dati scientifici.

Dopo un preliminare studio bibliografico, l'attività di ricerca si è basata su saggi biologici effettuati *in vitro* e si è avvalsa della collaborazione con gruppi di ricerca in grado di investigare la struttura molecolare di composti dotati di attività biologica. La valutazione dell'effetto dell'estratto di *Aloe arborescens* è avvenuta su modelli cellulari costituiti da cellule di mieloma murino della linea P3X e cellule di leucemia promielocitica umana della linea HL60.

Al fine di evidenziare eventuali effetti antiproliferativi o citotossici, inizialmente sono stati effettuati saggi biologici costituiti da test MTT e relative curve di crescita in seguito a trattamento con estratto di Aloe. Successivamente sono state applicate alcune tecniche di microscopia che permettessero di indagare anche a livello citologico cellule trattate con estratto, con tecniche di immunofluorescenza e microscopia elettronica, sia a scansione (SEM) e trasmissione (TEM).

Dopo averne così constatato l'attività biologica, hanno quindi avuto inizio una serie di ulteriori analisi chimiche effettuate mediante tecniche di TLC, RP-HPLC, NMR e LC-MASSA, atte alla caratterizzazione delle molecole biologicamente attive presenti nell'estratto di foglie di *Aloe arborescens*.

Successivamente sono stati effettuati saggi biologici di Aloenina, Isobarbaloina e Barbaloina, molecole individuate come facenti parte dell'estratto e reperite in commercio. L'intento di questi esperimenti era quello di svincolarsi per intero dalla pianta poiché l'effetto antiproliferativo di essa varia nel corso delle sue diverse fase fenologiche e nei diversi periodi dell'anno, utilizzando standard molecolari che permettessero di ricostituire *in vitro* l'effetto biologico dell'estratto e di effettuare studi biologici standardizzati e riproducibili.

La ripetizione degli esperimenti e le osservazioni delle percentuali di cellule morte a seguito del trattamento con gli estratti e/o con le soluzioni delle molecole individuate come potenzialmente costituenti un fitocomplesso biologicamente attivo ha fatto sì che l'attenzione si volgesse non solo alle cellule di mieloma che subivano gli effetti dell'estratto o del fitocomplesso, ma anche a quelle che ne rimanevano apparentemente immuni. Su tali cellule, definite come "resistenti", sono state condotte analisi di immunofluorescenza, microscopia elettronica e analisi di western blot per valutare come queste cellule si adattavano allo stress apportato.

Inoltre sono stati poi effettuati studi per valutare se le cellule "resistenti" potevano rilasciare qualche molecola-segnaie nel medium di coltura capace di indurre il fenotipo di resistenza anche in cellule mai sottoposte al trattamento con l'estratto epidermico fogliare di Aloe. La nuova tipologia di cellule che questi studi hanno portato ad identificare è stata denominata "cellule indotte" e potrebbe contribuire ad aprire nuove ricerche per studi riguardo le modalità molecolari di acquisizione di resistenza a farmaci da parte di cellule tumorali.

Tutti gli esperimenti effettuati durante questa Tesi di Dottorato sono stati condotti su semplici modelli cellulari e necessiteranno di ulteriori e più approfondite ricerche *in vitro* ed *in vivo*.

# CAPITOLO 1

## 1 INTRODUZIONE

### 1.1 Composizione chimica e studi farmacologici sulla pianta di *Aloe arborescens*

Fin dall'antichità le piante di Aloe, principalmente *Aloe barbadensis* Miller e *Aloe arborescens*, sono state utilizzate nella medicina tradizionale per le loro proprietà e per gli usi farmaceutici e cosmetici (Crosswhite et al., 1984).

Attualmente è stato ben dimostrato che i composti di foglie di aloe hanno differenti proprietà terapeutiche e, di conseguenza, sembrano essere buoni candidati per possibili applicazioni farmaceutiche. Infatti negli ultimi anni la pianta di Aloe è stata studiata, anche in base ai potenziali interessi per le aziende farmaceutiche, al fine di caratterizzare i loro componenti chimici e per valutare il loro possibile ruolo terapeutico (Sato et al., 1990).

Molti autori ritengono che le varie attività biologiche attribuite alla pianta di Aloe sono da correlare ad una azione sinergica di diversi composti piuttosto che una singola sostanza chimica (Hamman 2008; Dagne et al., 2000). Alcuni di questi possono essere persi durante le fasi di purificazione per arrivare ai corrispondenti prodotti commercializzati e questo spiega perché questi ultimi, molto spesso, non abbiano un effetto confrontabile con quello dell'estratto *in toto* (Beppu et al., 2003).

È noto inoltre che le proprietà fisico-chimiche e l'attività dei prodotti naturali dipendono dalla specie della pianta, dal tipo di estratto, dalle procedure utilizzate e dalle condizioni di stoccaggio (Fanali et al., 2010; Pellizzoni et al., 2011). Inoltre, età e condizioni di crescita (condizioni ambientali e in particolare la diversa esposizione alla luce), incidono in modo significativo sulla biosintesi di metaboliti secondari ed infatti la concentrazione dei metaboliti dell'Aloe e l'ultrastruttura delle cellule sono diverse tra piante cresciute sotto luce di diversa irradiazione (Peaz et al., 2000; Jing et al., 2006).

La foglia di Aloe può essere divisa in due frazioni principali, vale a dire la scorza esterna verde e il parenchima interno incolore. L'epidermide è ricca di derivati dell'1,8-dihydroxyanthraquinone e loro glicosidi, mentre nel gel interno della foglia sembra essere più ricco in carboidrati complessi (Hamman, 2008). Attualmente l'utilizzo farmacologico

dell'Aloe è finalizzato principalmente all'ottenimento di due prodotti distinti per la loro composizione chimica e per le loro proprietà terapeutiche: a) il succo, amaro e giallastro, è particolarmente ricco in antrachinoni che sono stati segnalati per avere effetti catartici, effetti anti-infiammatori, per aumentare i movimenti peristaltici della muscolatura intestinale e impediscono anche al colon di riassorbire l'acqua (Gutterman et al., 2006; McAnalley, 1993) e b) il gel, incolore, ricco di polisaccaridi ed enzimi, utilizzato per il trattamento di patologie cutanee (ustioni, ferite, psoriasi) e per il confezionamento di cosmetici grazie alle sue proprietà emollienti (Danhof, 1987; Mc Keown, 1987). Questi due prodotti sono ottenuti da due differenti tessuti specializzati della foglia: il succo dalle cellule pericicliche, il gel dalle cellule del parenchima (Capasso et al., 1998). Dal punto di vista della composizione chimica l'Aloe risulta piuttosto complessa in quanto contiene molti composti diversi.

I polisaccaridi presenti sono costituiti prevalentemente da lunghe catene di D-glucosio e D-mannosio, ma si trovano anche tracce di arabinosio, galattosio e xilosio (Gowda et al., 1979; Waller et al., 1978; Femenia et al., 1999).

Data la loro consistenza filamentosa si prestano a rivestire la parete dello stomaco e dell'intestino, svolgendo un effetto gastroprotettore (mucopolisaccaridi) (Franz, 1989; Reynolds et al., 1999) e potenziando la capacità di assorbimento delle sostanze nutritive e di espulsione delle tossine (Grindlay et al., 1986; Shelton, 1991). Influenzano inoltre il sistema immunitario dell'uomo aumentandone le difese contro microrganismi patogeni (McAnalley, 1993; Hegggers et al., 1995). Un altro settore di ricerca ha avuto come oggetto le proprietà immunostimolanti dell'Aloe, imputabili soprattutto a due composti: l'aloctina A e l'acemannano.

L'acemannano è il mucopolisaccaride più attivo ed importante tra quelli presenti nell'Aloe, in grado di esplicare un'attività germicida, battericida e antifungina (Mandal *et al.*, 1980; Grindlay et al., 1986; Klein et al., 1988; T'Hart et al., 1989; Shelton, 1991; McAnalley, 1993; Reynolds et al., 1999). Accertatene le proprietà immunostimolanti dell'acemannano ne è stato anche ipotizzato l'impiego come antitumorale, sulla base della teoria della sorveglianza immunitaria (Harris et al., 1991).

Si è infatti osservato che una somministrazione intraperitoneale di acemannano in topi a cui erano stati impiantati dei sarcomi (Yagi et al., 1997), stimolava i macrofagi a produrre monochine, tra cui interleuchina-1. Ciò provoca un inizio dell'attacco immunitario e una conseguente regressione del tumore (Peng et al., 1991). L'acemannano probabilmente è la molecola più conosciuta tra i polisaccaridi che appartengono alla frazione contenente sia

composti con struttura ad unica catena di  $\beta$  (1-4) mannani e beta (1-4) glucomanani con ramificazione  $\alpha$  (1-6) (Jones 2008; Hamman, 2008; Reynolds 1985;. Boudreao et al., 2006).

Un polisaccaride estratto dal gel di Aloe (APS) si è rivelato efficace nell'inibire la formazione di addotti B[a]P-DNA e di 8-idrossideossiguanosina (8-OH-dG) in epatociti di topo *in vitro* e *in vivo*, nel ridurre la formazione di radicali liberi in cellule HL-60, nell'aumentare l'attività della GST, interferendo con l'assorbimento del B[a]P (benzopirene) a livello cellulare, nel ridurre l'attività dell'ornitina decarbossilasi in cellule Balb/3T3 e della tiroxina chinasi in cellule leucemiche umane HL60. Inoltre ha significativamente ridotto il danno ossidativo del DNA causato da anioni superossido. Tale polisaccaride potrebbe pertanto essere considerato un potente agente chemopreventivo del cancro (Hyung et al., 1999; Kim et al., 1997; Kim et al., 1999).

Sono presenti inoltre sostanze nutritive di vario tipo, come vitamine, sali minerali, aminoacidi, acidi organici, fosfolipidi, enzimi, saponine e lignine (Femenia et al., 1999).

Tra le vitamine idrosolubili presenti nell'Aloe si distinguono quelle del gruppo B (B1,B2,B3, B6, B12) e la vitamina C; tra quelle liposolubili la A, la D e la E (MacKay et al., 2003).

L'Aloe contiene inoltre molti tipi di sali minerali, tutti essenziali per l'organismo umano: ferro, cromo, calcio, fosforo, magnesio, manganese, potassio, rame, sodio, zinco (Waller *et al.*, 1978). Nell'Aloe sono poi presenti, gli aminoacidi fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina e valina considerati essenziali per l'uomo. Tra quelli non essenziali troviamo acido aspartico, acido glutammico, alanina, L-arginina (particolarmente abbondante), glicina, glutamina, idrossiprolina, istidina, prolina e serina nonché cisteina e tiroxina considerati semi-essenziali (Gjerstad, 1971; Waller et al., 1978).

Si ritrovano infine numerosi enzimi tra cui lipasi e proteasi che intervengono, rispettivamente, nella digestione dei grassi e delle proteine e una bradichinasi ad azione carbossipeptidasica in grado di interferire con i processi di infiammazione dei tessuti (Fujita et al., 1976; Yagi et al., 1982).

Dal punto di vista chimico particolarmente abbondanti sono anche i triterpenoidi, primo tra tutti il lupeolo, capaci di ridurre notevolmente il dolore e gli steroli comprendenti colesterolo, campsterolo e  $\beta$ -sitosterolo (Yamamoto et al., 1986; Yamamoto et al., 1991) che, insieme a composti quali l'acido salicilico (Shelton, 1991), svolgono una valida azione antinfiammatoria e antisettica (Ando et al., 1990; Davis et al., 1994; Reynolds et al., 1999). Una vasta area di ricerca riguarda la capacità antinfiammatoria dell'Aloe dovuta

essenzialmente a composti presenti nel gel, primi tra tutti aloctina A e aloctina B (Fujita et al., 1976; Fujita et al., 1997). Questa attività antinfiammatoria è legata anche ad un C-glucosil cromone che sembra inibire la produzione di prostaglandina E-2 a partire dall'acido arachidonico (Penneys, 1982; Davis et al., 1989; Hutter et al., 1996; Vasquez et al., 1996; Langmead et al., 2004), ma può essere imputata anche all'inibizione della formazione di istamina da parte della istidina-decarbossilasi ad opera del magnesio lattato (Klein et al., 1988; Reynolds et al., 1999).

Estratti da varie specie di Aloe si sono inoltre rivelati efficaci nell'inibire l'attività della cicloossigenasi, uno degli enzimi chiave nella biosintesi delle prostaglandine implicate nelle reazioni infiammatorie (Lindsey et al., 2002; Yagi et al., 2003). Si ritiene pertanto che l'effetto antinfiammatorio possa dipendere dall'azione sinergica di diversi componenti dell'Aloe (Langmead et al., 2004).

L'aloè è ampiamente utilizzata dalle industrie nel settore alimentare e farmaceutico a causa delle sue funzioni biologiche ad attività antinfiammatoria (Speranza et al., 2005), l'accelerazione del processo di guarigione (Takzare et al., 2009), e l'effetto protettivo contro le lesioni al fegato (Arosio et al., 2000).

Alcune ricerche si sono focalizzate sulla capacità dell'Aloe di favorire la cicatrizzazione delle ferite: essa è in grado di velocizzare questo processo, senza mostrare alcun tipo di effetto tossico (Davis et al., 1989; Heggers et al., 1996). L'*Aloe vera* aumenta il turnover del collagene nel tessuto leso favorendo quindi la rimarginazione delle ferite, grazie anche ad un incremento dei livelli di acido ialuronico e dermatan solfato che formano una matrice provvisoria durante la fase iniziale del processo di guarigione di una ferita (Chithra et al., 1998). Per le stesse ragioni l'Aloe è ampiamente utilizzata come terapia per le ustioni (Reynolds et al., 1999).

L'uso dell'Aloe si è rivelato efficace anche nel trattamento di malattie della pelle come la psoriasi (Hormann et al., 1994; Syed et al., 1996) e come agente protettivo nei confronti dell'esposizione ai raggi UV (Lee et al., 1997) e ai raggi X (Sato et al., 1990). È stato inoltre dimostrato come l'estratto di Aloe prevenga la fotosoppressione delle cellule dell'ipersensibilità ritardata riducendo i livelli di citochine immunosoppressive nell'epidermide murina irradiata con UV (Byeon et al., 1998; Strickland et al., 1999).

Particolarmente studiata è anche l'attività antivirale dell'Aloe. L'aloè-emodina, un idrossiantrachinone presente nelle foglie di *Aloe vera*, è stata testata sul virus dell'*herpes simplex* (HSV) di tipo 1 e 2, sul virus della varicella-zoster, sul virus dell'influenza, su

adhenovirus e rhinovirus e si è dimostrata in grado di inattivare tutti i virus saggiati ad eccezione degli adhenovirus e rhinovirus (Pecere et al., 2000).

Questi dati sono un'ulteriore conferma di precedenti indagini condotte al microscopio elettronico che mostravano una parziale distruzione dell'involucro virale in HSV trattati con l'antrachinone (Sydiski et al., 1991). Si è inoltre indagato sul possibile utilizzo dell'estratto di Aloe come terapia per l'AIDS (McDaniel et al., 1987a,b,c), in sinergia con altri agenti antivirali tipo l'azidotimidina (AZT) (Kahlon et al., 1991b).

E' stata valutata anche la possibilità di un impiego dell'Aloe come antiossidante da aggiungere a cibi e bevande. Esperimenti condotti su cellule di isole pancreatiche di ratto esposte a streptozocina (Sz), alloxan (Ax) e ad un sistema ipoxantina-xantina ossidasi (HX-XO) hanno dimostrato che l'*Aloe arborescens* ha un effetto di scavenger di radicali ossigeno imputabile probabilmente ad un'azione sinergica di composti fenolici termostabili quali barbaloina, isobarbaloina, 2'-O-*p*-cumaroilaloesina, 2'-O-feruloilaloesina e aloenina (Beppu et al., 1993; Malterud et al., 1993; Sabeih et al., 1996; Beppu et al., 2003) .

Tra le applicazioni più tradizionali dell'Aloe va ricordato il suo utilizzo come lassativo, legato ai composti antrachinonici contenuti per lo più nella cuticola esterna della foglia tra i quali l'aloemodina (Okamura et al., 1996; Park et al., 1998), la barbaloina e l'isobarbaloina (Ishii et al., 1998).

Gli antrachinoni sono una classe di composti fenolici secondari che caratterizza, tra le Monocotiledoni, la classe delle Liliaceae e in particolare il genere Aloe (Van den Berg et al., 1989; Izhaki, 2002). Sono metaboliti secondari fenolici C-glucosil derivati cioè composti in cui uno zucchero è legato all'aglicone con un legame diretto C-C, come la barbaloina (10-glucopiranosil-1,8-diidrossi-3-idrossimetil-9-10H-antracene), una miscela dei due diastereoisomeri aloina A e B, così come composti glucosio-free come aloeresina, aloenina e aloemodina (1,8-diidrossi-3-(idrossimetil)-9,10-antracendione) (Fanali et al., 2010) acido aloetico, acido cinnamico, acido crisofanico, aloenina (Groom et al., 1986; Kuzuya et al., 2001; Rebecca et al., 2003).

Gli antrachinoni sono localizzati in maniera massiccia nel tronco della pianta di aloe e nello strato cuticolare esterno della foglia, ma il loro contenuto è soggetto a variazioni correlate con i cambiamenti fenologici e stagionali in quanto sono parte integrante del metabolismo della pianta (Okamura et al., 1996; Chauser-Volfson et al., 1996; Gutterman et al., 2000; Kuzuya et al., 2001).

I metaboliti secondari fenolici come barbaloina e isobarbaloina (aloina A e B), aloeresina e aloenina distribuiti nelle foglie di *Aloe arborescens* hanno come compito quello di

difendere la pianta. La parte terminale della foglia sembra avere il contenuto più alto di metaboliti mentre la base quello più basso, la stessa cosa per il margine (la parte più esterna della foglia) che ha il contenuto più alto e la parte centrale quello più basso. L'orientamento della foglia può accentuare il contenuto totale di queste tre composti fenolici ma non le loro quantità relative nelle differenti parti delle foglie. Spesso le parti della pianta che risultano danneggiate dal consumo di animali come elefanti, kudu o insetti, presentano un incremento dei loro metaboliti fenolici. Questo aumento può ridurre o evitare ulteriori consumi quando il contenuto dei metaboliti raggiunge un certo livello (Gutterman et al., 2000).

Inoltre le variazioni mensili delle concentrazioni di barbaloina, isobarbaloina, aloenina, proteine, monosaccaridi, poliammine, e le variazioni nell'attività dell'*Aloe arborescens* Miller var. *Natalensis* Berger (nome giapponese Aloe Kidachi) sono state studiate e correlate con la temperatura e le precipitazioni. La concentrazione globale o l'attività dei componenti è risultata elevata nella stagione calda e bassa nella stagione fredda, e le concentrazioni di questi componenti sono state fortemente influenzate dalla quantità delle piogge (Beppu, 2004).

Quando assunti questi composti vengono stabilizzati chimicamente dal pH acido dello stomaco (pH 1-3) e la loro porzione glucidica ne impedisce l'assorbimento nella parte più alta del tratto gastrointestinale (Breimer et al., 1976; Izhaki, 2002). Essi favoriscono l'idratazione della massa fecale (Yagi et al., 1997), poiché inducono la secrezione di fluidi ed elettroliti nel lume intestinale inibendo l'attività della pompa Na-K-ATPasi presente sulle cellule epiteliali dell'intestino (Ishii et al., 1990) e aumentano la permeabilità della mucosa intestinale (Izhaki, 2002), sono in grado di regolare l'attività dell'intestino agendo direttamente sulla peristalsi e svolgendo così un'azione lassativa (Breimer et al., 1976). Stimolano inoltre la contrazione della muscolatura liscia dell'intestino attraverso il rilascio di sostanze ad azione endocrina (Capasso et al., 1998). In realtà la barbaloina non ha di per sé un effetto lassativo poiché questa proprietà biologica viene acquisita a seguito dell'attività del batterio anaerobio della flora intestinale *Eubacterium sp. BAR* che nel colon la idrolizza alla sua forma attiva, l'aloemodina-9-antrone (Akao et al., 1996).

Piante contenenti aloina A (barbaloina), aloemodina e antrachinoni sono state a lungo usate come medicine tradizionali e nella formulazione di prodotti come lassativi e integratori (Wamer et al., 2003) ed è suggerito che l'aumento del contenuto di acqua è un fattore più importante della stimolazione della peristalsi indotta da barbaloina (Ishii, et al., 1994)

Uno studio ha messo in evidenza che anche le potenzialità anti-fungine dell'estratto di Aloe sono imputabili probabilmente a composti di basso peso molecolare, compresa la barbaloina (Kawai et al., 1998)

La barbaloina inoltre sembra stabilizzare le strutture lamellari, promuovere la formazione di strutture intermedie e ha mostrato una specificità per i due principali fosfolipidi presenti nelle membrane batteriche, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerolo. Al fine di collegare i loro forti effetti sulle membrane alla loro attività biologica, è stata testata la capacità di questi composti di inibire l'infettività del rhabdovirus, che provoca la setticemia emorragica virale (VHS), un virus RNA negativo avvolto, o la crescita di *Escherichia coli* mediante l'uso di liposomi caricati con l'antrachinone (Alves et al., 2004).

L'aloè e gli antrachinoni sembrano avere forti effetti anti-infiammatori in macrofagi murini (Park et al., 2009a). Inoltre la supplementazione dietetica di componenti dell'aloè migliora le risposte infiammatorie intestinali nella colite ulcerosa DSS-indotta in un modello di ratto e in particolare l'aloèsina è risultata essere il più potente inibitore dell'infiammazione (Park, et al., 2011).

Un campo di applicazione particolarmente interessante è rappresentato dall'utilizzo dell'Aloè come chemopreventivo e come antitumorale. È stato riscontrato che una dieta a base di questa pianta possa prevenire la carcinogenesi nell'uomo e negli animali (Sakai, 1989; Tsuda et al., 1993).

Antrachinoni dell'Aloè sono stati ampiamente studiati con l'obiettivo di sviluppare nuovi farmaci antitumorali caratterizzati da un'elevata selettività del target e bassa tossicità per il trattamento di molti tumori. Infatti antrachinoni come aloina A e B, nonché l'aloèmodina, sono strutturalmente simili ai farmaci di legame del DNA come le antracicline. Diversi meccanismi sono stati proposti per quanto riguarda l'effetto antitumorale dell'Aloè, compresa l'induzione di apoptosi (Lee et al., 2001) e un aumento degli enzimi antiossidanti chiave quali SOD e GPX (El-Shemy et al., 2010).

È stato poi dimostrato che l'aloèmodina, nota per le sue proprietà lassative, ha anche un'attività antitumorale *in vitro* e *in vivo*. Tale molecola presenta una specificità d'azione contro tumori neuroectodermali, forme aggressive di cancro che colpiscono in modo particolare i bambini. Essa si accumula solamente all'interno delle cellule tumorali e ne induce la morte per apoptosi, mentre non compare nelle cellule sane degli altri tessuti, come le cellule del sangue e i fibroblasti, solitamente danneggiate dalla chemioterapia classica. I tumori trattati non solo non crescono di volume, ma mostrano una regressione (Pecere et al., 2000). Un altro studio ha messo in evidenza che l'aloèmodina è in grado di

inibire la proliferazione cellulare e di indurre apoptosi in due diverse linee di tumori epatici umani (Hep G2 e Hep 3B), seppure con meccanismi intracellulari diversi (Kuo et al., 2002).

Studi dimostrano che antrachinoni e diidrossiantrachinoni posseggono attività antimicrobica (Wu et al., 2006) e altri l'effetto antimicrobico dell'aloemodina su arilammina N-acetil transferasi in *Helicobacter pylori* (Wang et al., 1998). Antrachinoni hanno mostrato attività antimicrobica anche contro i ceppi di *Staphylococcus aureus* e contro *Escherichia coli*, probabilmente attraverso l'inibizione del trasporto dei soluti nelle membrane (Hamman, 2008;. Lone et al., 2009)

Aloina, aloemodina e aloesina purificato da *Aloe barbadensis* sono stati testati contro la leucemia mieloide acuta (AML) e la leucemia linfocitica acuta (ALL). I metaboliti secondari dell'Aloe hanno mostrato una significativa citotossicità dose-dipendente. E' stato anche osservato che il trattamento di cellule leucemiche AML con tali composti ha portato a una diversa frammentazione del DNA internucleosomale, caratteristica di cellule in fase di apoptosi. L'Aloemodina è risultato essere il composto più attivo, seguito da aloesina e aloina. (El-Shemy et al., 2010).

La somministrazione per via orale di estratto di *Aloe arborescens* riduce lo sviluppo di adenocarcinomi pancreatici indotti da N-Nitrosobis(2-oxopropil)amina (BOP) in hamster siriani, come conferma anche la diminuzione, in queste cellule, dei livelli di O<sup>6</sup>-metildeossiguanosina (O<sup>6</sup>-medG): l'alchilazione del DNA è infatti considerata uno degli eventi associati alle fasi iniziali dell'induzione delle lesioni neoplastiche (Furukawa et al., 2002).

L'*Aloe arborescens* inibisce inoltre lo sviluppo di lesioni preneoplastiche indotte da dietilnitrosamina nel fegato di ratti (Tsuda et al., 1993) e di carcinomi duodenali indotti da N-etil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina in topi (Chihara et al., 2000).

La somministrazione di estratti di *Aloe arborescens* a topi trattati con 12-O-tetradecanoilforbol-acetato (TPA) riduce la formazione di edemi e inibisce l'attività della ornitina decarbossilasi (ODC), un enzima che catalizza la sintesi di putrescina da ornitina e che è uno degli elementi chiave nel processo biochimico di insorgenza dei tumori della pelle. Gli estratti diminuiscono, inoltre, sensibilmente il numero di tumori indotti per trattamento combinato con 7,12-dimetilbenz[a]antracene (DMBA) e TPA (Shimpo et al., 2002).

L'effetto chemopreventivo dell'estratto di Aloe può essere imputato a composti che sono in grado di interagire con enzimi coinvolti nel processamento degli xenobiotici: potrebbe

inibire alcuni enzimi della fase I, deputati all'attivazione degli xenobiotici o attivare gli enzimi delle reazioni di detossificazione (enzimi della fase II) determinando così una riduzione della formazione di addotti del DNA (Kim et al., 1997; Kim et al., 1999; Shimpo et al., 2001; Furukawa et al., 2002). Gli enzimi del metabolismo degli xenobiotici appartengono infatti a due famiglie: gli enzimi della fase I (citocromo P450), deputati all'attivazione di composti, generalmente attraverso reazioni di ossidazione o riduzione e quelli della fase II, che coniugano i prodotti funzionalizzati a composti endogeni tipo glutatione, acido glucuronico etc. Sebbene il loro ruolo principale sia quello di detossificare gli xenobiotici, molti citocromi P450 possono attivare dei procarcinogeni a forme altamente reattive (Shimpo et al., 2001). E' noto che l'Aloe contiene una varietà di antiossidanti dei quali è stata dimostrata un'influenza sul metabolismo dei cancerogeni. La somministrazione orale di *Aloe arborescens* diminuisce sensibilmente la formazione di lesioni preneoplastiche (ACF) indotta da azoximetano (AOM) nei ratti, inducendo un aumento dei livelli di attività dell'enzima chinone-reduttasi (QR), un enzima della fase II presente nel fegato e responsabile della regolazione coordinata di altri importanti enzimi della fase II come la glutatione-S-trasferasi (GST) (Shimpo et al., 2001). Come già accennato, l'estratto di *Aloe arborescens* provoca negli epatociti di ratto una significativa riduzione dei livelli di CYP1A2, un enzima della famiglia del citocromo P450 responsabile dell'attivazione a cancerogeno della IQ (2-amino-3-metilimidazo(4,5-f)chinolina) e mostra una tendenza a ridurre la formazione di addotti IQ-DNA (Uehara et al., 1996).

Tale attività appare correlata a composti fenolici quali aloenina, barbaloina e isobarbaloina (questi ultimi conosciuti anche come, rispettivamente, aloina A e B), che sono tra i maggiori costituenti dell'*Aloe arborescens* (Kuzuya et al., 2001; Shimpo et al., 2001; Shimpo et al., 2002). L'attività antitumorale dell'Aloe potrebbe dipendere anche da un aumento dell'immunità tumore-specifica (Yoshimoto et al., 1987).

## **2 MATERIALI E METODI**

### **2.1 Preparazione degli estratti di epidermide da foglie di *Aloe arborescens***

Per gli esperimenti riportati in questa Tesi sono state utilizzate piante di *Aloe arborescens* di 3 anni acquistate presso il vivaio Michelini di Viterbo.

Per la preparazione dell'estratto di epidermide si è effettuata una prima separazione meccanica dei due tessuti: l'epidermide, di colore verde intenso, che riveste per intero la foglia e un tessuto lacunoso, traslucido e incolore che costituisce il "gel" localizzato nella parte interna della foglia. L'epidermide fogliare è stata rimossa per mezzo di un bisturi, eliminando così il gel, successivamente è stata lavata con acqua distillata, asciugata e infine pesata.

E' stato aggiunto un volume di etanolo equivalente al peso del tessuto di epidermide e si è proceduto ad omogeneizzarla, lasciandola poi in estrazione per circa 30 minuti al buio. Il liquido risultante, di colore verde intenso, è stato centrifugato per 5 minuti a 2500 rpm a temperatura ambiente e successivamente è stato completamente portato a secco per mezzo di un flusso di azoto gassoso. L'estratto disidratato così ottenuto è stato conservato a -20°C, coperto da carta stagnola per limitare eventuali alterazioni dovute alla luce.

### **2.2 Colture cellulari**

L'estratto è stato saggiato su modelli cellulari di mammifero.

Uno dei modelli cellulari scelti per valutare gli effetti degli estratti di *Aloe arborescens* è costituito da cellule di mieloma di topo della linea cellulare P3X63-Ag8.653. Si tratta di un mieloma non secernente, che ha perso cioè la capacità di produrre sia le catene pesanti che quelle leggere delle immunoglobuline, sub clone della linea P3X63-Ag8 (Hay *et al.*, 1988). Le cellule appartenenti a questa linea presentano una morfologia linfoblastoide e crescono in sospensione in terreno di coltura Dulbecco's Modification of Minimum Essential

Medium (DMEM) complementato con siero fetale bovino (FBS) al 10% e glutammina 2Mm.

Un'altra linea cellulare utilizzata per i saggi biologici è quella delle HL-60, cellule umane di leucemia promielocitica. Queste cellule crescono in sospensione in terreno RPMI 1640,80%, complementato con siero fetale bovino 20% e glutammina 2 mM . Mancano di specifici marcatori per cellule linfoidei ma esprimono recettori di superficie per il frammento e il complemento Fc (Gallagher *et al*, 1979). Manifestano un'attività di fagocitosi e di risposta a stimoli chemiotattici. Possono anche formare colonie in mezzi semi-solidi e producono tumori sottocutanei in topi nudi.

Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C e in un'atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub> al 5%.

Il terreno contiene normalmente anche rosso fenolo, un indicatore visivo di pH che ha un colore rosso a pH 7.3, vira al giallo a pH acido, al rosso-viola a pH alcalino. Con il proliferare delle cellule il colore del terreno tende al giallo a causa dell'acidificazione provocata dai cataboliti prodotti dal metabolismo cellulare ed è perciò importante sostituire spesso il terreno "esausto" con terreno fresco (De Filippi e Tarone, 1993).

Tutti i passaggi inerenti le cellule sono stati effettuati utilizzando una cappa sterile Biohazard a flusso laminare verticale (Gelaire mod.BSB 3-S), con l'ausilio di piastre, provette (Falcon) e punte sterili.

### **2.2.1 Congelamento delle cellule**

La soluzione di conservazione per il congelamento delle cellule è stata preparata con siero fetale bovino (FBS) e dimetilsolfossido (DMSO) in proporzione 10:1. L'FBS è stato prima scomplementato ad una temperatura di 56°C per 30 minuti all'interno di un bagnetto termico e filtrato in condizioni sterili.

Successivamente è stato aggiunto il dimetilsolfossido (DMSO). Le cellule da congelare sono state prelevate dai pozzetti e centrifugate per 10 minuti a temperatura ambiente a 1.500 rpm in provette sterili. Il sopranatante è stato sostituito con la soluzione di FBS e DMSO e il tutto è stato trasferito in criotubi (Nalgene) conservati poi in congelatore ad una temperatura di -80°C.

Alcuni criotubi sono stati invece trasferiti in azoto liquido, dove le cellule possono essere conservate per tempi estremamente lunghi.

### **2.2.2 Scongelamento delle cellule**

I criotubi sono stati prelevati dal congelatore e, da una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ , sono stati posti in un bagnetto termico a  $37^{\circ}\text{C}$ , in modo che lo scongelamento avvenisse in 2-3 minuti. Poi sono stati aggiunti, lentamente, nel tempo di un minuto,  $100\ \mu\text{l}$  di DMEM a  $37^{\circ}\text{C}$ ; quindi sono stati aggiunti altri  $200\ \mu\text{l}$  nel minuto successivo, poi  $400\ \mu\text{l}$ ,  $800\ \mu\text{l}$ ,  $1.600\ \mu\text{l}$ ,  $3.200\ \mu\text{l}$ : il tutto in circa 6 minuti. Si è proceduto poi a centrifugare a  $1.000\ \text{rpm}$  per 5 minuti. Dopo aver aspirato il soprannatante, è stato aggiunto un volume di terreno fresco adeguato alla quantità di cellule sedimentate.

### **2.3 Conte cellulari**

Per seminare un numero preciso di cellule in pozzetti o in fiasche si è utilizzato il sistema della conta cellulare impiegando la camera contaglobuli di Thoma-Zeiss costituita da un vetrino suddiviso in 4 aree, ciascuna contenente 16 quadratini. Il lato di un quadratino è di  $1/20\ \text{mm}$ , quindi la sua area è  $1/400\ \text{mm}^2$ ; la distanza tra il vetrino e il coprioggetto è di  $100\ \mu\text{m}$ , perciò il volume di un quadratino è di  $1/4000\ \text{mm}^3$ .

Per valutare la presenza di cellule morte è stato utilizzato il test di vitalità a base di una soluzione allo 0,4% di Trypan Blue, colorante che penetra solo nelle cellule che hanno perso l'integrità di membrana e che sono, perciò, morte.

Dopo averne risospeso accuratamente il contenuto, da ogni pozzetto sono stati prelevati  $10\ \mu\text{l}$  di sospensione cellulare; a questi sono stati aggiunti  $10\ \mu\text{l}$  della soluzione di Trypan Blue e si è proceduto ad effettuare la conta per mezzo della camera di Thoma-Zeiss e di un microscopio ottico invertito. Il numero di cellule/ml è stato ottenuto applicando la seguente formula:

$$n^{\circ} \text{ totale di cellule} = n^{\circ} \text{ medio di cellule} \times 10.000 \times D \times V$$

dove:

- $n^{\circ}$  medio di cellule =  $n^{\circ}$  di cellule per area /  $n^{\circ}$  di quadratini per area
- D = fattore di diluizione (1:2)
- V = volume di sospensione (1ml)
- 10.000 = fattore correlato alla struttura della camera conta globuli utilizzata

#### **2.4 Saggi biologici: trattamenti di cellule di mieloma murino della linea P3X e della linea umana di leucemia promielocitica HL60 con estratti di epidermide di *Aloe arborescens***

Cellule delle linee P3X e HL60 sono state trattate con estratto di epidermide di *Aloe arborescens*. I trattamenti sono stati effettuati utilizzando piastre da 96 pozzetti in cui sono state seminate 100.000 cellule/ml. Dopo un'ora di incubazione sono stati somministrati rispettivamente 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml e 1,2 mg/ml di estratto di epidermide di *Aloe*; è stato effettuato anche un controllo costituito da pozzetti con lo stesso numero di cellule non trattate. I risultati sono stati valutati a 20 e 40 ore dal trattamento utilizzando test MTT.

#### **2.5 Saggi MTT (bromuro di metil tiazolil difenil tetrazolio)**

Il saggio MTT permette di analizzare la proliferazione di cellule vitali presenti in un determinato campione mediante una stima della loro attività metabolica, per mezzo di utilizzo dei sali di tetrazolio ed in particolare del 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT). Questi vengono ridotti da deidrogenasi mitocondriali NAD-dipendenti a composti colorati chiamati formazani (Berridge *et al.*, 1996) ed è pertanto possibile convertire i dati ricavati da una lettura spettrofotometrica in un'informazione quantitativa circa il metabolismo cellulare. Solo i mitocondri attivi delle cellule vive, infatti, sono in grado di operare questa trasformazione e, poiché l'assorbanza di questi composti è funzione della loro concentrazione, da questa si può risalire al numero di cellule vitali nel campione.

L' MTT è stato sciolto in PBS in modo da ottenere una soluzione con una concentrazione finale di 5 mg/ml che è stata poi filtrata e ripartita in aliquote conservate al buio a -20°C. Le piastre da 96 pozzetti contenenti le cellule sono state centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti. In seguito sono stati prelevati da ogni pozzetto, 200 µl di terreno mediante l'utilizzo di una pipetta multicanale e aggiunti 100 µl di terreno fresco e 10 µl di MTT previamente scongelato. Dopo aver agitato bene le piastre, sono state lasciate in incubatore per 3 ore per dare alle cellule il tempo di metabolizzare l'MTT. Trascorso il tempo dovuto, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di soluzione DMSO (Dimetil solfossido) per solubilizzare i cristalli formati: si è così ottenuta una colorazione sul violetto. Il contenuto dei pozzetti poi è stato accuratamente sospeso, utilizzando una pipetta multicanale, fino al completo scioglimento dei cristalli; la piastra è stata poi messa nuovamente in incubatore. Trascorsi 30 minuti, si è proceduto alla lettura delle piastre, utilizzando un lettore Sunrise (Tecan) per determinare l'assorbanza, ad una lunghezza d'onda di 595 nm.

## 2.6 Analisi Immunofluorescenza

La componente microtubulare del citoscheletro delle cellule P3X e HL60 è stata studiata come possibile target per la valutazione degli effetti di estratto da foglie di *Aloe arborescens*. Le cellule P3X e HL60 non trattate (controllo), cellule P3X e HL60 trattate per 15 ore con 1,2 mg/ml di estratto di epidermide (Extr) di *Aloe arborescens* sono state seminate nel numero di 100.000/ml cellule in DMEM. Dopo il periodo di incubazione i campioni sono stati raccolti per centrifugazione a 1000 giri/min, i surnatanti sono stati scartati e il pellet è stato risospeso in PBS, pH 7,4. Le sospensioni cellulari sono state poste su vetrini coprioggetto rivestiti di polilisina e incubate a 37 °C per 60 minuti. La sospensione di cellule in eccesso è stata aspirata e i coprioggetti sono stati sciacquati brevemente in PBS e successivamente sono stati immersi prima in metanolo e poi in acetone a -20°C per 10 minuti ciascuno. Dopo due lavaggi in PBS, ogni vetrino è stato posto su una goccia di tampone bloccante (1% di albumina sierica bovina in PBS) per 30 minuti a 37° C al fine di bloccare i siti di legame non-specifico. Quindi i campioni sono stati incubati con anticorpo monoclonale primario per la subunità  $\alpha$ -tubulina (Amersham, UK) diluito 1:400 in tampone bloccante, per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo aver sciacquato tre volte in PBS, i coprioggetti

venivano asciugati ed incubati per un'ora con un anticorpo secondario IgG anti-topo coniugato con Fluoresceina IsoTioCianato (Alexa Fluor 594) diluito 1:100 in tampone bloccante. Per la valutazione di possibili colorazioni aspecifiche, alcuni campioni di controllo sono stati preparati omettendo l'anticorpo primario. Dopo tre lavaggi in PBS, la colorazione degli acidi nucleici è stata ottenuta con 5 minuti di incubazione con DAPI (4,6-diamino-2-phenylindolo di cloridrato) (Sigma-Aldrich) e poi i coprioggetti sono stati montati su vetrini con una goccia di soluzione al 5% di n-propile gallate in glicerolo allo scopo di ridurre il processo di fading.

Per l'immunofluorescenza effettuata per valutare l'espressione della proteina p53 le cellule P3X non trattate (controllo) e cellule P3X e trattate per 20 ore con 1,2 mg/ml di estratto di epidermide (Extr) di Aloe arborescens sono state seminate nel numero di 100.000/ml cellule in DMEM, è stato utilizzato l'anticorpo FL393 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), diluito 1:100 in tampone bloccante (BSA).

Come secondario è stato utilizzato un anticorpo policlonale coniugato con rodamina diretto contro le IgG di coniglio (Alexa Fluor 488), diluito 1:100 in tampone bloccante (BSA).

Le immagini sono state acquisite utilizzando un Microscopio Axiophot 2 dotato di una videocamera a colori (AxioCam MRC) e un software AxioVision (Zeiss).

## **2.7 Western blot**

Il Western blott è stato effettuato in collaborazione con il Dottor Giampiero Cai dell'Università degli Studi di Siena. Le cellule P3X non trattate (controllo) e cellule P3X e trattate per 20 ore con 1,2 mg/ml di estratto di epidermide (Extr) di Aloe arborescens sono state seminate nel numero di circa 100.000/ml cellule in DMEM. Le cellule sono state raccolte per mezzo di centrifugazione a 1000 rpm per 5 minuti. Il pellet di cellule è stato lavato due volte in PBS e poi risospeso in 100 µl di PBS contenente 2mM del composto riducente DTT e degli inibitori di proteasi. Le cellule sono state lisate con pestelli per eppendorf in presenza di ghiaccio.

Il lisato è stato successivamente centrifugato a 1000 rpm per 5 minuti; il supernatante è stato poi centrifugato a 30000 rpm per 1 ora a 4°C. Il pellet corrispondente alla frazione

membranale è stato risospeso in Laemmli Sample Buffer 1X; il supernatante formato da proteine citosoliche è stato denaturato in Laemmli Sample Buffer 6X.

La concentrazione proteica è stata determinata con i 2D Quant-kit della GE, sono stati caricati 30 µg di proteine per lane.

L'anticorpo utilizzato è stato lo stesso impiegato nell'immunofluorescenza per la p53 diluito 1:500.

Dopo l'immunoblotting, l'intensità delle bande è stata calcolata con il software Quantity One ed espressa come Integrated Density (ID). Il software effettua una misura dell'intensità delle bande rispetto a un valore di fondo, che è il background del blot, e ne calcola la differenza di intensità.

## **2.8 Indagini di microscopia elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)**

Le indagini di microscopia elettronica sono state effettuate presso il centro di microscopia elettronica dell'Università della Tuscia di Viterbo (CIME) dalla Dott.ssa Anna Rita Taddei. Circa 3.000.000 cellule delle linee P3X e HL60 sono state seminate in 30 ml di DMEM in fiasche da 75 cm<sup>3</sup>. Sono stati preparati i seguenti campioni: cellule di controllo (cellule non trattate), cellule P3X e HL60 trattate per 20 ore con 1,2 mg/ml di estratto di epidermide (Extr) di foglie di *Aloe arborescens*. Le cellule sono state raccolte in tubi e centrifugate, i surnatanti scartati e i pellet fissati con paraformaldeide al 4% e glutaraldeide 5%, pH 7.2 in 0.1 M tampone cacodilato per 1h a 4 ° C [20 articolo aloe] . I campioni sono stati mantenuti overnight nello stesso tampone, e il giorno dopo sono stati post-fissati in tetrossido di osmio 1% in tampone cacodilato per 1 ora a 4 ° C e successivamente lavati nello stesso tampone per 90 minuti. Per effettuare i vari passaggi di sostituzione delle soluzioni durante la fissazione ed il lavaggio, le cellule sono state fatte sedimentare in microprovette eppendorf mediante centrifugazione a 3000 rpm per 3 minuti.

Successivamente i campioni sono stati disidratati per mezzo di passaggi in soluzioni a concentrazioni crescenti di etanolo: dal 50% al 75% mantenendoli nelle eppendorf e da 75% al 100% trasferendoli su vetrini portaoggetto polilisinati.

Per le indagini SEM, i campioni sono poi stati essiccati sfruttando il metodo del punto critico utilizzando anidride carbonica liquida nell'apparato Unione Balzers CPD 020,

sputter rivestito con oro in una unità Balzers MED 010 e osservato con un microscopio elettronico JSM JEOL 5.200.

Per le indagini TEM, i campioni sono stati fissati e disidratati come sopra descritto ed inclusi in una miscela di resina Epon. Le sezioni sottili (50-70 nm) sono state tagliate con un ultramicrotomo Reichert Ultracut, raccolte su griglie di rame, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate con un microscopio elettronico JEOL 1200 EX II.

## **2.9 Cromatografia su strato sottile degli spot costituenti l'estratto (Thin Layer Chromatography, TLC)**

I campioni utilizzati previamente preparati sono stati caricati su una lastrina quadrata di dimensioni 20x20 (ICN Adsorbentien, ICN), a circa 1,5 cm dal bordo inferiore, sotto forma di spot distanti circa 1,5 cm l'uno dall'altro. Per far adsorbire piccole quantità di estratti di epidermide di *Aloe* alla silice sono stati utilizzati una siringa (Cromagold-ICN) e un getto d'aria fredda che ha permesso una più rapida evaporazione del solvente, limitando così le dimensioni degli spot che, per diffusione, tenderebbero invece ad espandersi compromettendo la successiva separazione.

Ciascuna lastra è stata caricata con 12 spot, ciascuno contenente 30 µl di estratto alcolico di epidermide ottenuto da piante adulte. La fase mobile era costituita da una miscela (1:1) di etanolo assoluto e di cloroformio.

Per l'effettuazione delle corse cromatografiche è stata utilizzata una camera di vetro dotata di coperchio e di scanalature verticali appositamente studiate per inserirvi le lastre e i solventi costituenti la fase mobile. Quando la linea del fronte di migrazione del solvente si è trovata a circa 4 cm dal bordo superiore della lastra, questa è stata tolta dalla camera di vetro, la fase mobile di cui la lastra era imbibita era fatta evaporare e si è poi preceduto a visualizzare l'avvenuta separazione mediante lampade UV di lunghezza d'onda pari a 365 nm, 263 nm (Blak-Ray) in grado di visualizzare i componenti separati sotto forma di *spot* aventi ciascuno una particolare intensità e colorazione.

La fase di rivelazione ha permesso di calcolare valori di RF (rapporto frontale), determinati dal rapporto tra la distanza percorsa dal singolo *spot* e quella percorsa dal fronte della fase mobile.

## 2.10 Eluizione e saggi delle frazioni e degli spot

La lastra ottenuta è stata suddivisa in tre frazioni denominate rispettivamente F1, F2, F3.

Nella frazione F1 è presente un residuo R e due *spot* denominati Spot A e Spot B.

Nella frazione F2 sono presenti due *spot*, denominati Spot C e Spot D.

Nella frazione F3 sono presenti tre *spot*, denominati Spot E, Spot F, Spot G.

Le tre frazioni sono state prelevate dalla lastra e singolarmente eluite utilizzando come solventi acqua ed etanolo in base alla polarità delle molecole che si trovano nelle singole frazioni, con un rapporto peso/volume di 5 ml di solvente per grammo di silice .

Le soluzioni utilizzate sono:

- 1) Frazione F1: 100% acqua bidistillata;
- 2) Frazione F2: 50% acqua bidistillata e 50% etanolo;
- 3) Frazione F3: 100% etanolo;

Dopo 30 minuti le frazioni processate in questo modo sono state centrifugate (14.000 giri per 3 minuti) per eliminare la silice. La fase liquida di ogni frazione dopo opportuna filtrazione con membrane di nylon dal diametro dei pori di 0,22  $\mu\text{m}$ , è stata trasferita in una provetta per essere portata a secco per mezzo di un flusso di azoto. Si è proceduto a testare le tre frazioni separatamente sulle cellule P3X e HL60 effettuando saggi preliminari dove sono stati somministrati alle cellule 0,4 mg/ml di ciascuna frazione per millilitro di medium di coltura.

Dopo aver individuato la frazione contenente i principi biologicamente attivi, si è proceduto a saggiare singolarmente gli *spot* della frazione 3 mediante saggi biologici su cellule P3X e HL60 in una concentrazione pari a 0,2 mg/ml.

I singoli spot E, F e G sono stati, dopo l'individuazione, prelevati dalla lastra cromatografica ed eluiti in etanolo con un rapporto peso/volume di 5 ml di solvente per grammo di silice e dopo 30 minuti sono stati centrifugati (14.000 giri per 3 minuti) per eliminare la silice. La fase liquida di ogni frazione è stata filtrata e trasferita in una provetta per essere portata a secco per mezzo di un flusso di azoto.

## **2.11 Cromatografia liquida ad alta pressione (ReversePhase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC)**

Le analisi riportate in questa Tesi sono state effettuate per mezzo di un cromatografo Shimadzu LC-10AT –VP dotato di uno spettrofotometro UV/visibile adoperando una colonnina sephafil peptide C18. La fase mobile è costituita da acqua-acetonitrile (0 min, 88:12; 19 min, 77:23; 24 min, 72:28; 39 min, 54:46); con un flusso di 1ml/mn.

La lettura è stata effettuata alle due lunghezze d'onda del rivelatore UV-visibile pari a 250-295 nm (Nobuyki O. *et al.*, 1996)

L'estratto precedentemente preparato e somministrato alle cellule di mieloma murino della linea P3X, è stato analizzato mediante HPLC dopo una filtrazione preliminare attraverso membrane di nylon dal diametro dei pori di 0,22 µm per eliminare eventuale silice residua e ottenendo un cromatogramma caratteristico.

Le corse sono state effettuate iniettando 20 µl di campione in ogni corsa.

## **2.12 Spettrometria di massa dell'estratto totale di epidermide da foglie di *Aloe arborescens***

L'estratto totale di *Aloe arborescens* è stato sottoposto ad analisi di spettrometria di massa presso il laboratorio della Dr.ssa Laura Salvini, Toscana Life Sciences di Siena. Le analisi LC-MS sono state condotte utilizzando un cromatografo Ultimate 3000 (Dionex) equipaggiato con un rivelatore UV e un auto campionatore, accoppiato tramite un'interfaccia elettrospray ad uno spettrometro di massa LTQ-Orbitrap (ThermoFisher scientific).

La separazione dei composti è stata eseguita usando una colonna C18 di 150 mm × 2,1 millimetri id con particelle di 5 micron (Phenomenex, Supelco). La colonna è stata mantenuta a 25 ° C. 15 µl di ciascun campione sono stati iniettati nel sistema LC-MS e gli analiti sono stati separati usando un gradiente lineare con 0,1% di acido trifluoroacetico (A) e acetonitrile (B): 0-1, min 30% B; 1-20 min, 30-100% B, 20-25 min B 100% e poi di nuovo alla condizione iniziale in 2 minuti. La colonna è stata quindi equilibrata per 6

minuti. Il flusso utilizzato è stato di 0.2 mL / min. e gli spettri UV-VIS sono stati registrati a 280 e 360 nm. È stato quindi utilizzato come rivelatore lo spettrometro di massa LTQ Orbitrap (Thermo Fisher, Brema, Germania) dotato di ionizzatore Ion Max Electrospray (ESI).

Gli spettri di massa sono stati acquisiti sia in positivo che in modalità negativa. Le condizioni della modalità elettrospray positivo-ion erano: tensione di 4,5 kV, riscaldata temperatura del capillare 275 ° C, tensione del capillare di 46,5 V e 92 V del tubo lente

Le condizioni della modalità Electrospray ioni negativi erano: tensione di 3,2 kV, temperatura del capillare di 275 ° C, tensione di -45 V e tensione del tubo lente -100 V.

Gli spettri di massa totale sono stati acquisiti sia in bassa che in alta risoluzione (60.000 FWHM) e sono stati elaborati utilizzando Xcalibur (versione del software 2.0).

L'identificazione dei composti è stata effettuata sia sulle molecole protonate o cationizzate (positive ion mode), che sulle molecole deprotonate (negative ion mode) con una finestra di 5ppm.

### **2.13 Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) dello spot E**

Lo spot E, isolato per mezzo di procedure di TLC, è stato sottoposto ad analisi NMR al fine di caratterizzare chimicamente i suoi costituenti, presso il Laboratorio del Prof. P. Manitto, Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università di Milano. Dopo aver portato a secco una soluzione acquosa dello spot E, il residuo è stato disciolto in metanolo deuterato e gli spettri sono stati acquisiti mediante uno spettrometro Bruker Advance 400 equipaggiato con software package xwinmr a 400.133 MHz. I chemical shifts sono stati riferiti al segnale del solvente ( $\delta^H$  3.35 da TMS).

## **2.14 Determinazione quantitativa dell'aloenina, della barbaloina e dell'isobarbaloina**

Singoli standard molecolari di Aloina A (Barbaloina) e Aloina B (isobarbaloina), sono stati acquistati presso LGC Standard e Aloenina A (99%) presso Applichem.

Per mezzo di corse cromatografiche all'HPLC dei singoli standard a concentrazioni scalari, è stato possibile costruire delle curve di taratura che hanno permesso di determinare la concentrazione delle molecole presenti nell'estratto utilizzato per i test biologici.

Le rette di taratura sono costruite mettendo in relazione l'assorbanza e le aree dei picchi di ciascun standard.

## **2.15 Trattamenti con le singole molecole**

Le cellule di mieloma murino sono state sottoposte a trattamenti con le singole molecole presenti nell'estratto di epidermide di *Aloe arborescens*, aloenina, isobarbaloina, barbaloina.

Le molecole sono state pesate e successivamente sciolte in etanolo; poi l'etanolo è stato completamente sostituito da acqua.

Sono state seminate un numero costante di cellule P3X pari a 100.000 per ml di DMEM in piastre da 96 pozzetti e sono stati effettuati saggi MTT a 20 ore dal trattamento.

Sulla base dei risultati delle indagini quantitative previamente effettuate, ogni molecola è stata somministrata alle cellule di mieloma murino in concentrazioni finali di 0,10 mM, 0,20 mM e 0,40 mM.

## 2.16 Trattamenti con le tre molecole in soluzione

Le cellule di mieloma murino sono state sottoposte a trattamenti con soluzioni composte dalle molecole aloenina, isobarbaloina e barbaloina a diverse concentrazioni.

Le molecole sono state pesate e sciolte in etanolo, poi l'etanolo è stato fatto completamente evaporare ed è stato sostituito da acqua.

Sono state seminate un numero costante di cellule P3X pari a 100.000 per ml di DMEM in piastre da 96 pozzetti, e sono stati effettuati saggi MTT a 20 ore dal trattamento. Con le 3 molecole sono state preparate 9 miscele diverse.

Le prime tre rispecchiano i rapporti stechiometrici tra le tre molecole nell'estratto variando nella soluzione 2 e nella soluzione 3 le concentrazioni totali, aumentate rispettivamente del 20% e del 100%.

Nelle soluzioni successive sono stati variati i rapporti stechiometrici.

Nella soluzione 4, 5, 6 era stata aumentata del 20% una molecola mantenendo invariate le concentrazioni delle altre due molecole.

Nella soluzione 7, 8, 9 sono state aumentate del 20% le concentrazioni di due delle tre molecole mantenendo invariata la concentrazione della terza.

	<b>Sol 1</b>	<b>Sol 2</b>	<b>Sol 3</b>
aloenina	0,190 mM	0,230 mM	0,380 mM
isobarbaloina	0,048 mM	0,057 mM	0,096 mM
Barbaloina	0,056 mM	0,067 mM	0,112 mM

	<b>Sol 4</b>	<b>Sol 5</b>	<b>Sol 6</b>
Aloenina	0,190 mM	0,190 mM	0,230 mM
isobarbaloina	0,048 mM	0,057 mM	0,048 mM
Barbaloina	0,067 mM	0,056 mM	0,056 mM

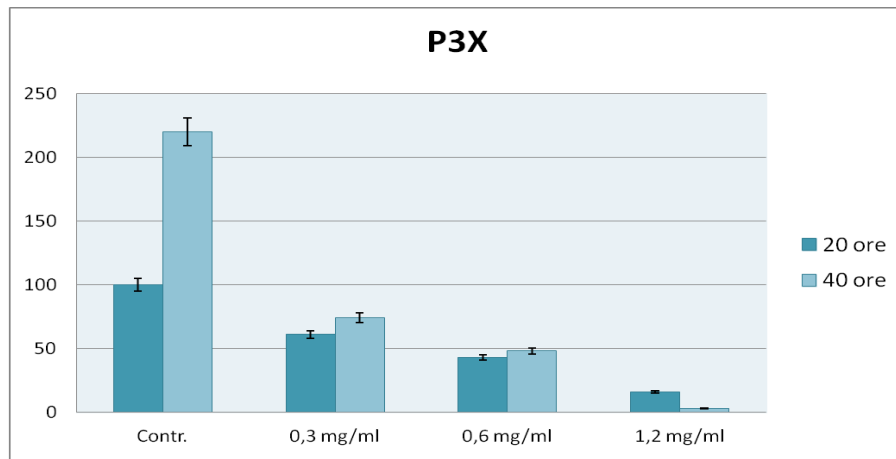
	<b>Sol 7</b>	<b>Sol 8</b>	<b>Sol 9</b>
Aloenina	0,230 mM	0,190 mM	0,230 mM
isobarbaloina	0,057 mM	0,057 mM	0,048 mM
Barbaloina	0,056 mM	0,067 mM	0,067 mM

### **3 Risultati**

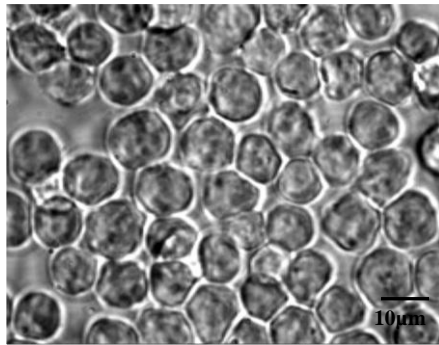
#### **3.1 Somministrazione dell' estratto di epidermide fogliare di *Aloe arborescens* su cellule delle linee P3X e HL60 e test vitalità cellulare (MTT)**

I risultati dei test MTT su cellule della linee P3X e HL60 dopo 20 e 40 ore di trattamento con 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml e 1,2 mg/ml di estratto di epidermide fogliare di *Aloe arborescens* sono riportati in Fig.1. e mostrano chiaramente che l'estratto ha inibito significativamente in modo dose-dipendente le cellule di mieloma murino P3X sia a 20 che a 40 ore dal trattamento. Mentre le cellule non trattate (Contr) hanno avuto una consistente attività proliferativa, nelle P3X trattate si è riscontrato circa il 40% di inibizione della crescita cellulare con 0,3 mg/ml di estratto che sale al 60% circa con 0,6 mg/ml a 20 ore. A 40 ore, per entrambi i trattamenti, le cellule sembrano aver ripreso a crescere, mentre con 1,2 mg/ml di estratto si è riscontrato circa l'86% di inibizione cellulare a 20 ore dal trattamento che sale a 97% a 40 ore dal trattamento. IC50 per le p3x è pari a 0,70 mg/ml a 20 ore dal trattamento.

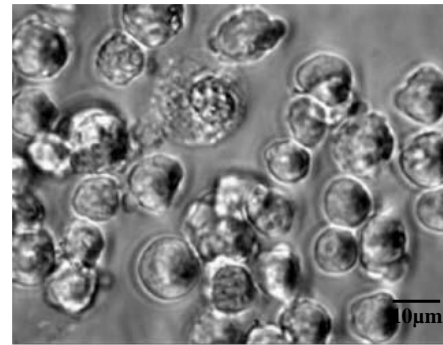
Le cellule, osservate per mezzo di un microscopio ottico invertito (Fig.2), denotavano dopo il trattamento con estratto, una morfologia irregolare e nel caso del trattamento più alto (Fig. 2d), mostravano un profondo cambiamento morfologico con un nucleo molto addensato.



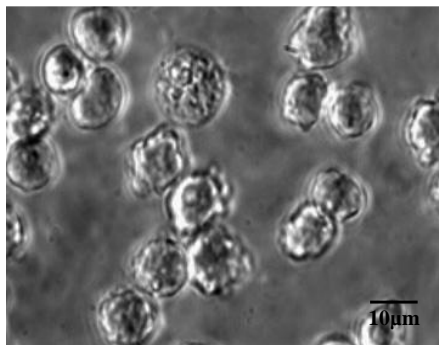
**Fig.1: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule P3X dopo 20 e 40 ore dal trattamento con estratto di *Aloe Arborescens***



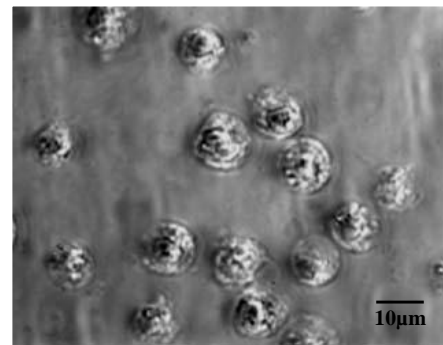
2a. P3X - controllo



2b. P3X - 0,3 mg/ml di estr.



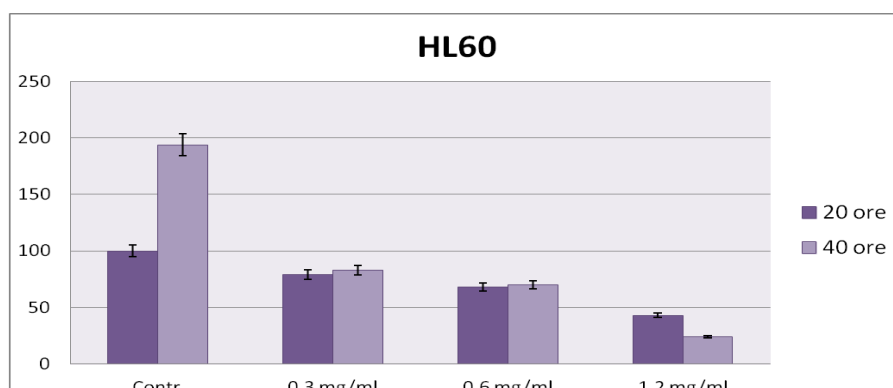
2c. P3X - 0,6 mg/ml di estr.



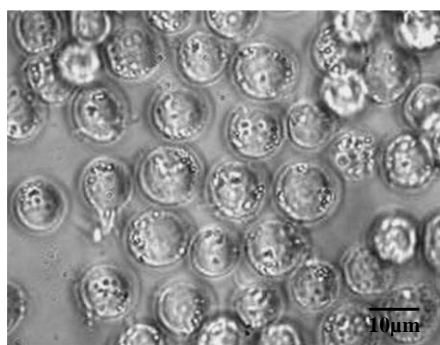
2d. P3X - 1,2 mg/ml di estr.

**Fig.2: Immagini al microscopio ottico (40X) di cellule P3X a 20 ore dal trattamento con estratto di *Aloe Arborescens***

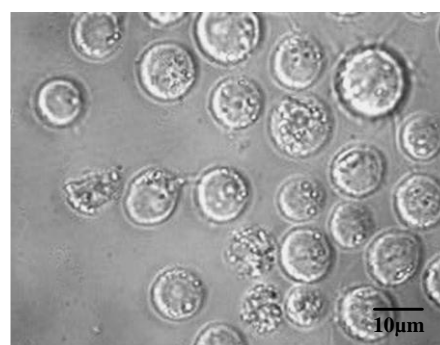
Lo stesso trattamento effettuato su cellule della linea HL60, i cui risultati sono riportati nella Fig.3, mostra che dopo 20 ore con 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml e 1,2 mg/ml di estratto si è avuta un'inibizione della proliferazione pari rispettivamente al 21%, 32% e al 57% mentre a 40 ore la percentuale di inibizione è risultata pari al 17% e 30% nel caso dei trattamenti più bassi e sale al 76% con il trattamento massiccio. IC50 per le HL60 è di 1,0 mg/ml a 20 ore dal trattamento. Le cellule trattate osservate per mezzo del microscopio ottico (Fig.4) mostrano una morfologia alterata rispetto al controllo (Fig.4a), accompagnata dalla presenza di numerose vescicole intracellulari e, nel caso del trattamento massiccio (Fig.2d), la presenza di numerose cellule morte.



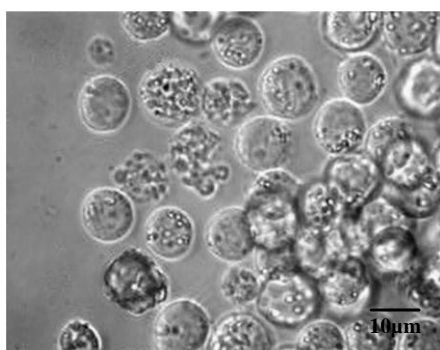
**Fig.3: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule HL60 dopo 20 e 40 ore dal trattamento con estratto di aloe**



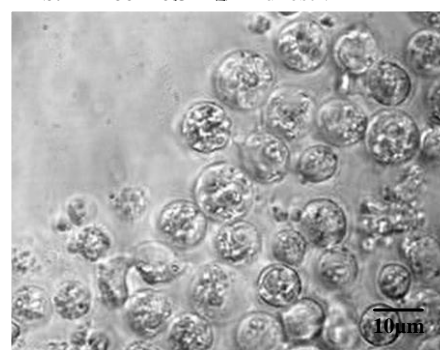
**4a.** HL60 - Controllo



**4b.** HL60 - 0.3 mg/ml di estr.



**4c.** HL60 - 0.6 mg/ml di estr.



**4d.** HL60 - 1.2 mg/ml di estr.

**Fig.4: Immagini al microscopio ottico (40X) di cellule P3X a 20 ore dal trattamento con estratto di *Aloe Arborescens***

### 3.2 Cromatografia su strato sottile (TLC).

Come riportato in Fig.5, il frazionamento tramite la cromatografia su strato sottile (TLC) ha permesso di separare l'estratto di epidermide fogliare di Aloe in spot fluorescenti, rilevati per mezzo di raggi UV. Abbiamo chiamato gli spot, rispettivamente, R (il residuo che non migra durante l'avanzamento della fase mobile), A, B, C, D, E, F e G. (Ogni spot è caratterizzato da un specifico valore di RF)

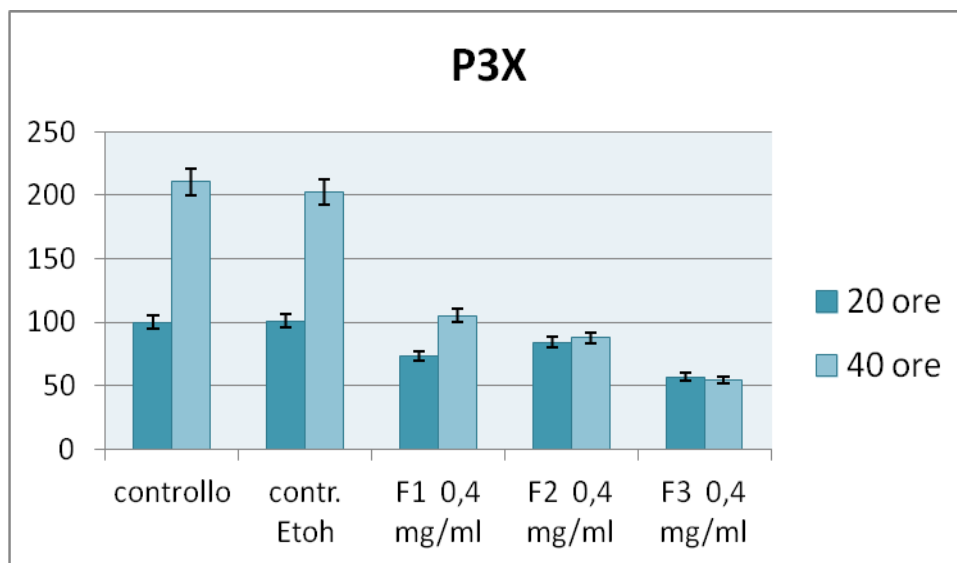
Come riportato in Materiali e Metodi, per verificare la presenza di eventuali attività biologiche, come l'inibizione della proliferazione delle cellule di mieloma murino, sono state considerate tre diverse aree nella lastra del gel di silice. Partendo dalla parte inferiore, la prima frazione consisteva degli spot chiamati R, A, B, la seconda dagli spot di nome C, D, e la terza costituita da E, F, G.

	<i>Spot</i>	<i>RF</i>
FRAZIONE III	<b>G</b>	0.95
	<b>F</b>	0.92
	<b>E</b>	0.89
FRAZIONE II	<b>D</b>	0.69
	<b>C</b>	0.46
FRAZIONE I	<b>B</b>	0.36
	<b>A</b>	0.28
	<b>R</b>	0

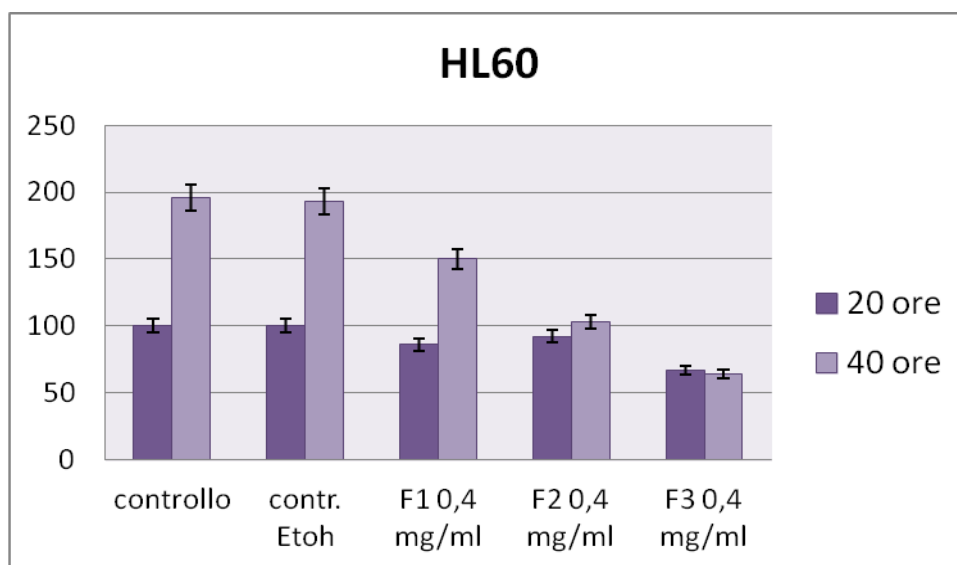
**Fig. 5 Schema della lastra cromatografica (TLC) dell'estratto di *Aloe arborescens***

La lastra cromatografica è stata suddivisa in tre frazioni denominate rispettivamente F1, F2, F3, dopo la loro eluizione queste sono state somministrate a cellule delle linee P3X e HL60 e sono stati effettuati i saggi MTT dopo 20 e 40 ore di trattamento. I risultati ottenuti dai test biologici sulle due linee cellulari sono riportati nelle Fig.6 e 7. Tra le tre frazioni, la frazione denominata III ha mostrato avere una più marcata attività di inibizione della

proliferazione cellulare sia sulle P3X che sulle HL60, sia a 20 che a 40 ore dal trattamento, rispetto alle altre frazioni, anche se una inibizione del 27% è risultata presente anche nella somministrazione della frazione I sulle cellule della linea P3X.

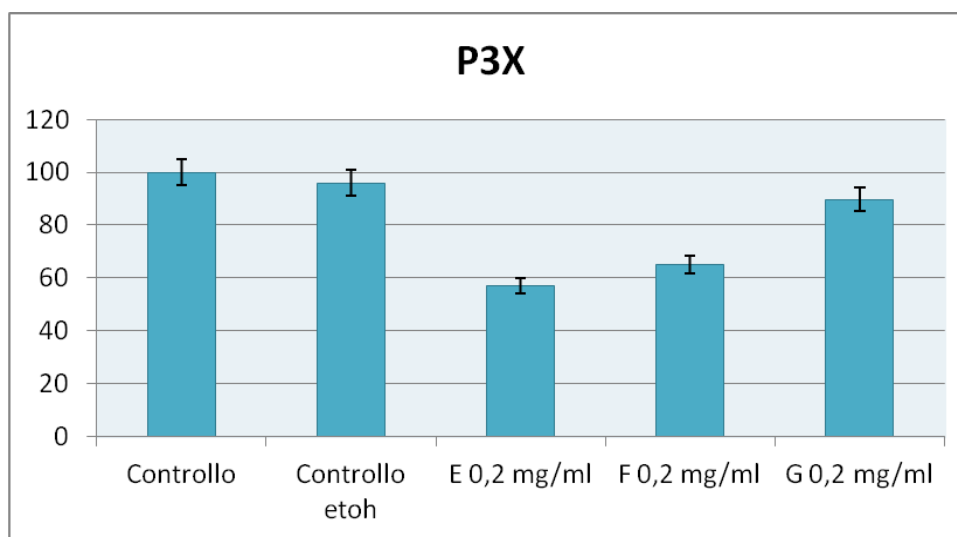


**Fig.6: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule P3X dopo 20 e 40 ore dal trattamento con le frazioni TLC**

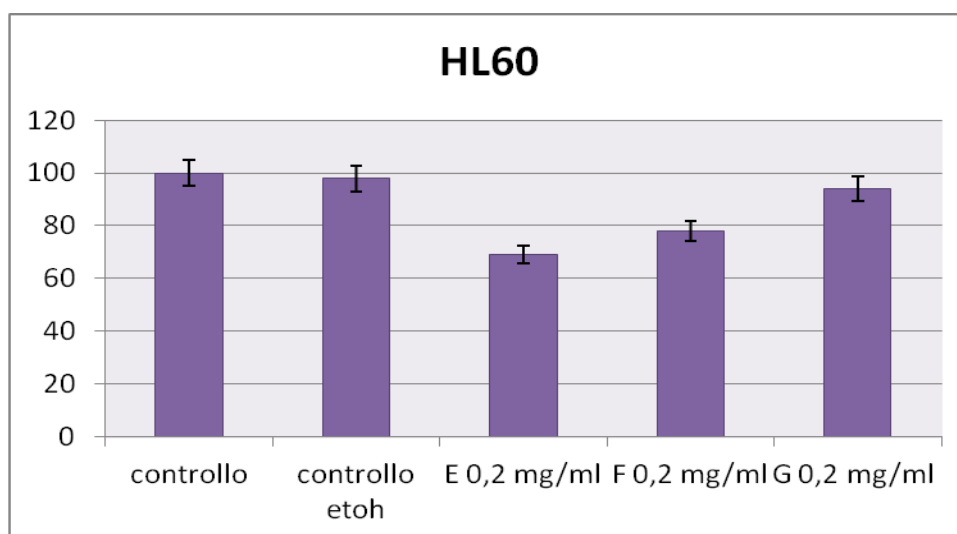


**Fig.7: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule HL60 dopo 20 e 40 ore dal trattamento con le frazioni TLC**

Da ulteriori test MTT effettuati somministrando i singoli spot E, F e G contenuti nella frazione III, lo Spot E è risultato essere quello più attivo per quanto riguarda l'attività di inibizione cellulare sia sul mieloma murino P3X che sulle HL60 (Fig.8 e 9).



**Fig.8:** Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule P3X dopo 20 ore dal trattamento con gli spot della frazione III



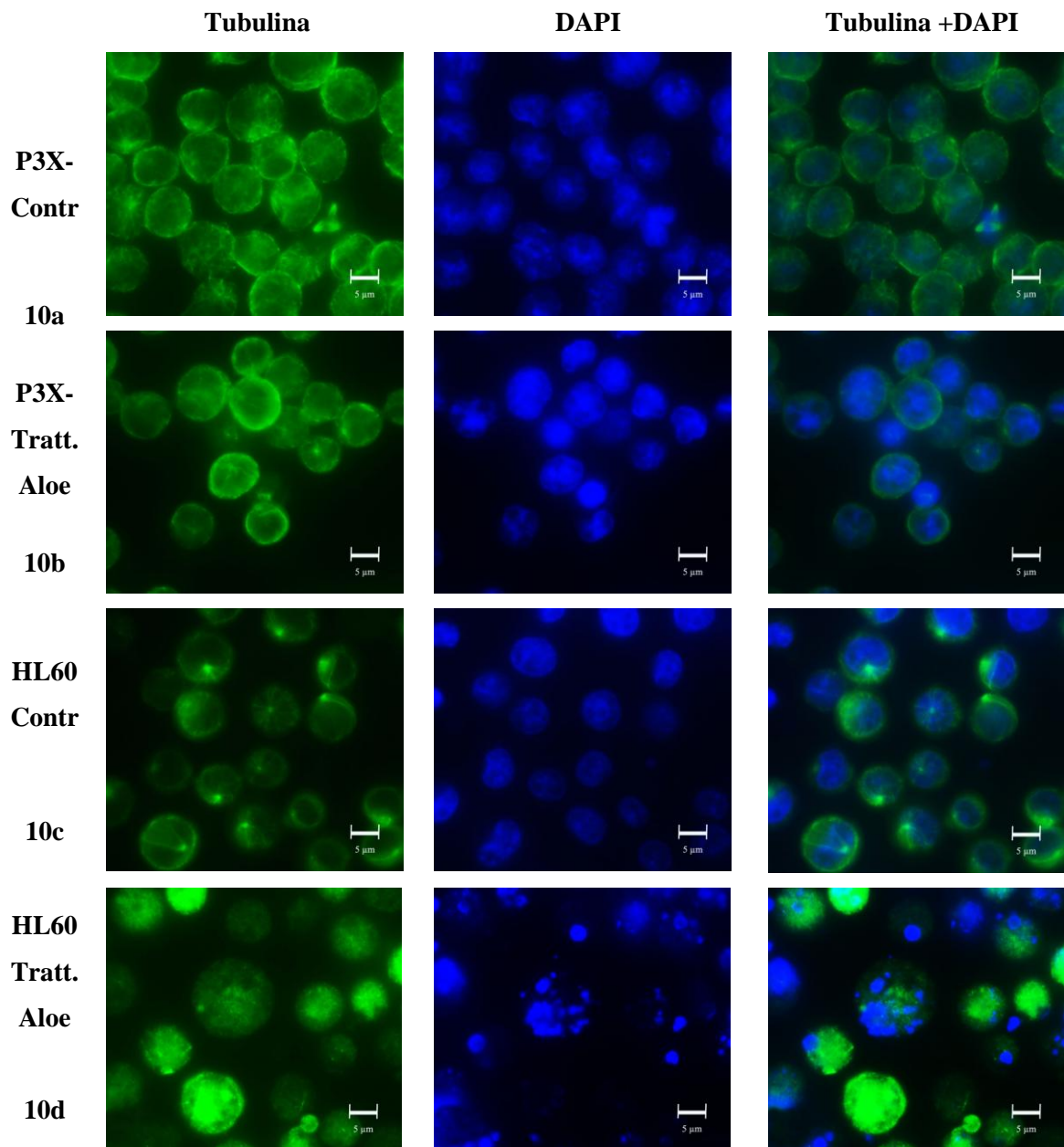
**Fig.9:** Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule HL60 dopo 20 ore dal trattamento con gli spot della frazione III

Dal confronto tra l'attività dell'estratto di epidermide fogliare sulle due linee cellulari rispetto a quella esercitata dallo Spot E, risulta chiaro però che il livello di attività derivante dalla somministrazione dello Spot E è comunque decisamente inferiore all'attività dell'estratto in *toto*.

### 3.3 Studi di immunofluorescenza

Uno studio di immunofluorescenza, effettuato utilizzando un anticorpo contro la subunità  $\alpha$  della tubulina, ha permesso di analizzare l'organizzazione microtubulare in cellule non trattate di mieloma murino P3X e HL60 (controllo) e dopo i trattamenti con estratto di epidermide fogliare a 15 ore dal trattamento. Tempi maggiori di trattamento non sono stati presi in considerazione per via del numero ridotto di cellule vive e ormai non più in grado di fornirci alcun tipo di informazione sull'organizzazione microtubulare se non una evidente disgregazione generale dei microtubuli. In tutti i campioni il materiale nucleare è stato marcato attraverso un colorante specifico il DAPI. Come riportato in Fig.10a, le cellule P3X non trattate rivelano chiaramente la presenza di un centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC) con elementi microtubulari originati e distribuiti nel citoplasma; come dimostrato dalla colorazione DAPI il DNA è localizzato in una zona definita del citoplasma. La sovrapposizione delle immagini delle due marcature riportata, ha permesso di ottenere una visione più chiara della specificità della colorazione. Le cellule P3X trattate per 15 ore con 1,2 mg/ml di estratto (Fig.10b) hanno mostrato, nella maggior parte dei casi, la scomparsa del centro di organizzazione dei microtubuli e una colorazione diffusa probabilmente a causa della presenza di tubulina non polimerizzata nel citoplasma; la colorazione DAPI, è risultata essere differente rispetto alle cellule di controllo, denotando un addensamento del materiale nucleare. La sovrapposizione delle immagini riportata, ha permesso di ottenere una visione più chiara della specificità della colorazione.

Risultati simili sono stati osservati effettuando una marcatura anti- $\alpha$  tubulina e con il DAPI anche su cellule della linea HL60 trattate con 1,2 mg/ml di estratto a 15 ore dal trattamento. Le cellule del controllo (Fig.10c) mostrano una tipica organizzazione microtubulare e il MTOC è ben evidente, e si denota un nucleo ben definito. Nelle HL60 trattate per 15 ore (Fig.10d) sembra scomparire il MTOC e si riscontra una marcata depolimerizzazione dei microtubuli con la presenza di spot fluorescenti che lo testimoniano, il nucleo risulta marcatamente frammentato.



**Fig.10: Cellule delle linee P3X e HL60 trattate con estratto epidermico di *Aloe arborescens*, marcate con anti- $\alpha$  tubulina e DAPI**

### 3.4 Microscopia elettronica: SEM e TEM

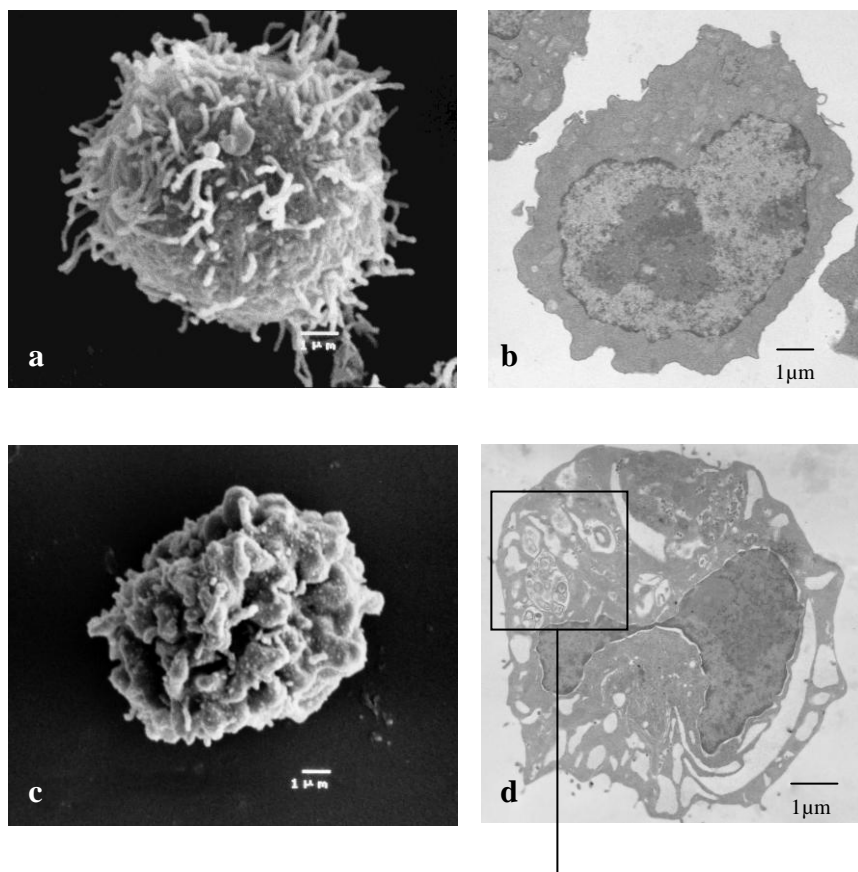
#### 3.4.1 Cellule P3X trattate con estratto di epidermide fogliare di *Aloe arborescens*

Le cellule di mieloma murino osservate al SEM presentano forma sferica con dimensioni di 8-10 micron; brevi strutture filamentose sono state osservate sulla superficie cellulare (Fig.11a).

Indagini effettuate con tecniche TEM (Fig.11b) hanno mostrato una superficie regolare delle cellule di mieloma P3X, organelli e vacuoli nel citoplasma e un nucleo caratteristico di grandi dimensioni, contenente cromatina disaggregata.

Dopo il trattamento con estratto di epidermide fogliare, le cellule di mieloma murino osservate al microscopio SEM (Fig.11c) hanno mantenuto la loro forma sferica, anche se il trattamento sembra influenzare la dimensione della cellula e la sua morfologia, si è verificata una riduzione del diametro cellulare rispetto a cellule di controllo e sono evidenti lobi sulla superficie cellulare.

Indagini effettuate al TEM (Fig.11d) mostrano modificazioni a carico delle strutture interne alla cellula e si osservano numerose inclusioni membranose (Fig.11e), probabilmente dovute a processi degenerativi. Sono risultati inoltre presenti, grandi vacuoli e un nucleo frammentato contenente cromatina disaggregata.



**Fig.11: Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di cellule P3X**

**a,b)** SEM e TEM di cellule P3X di controllo

**c,d)** SEM e TEM di cellule P3X sottoposte al trattamento con 1,2 mg/ml di estratto di aloe

**e)** particolare delle strutture membranose presenti nel citoplasma di cellule trattate con estratto.

### 3.4.2 Cellule HL60 trattate con estratto di epidermide fogliare di *Aloe arborescens*

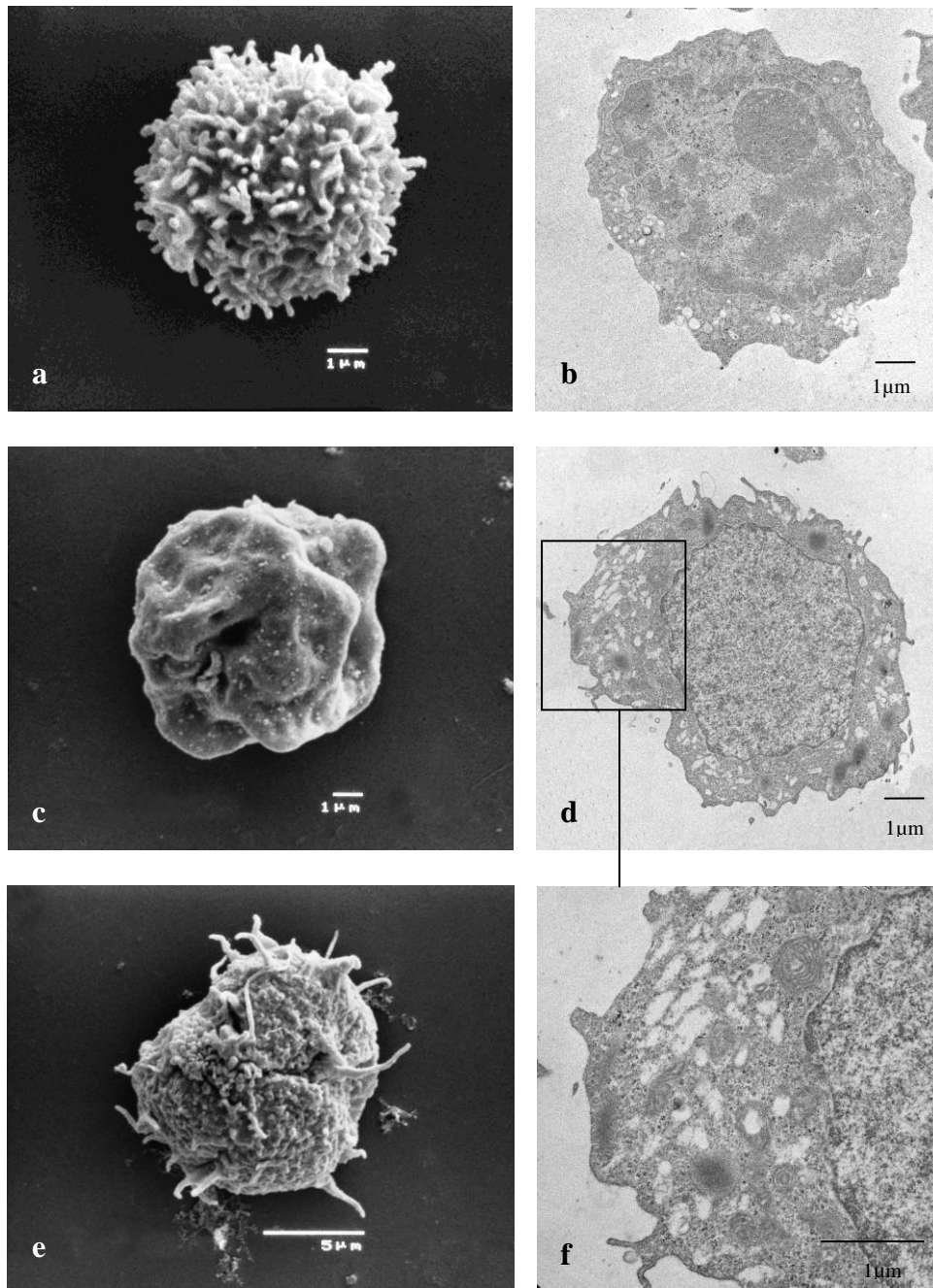
Le cellule HL60 di controllo appaiono al SEM di forma sferica con la superficie caratterizzata da strutture filamentose, il diametro è di circa 10  $\mu\text{m}$ . (Fig.12a)

Al TEM (Fig. 12b) le sezioni mostrano un grosso nucleo al cui interno è visibile cromatina disaggregata, nel citoplasma sono presenti organelli e vescicole.

Le cellule HL60 trattate con estratto epidermico di aloe mostrano al SEM (Fig. 12c,d) un profondo cambiamento a carico della morfologia cellulare esterna, le strutture filamentose

presenti nel controllo sembrano scomparire quasi totalmente e si osservano invaginazioni della membrana cellulare e lobature esterne.

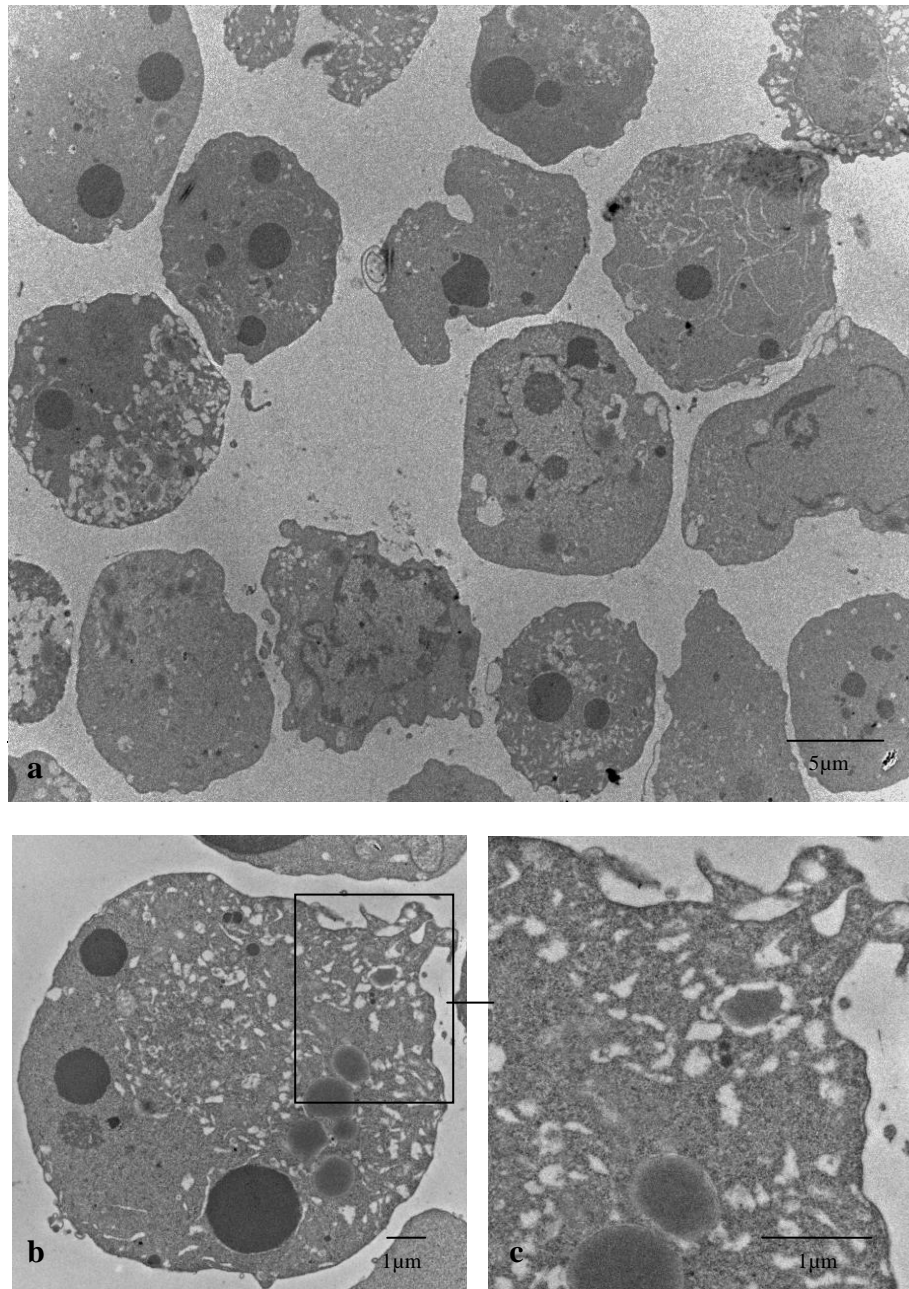
Le immagini al TEM (Fig.12d,e) delle cellule HL60 trattate mostrano un profondo riarrangiamento dell'organizzazione interna alla cellula, il nucleo si presenta spesso frammentato, (Fig.13a, b, c) fenomeno già riscontrato nella procedura di fluorescenza per mezzo del colorante DAPI, mostrando una tipica morfologia a cui va in contro la cellula durante il processo apoptotico. Numerose vescicole sono presenti nel citoplasma.



**Fig.12: Immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) di cellule HL60**

**a,b)** SEM e TEM di cellule HL60 di controllo

**c,d,e)** SEM e TEM di cellule P3X sottoposte al trattamento con 1,2 mg/ml di estratto di aloe  
**f)** particolare delle vescicole e organelli presenti nel citoplasma di cellule trattate con estratto.



**Fig.13 Immagini al microscopio elettronico e a trasmissione (TEM) di cellule HL60 trattate con estratto di aloe**

**a,b)** Cellule HL60 trattate con estratto di aloe con evidente frammentazione del nucleo

**c)** particolare delle vescicole e organelli presenti nel citoplasma di cellule trattate con estratto.

### **3.5 Valutazione dell'espressione della P53**

Le cellule P3X di controllo e le P3X sottoposte al trattamento con 1,2 mg/ml di estratto per 20 ore, sono state sottoposte ad analisi western blot e immunofluorescenza per verificare la diversa espressione della proteina p53.

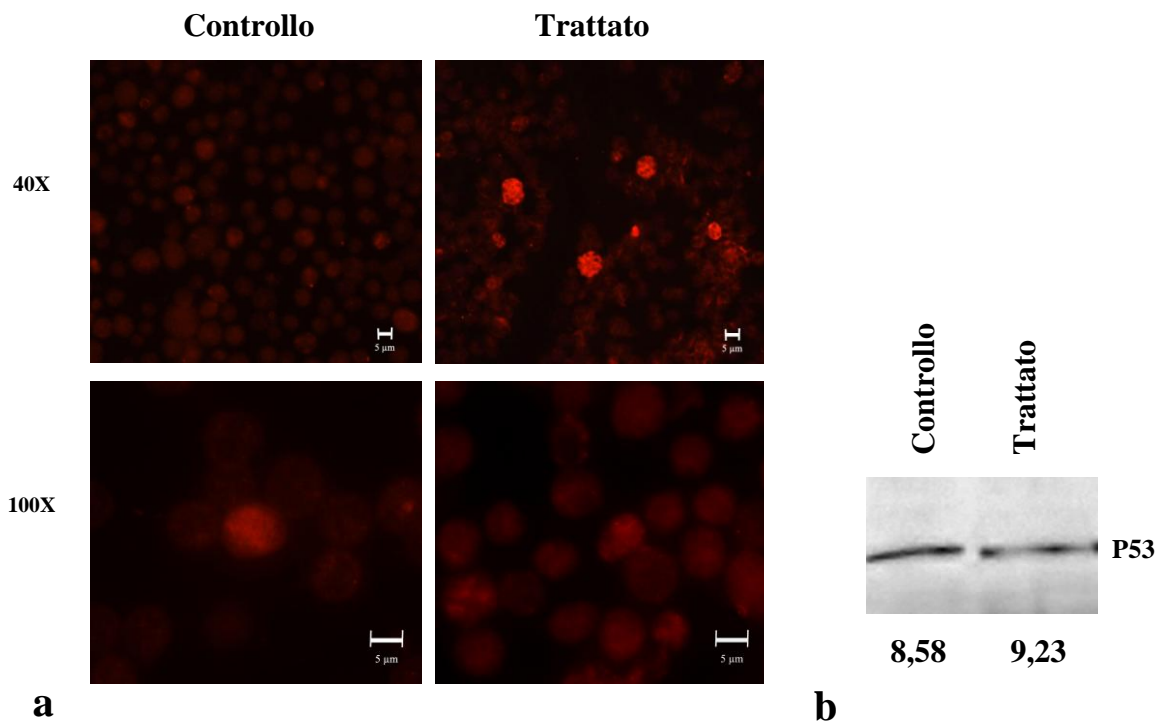
#### **3.5.1 Immunofluorescenza**

Il saggio è stato condotto su cellule P3X di controllo e cellule trattate con 1,2 mg/ml di estratto di Aloe incubate per 20 ore. Dai risultati ottenuti, utilizzando un anticorpo diretto contro la proteina p53, si è evidenziato nelle cellule trattate una maggiore marcatura della proteina p53 rispetto alle cellule P3X utilizzate come controllo. (Fig.14a)

#### **3.5.2 Western Blot**

Come evidenziato dai risultati ottenuti, nelle cellule trattate con estratto di Aloe è presente una banda riconosciuta dall'anticorpo anti-p53 di peso molecolare poco al di sopra di 50 kDa e riconducibile alla proteina di nostro interesse.

L'intensità delle bande relative alla proteina, calcolata con il software Quantity One ed espressa come Integrated Density (ID), rispetto a un valore di fondo che è il background del blot, è risultati pari a 8,58 ID per le cellule di controllo e 9,23 ID per quelle "resistenti"; che mostrano quindi una espressione leggermente maggiore della proteina rispetto alle cellule di controllo. Questo dato conferma il risultato ottenuto mediante immunofluorescenza effettuato sulla stessa tipologia di campioni cellulari. (Fig14b)



**Fig. 14: Valutazione dell'espressione della proteina p53 in cellule P3X di controllo e trattate con 1,2 mg/ml di estratto di aloe:**

- a) Immunofluorescenza di cellule P3X di controllo e trattate con estratto, marcate con anti p53  
 b) Analisi mediante western blot dell'espressione della p53 in cellule P3x di controllo trattate

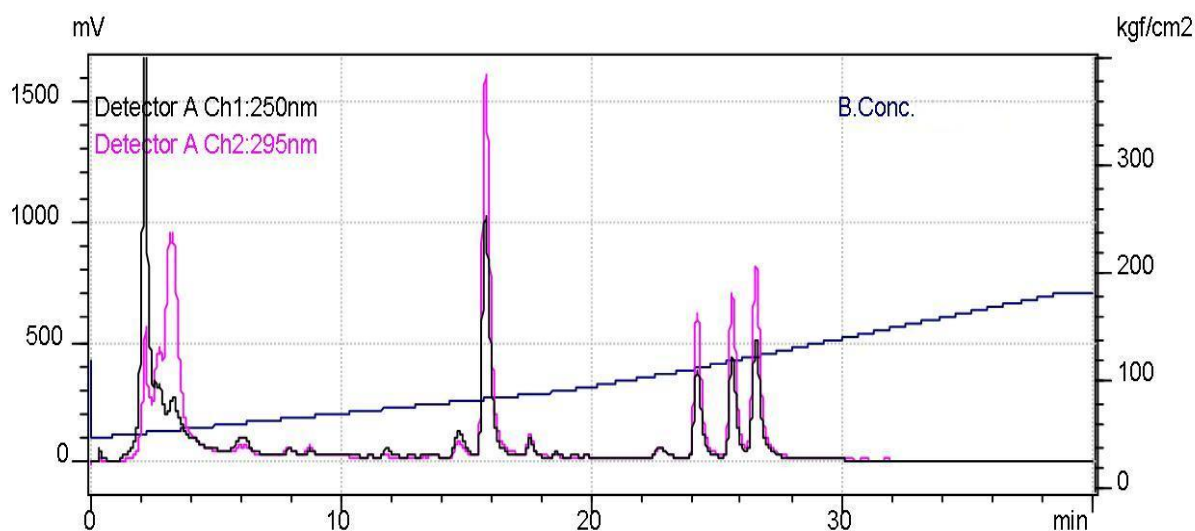
### 3.6 Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)

L'estratto di epidermide di foglie di *Aloe arborescens* è stato sottoposto ad analisi cromatografica liquida ad alta pressione (HPLC).

Il cromatogramma ha messo in evidenza al suo interno la presenza di quattro picchi principali e una serie di picchi di minori dimensioni (Fig. 15).

Effettuando le suddette analisi in periodi diversi dell'anno e nel corso delle diverse fasi fenologiche della pianta, si è evidenziata una certa variabilità nell'intensità dei picchi, conseguenza della variazione della concentrazione delle molecole nella foglia nei diversi periodi dell'anno, fenomeno confermato anche da studi bibliografici (Beppu et al 2004). Tali differenze ricalcavano, abbastanza fedelmente variazioni nelle proprietà di inibizione della proliferazione delle cellule delle due linee cellulari investigate.

Questa osservazione ha avvalorato l'idea che, per far sì che si abbia una attività biologica marcata, le molecole dovessero essere presenti in un determinato rapporto tra di loro ed ad una determinata concentrazione.



**Fig.15: Cromatogramma HPLC dell'estratto epidemico di *Aloe arborescens***

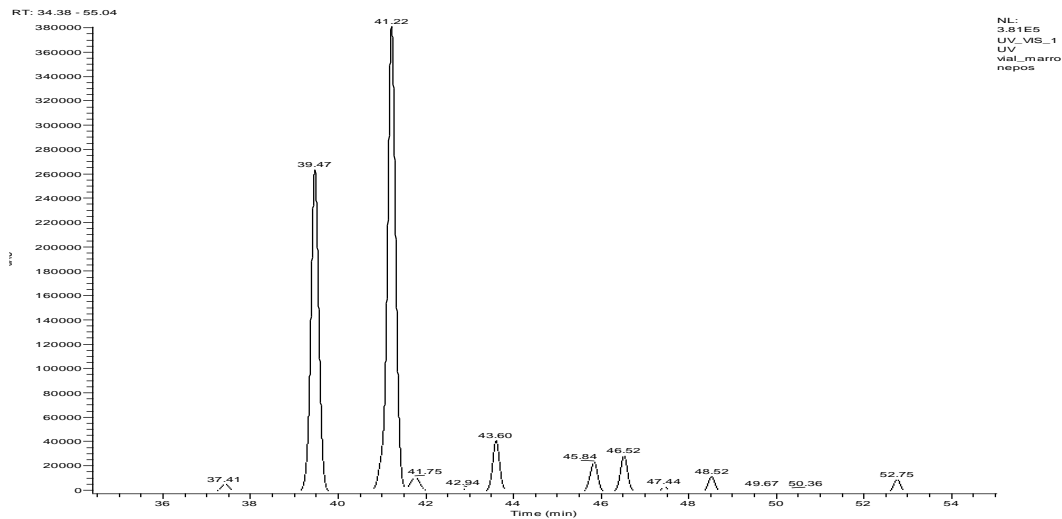
### 3.7 Spettrometria di massa.

L'estratto totale di *Aloe arborescens* è stato sottoposto ad analisi di spettrometria di massa presso il laboratorio della Dr.ssa Laura Salvini, Toscana Life Sciences di Siena. Le analisi LC-MS sono state condotte utilizzando un cromatografo UV accoppiato con un'interfaccia elettrospray ad uno spettrometro di massa LTQ-Orbitrap. È stato così possibile separare i diversi componenti (Fig.16) ed identificarli mediante determinazione della loro struttura molecolare.

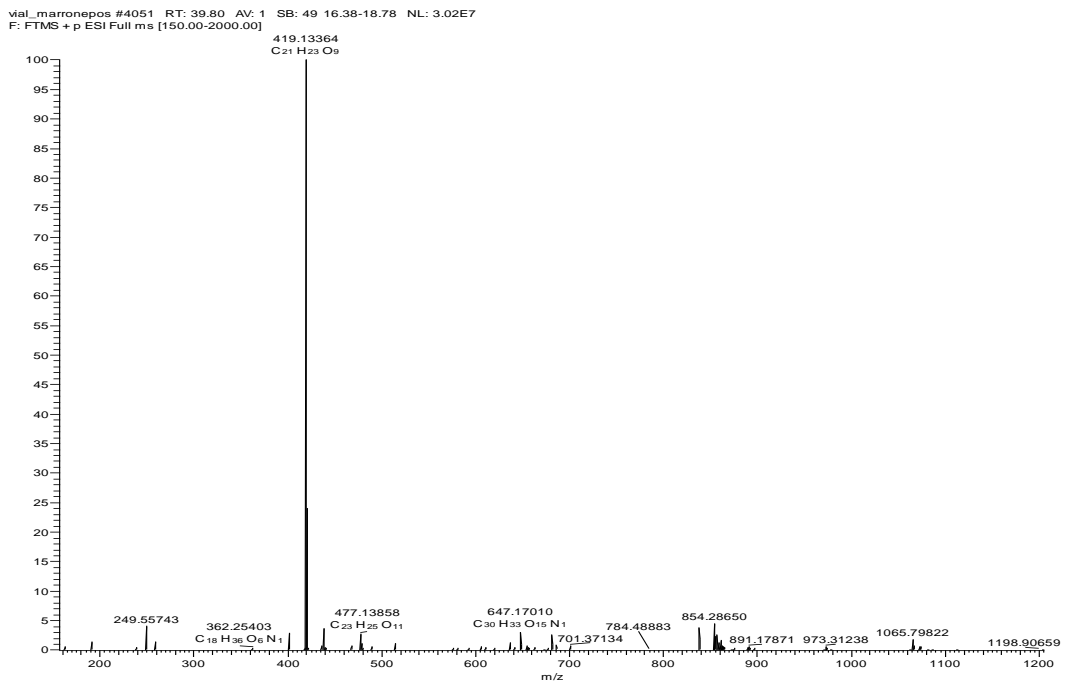
L'analisi di spettrometria di massa ha dato i seguenti risultati:

- I due picchi a  $m/z$  419 (RT: 39.85 e 41.41) sono attribuibili alla barbaloina e all'isobarbaloina (aloina A e aloina B) (Fig.17 e 18) .
- Il picco a  $m/z$  571 (RT: 37.63) è attribuibile a un altro antrachinone la 2'-O-feruoloylaloesina (Fig.19).
- Il picco a  $m/z$  411 (RT: 31.47) è attribuibile all'aloenina (Fig.20).

- Il picco a m/z 555 (RT: 42.22) potrebbe essere attribuibile ad un analogo dell' isoaloesina D con  $R_3=COCH_3$  (Fig. 21).
- Sono presenti poi altri picchi a m/z 425 (RT: 49.67), 585 (RT: 43.65), 835 (RT: 46.14) e 1251 (RT: 50.56) di cui non è stata possibile l'identificazione e che saranno oggetto di ulteriori analisi

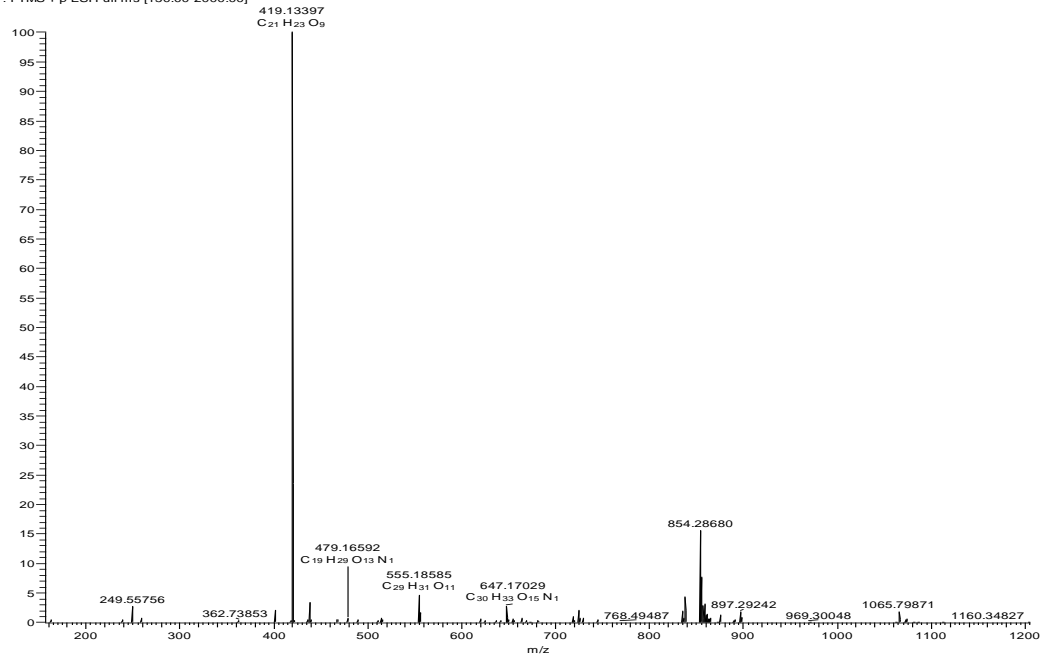


**Fig. 16: Cromatogramma UV dell'estratto di *Aloe arborescens***



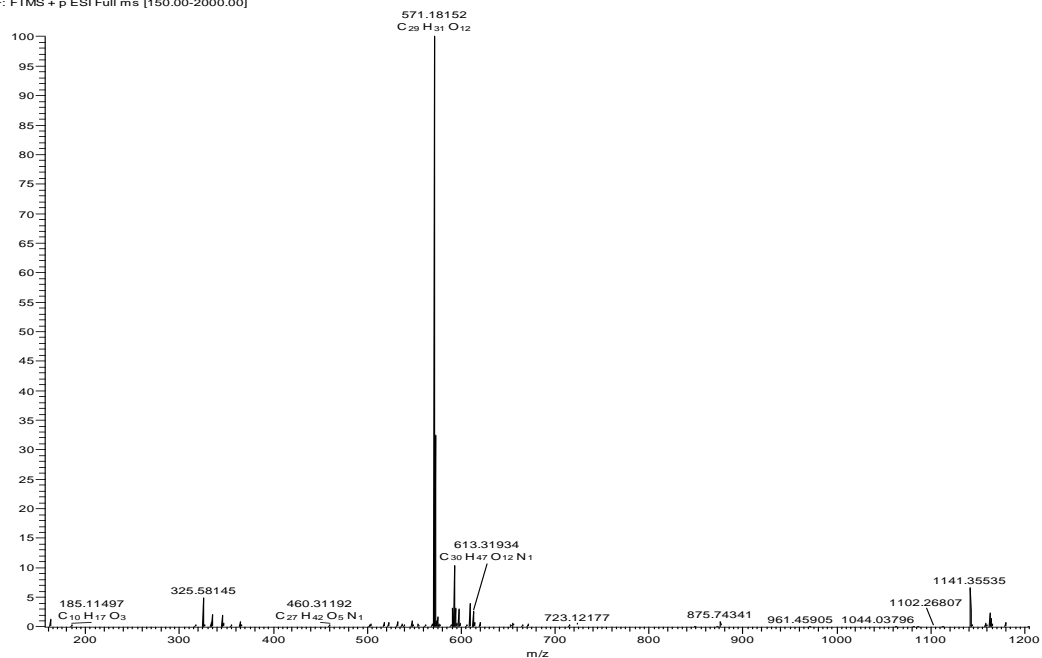
**Fig.17: Spettro di massa del picco a RT 39.85 con composizione elementare calcolata attribuibile a barbaloina**

via\_marronepos #4211 RT: 41.41 AV: 1 SB: 49 16.38-18.78 NL: 3.63E7  
F: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

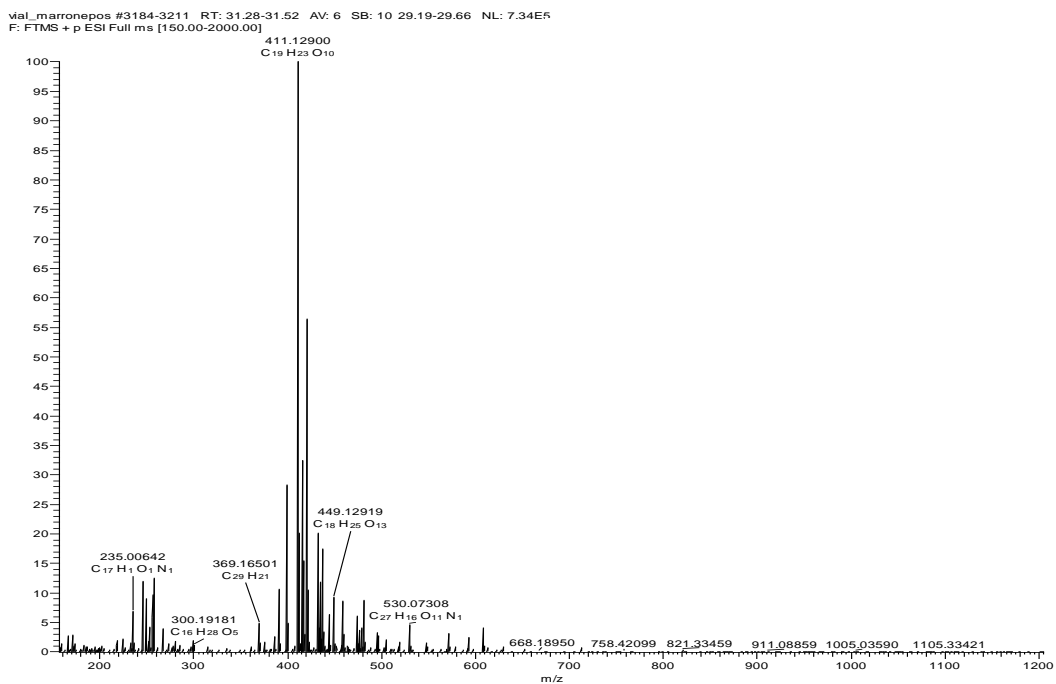


**Fig.18: Spettro di massa del picco a RT 41.41 con composizione elementare calcolata attribuibile ad isobarbaloina**

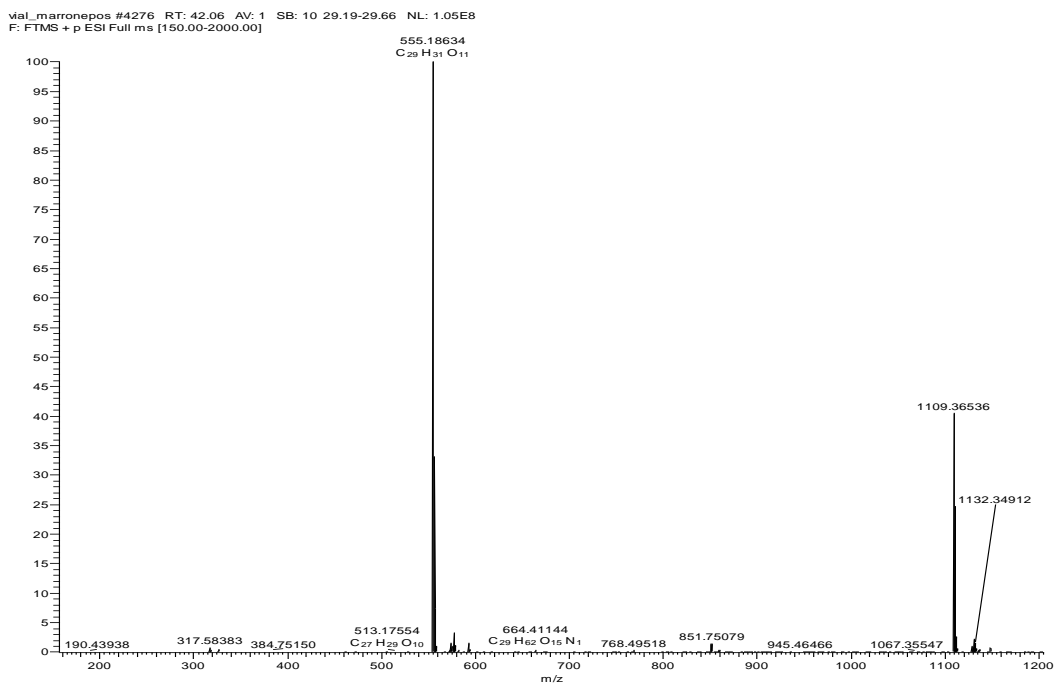
via\_marronepos #3826 RT: 37.58 AV: 1 SB: 49 16.38-18.78 NL: 1.86E7  
F: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



**Fig.19: Spettro di massa del picco a RT 37.63 con composizione elementare calcolata attribuibile a 2'-0-feruoloylaloesina**



**Fig.20: Spettro di massa del picco a RT 31.47 con composizione elementare calcolata attribuibile ad aloenina**

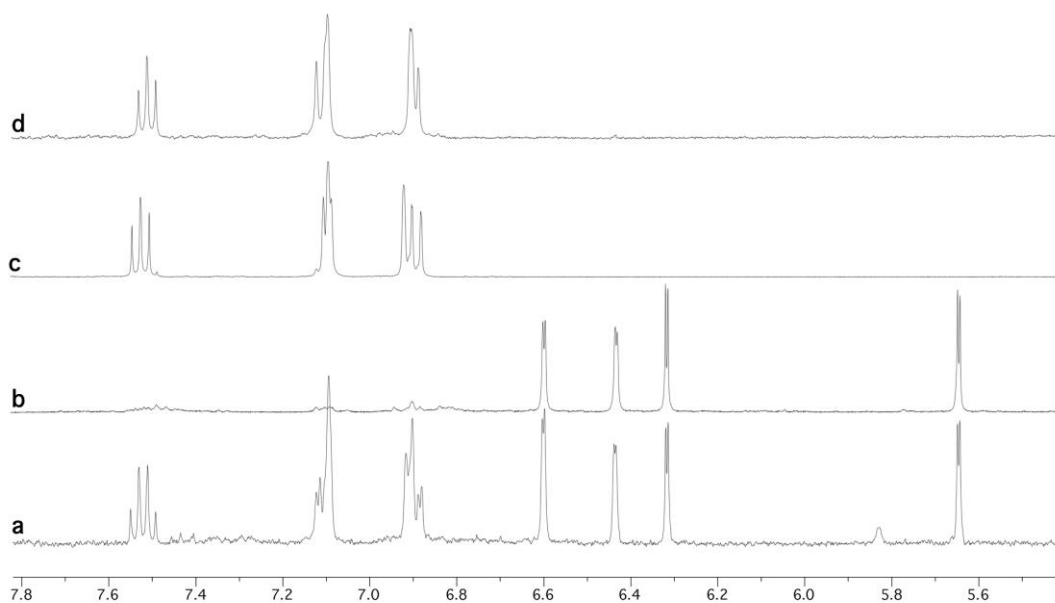


**Fig.21: Spettro di massa del picco a RT 42.22 con composizione elementare calcolata attribuibile ad analogo dell' isoaloeresina D con R<sub>3</sub>=COCH<sub>3</sub>**

### 3.8 Risonanza magnetica nucleare. (NMR)

Lo spot E, isolato per mezzo di procedure di TLC e risultato biologicamente attivo, è stato sottoposto ad analisi NMR al fine di caratterizzare chimicamente i suoi costituenti, presso il Laboratorio del Prof. P. Manitto, Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università di Milano.

Segnali intensi nella gamma 2.5 - 5.5 PPM hanno suggerito la presenza di un gran numero di carboidrati, probabilmente derivanti dai processi idrolitici del parenchima della foglia durante la procedura di estrazione. Segnali deboli nella gamma 6.2 - 8.0 PPM indicano la presenza di polichetidi derivati da metaboliti secondari della pianta. Le frazioni che contengono i tre picchi dello spot E sono state raccolte e sono state esaminate secondo  $^1\text{H}$  NMR. Il controllo dello spettro dello spot E con quello degli standard di riferimento ha confermato la presenza di aloenina A e aloina A (barbaloina) e aloina B (isobarbaloina). (Fig.22)



**Fig.22: Spettro NMR Spot E**

### **3.9 Quantificazione delle molecole contenute nell'estratto mediante gli standard molecolari**

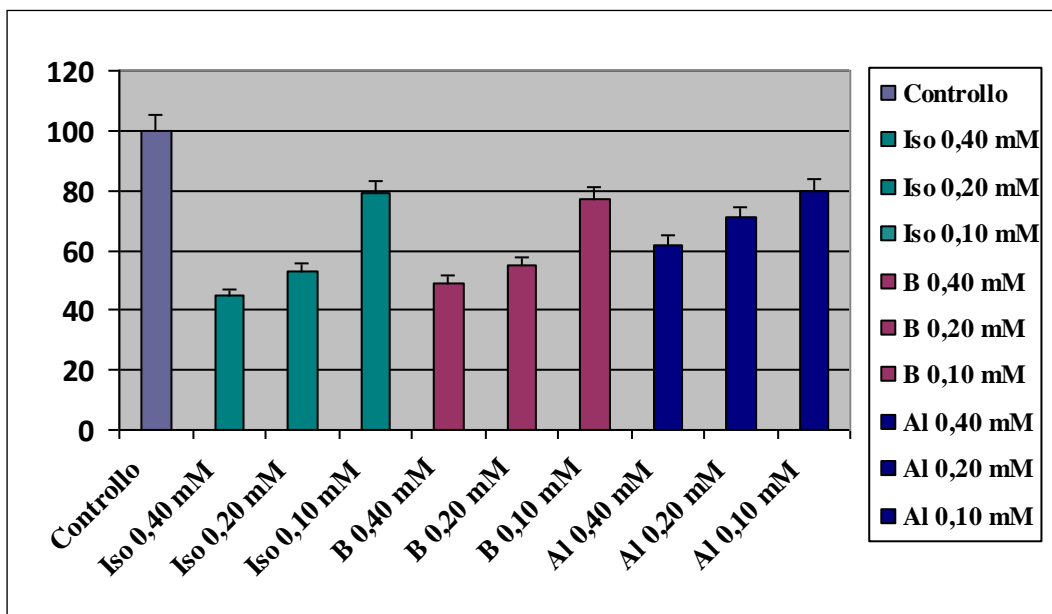
Per mezzo di corse cromatografiche all'HPLC dei singoli standard a diverse concentrazioni, la costruzione della retta di taratura e il suo confronto con il cromatogramma dell'estratto effettuato utilizzando il software LcSolution, è stato possibile effettuare la determinazione quantitativa delle tre molecole contenute nell'estratto di epidermide di *Aloe*.

La determinazione quantitativa delle tre molecole ha portato ai seguenti risultati:

- aloenina pari a 4,8 mM (2,0 mg/ml)
- isobarbaloina pari a 1,2 mM (0,5 mg/ml)
- barbaloina pari a 1,4 mM (0,6 mg/ml)

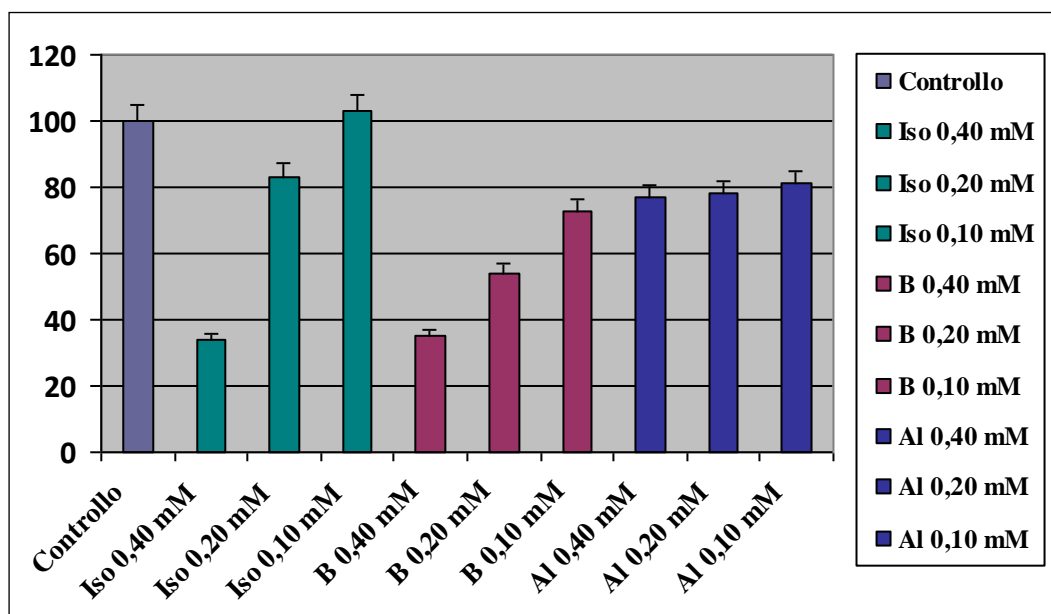
### **3.10 Trattamenti delle P3X e HL60 con aloina a, aloina b e aloenina**

Le cellule delle linee P3X e HL60, trattate con le tre molecole standard somministrate singolarmente a diverse concentrazioni, sono state utilizzate per effettuare saggi MTT condotti a 20 ore dal trattamento. I risultati del saggio MTT (Fig.23) mostrano che le tre molecole determinano un'inibizione dose-dipendente sulle cellule di mieloma murino P3X mentre nelle cellule non trattate (Contr) si ha una consistente attività proliferativa. Nelle P3X trattate con aloenina nelle tre concentrazioni utilizzate, di rispettivamente 0,10 mM, 0,20 mM e 0,40 mM, si è riscontrata un'inibizione massima della crescita cellulare pari al 38%, relativa alla concentrazione di 0,40 mM; mentre nel caso dei trattamenti con barbaloina e isobarbaloina l'inibizione è risultata più marcata, arrivando rispettivamente al 51% e 55% con la dose massima di 0,40 mM; alla concentrazione intermedia di 0,20 mM l'inibizione è risultata del 45% per la barbaloina e del 47% per l'isobarbaloina mentre alle concentrazioni più basse l'inibizione è risultata inferiore al 30% in entrambi i casi.



**Fig.23: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule P3X dopo 20 ore di trattamento con gli standard molecolari a diverse concentrazioni**

Gli stessi trattamenti sono stati poi effettuati sulla linea cellulare HL60 e come è possibile vedere dal grafico (Fig.24), anche qui l'azione delle molecole barbaloina e isobarbaloina sembra essere dose-dipendente e più marcata (circa il 65% di inibizione) rispetto a quella dell'aloenina che invece risultava avere un'azione meno legata alla sua concentrazione. In particolare, la barbaloina sembra avere un effetto di inibizione cellulare rilevante, pari al 46%, anche alla concentrazione di 0,20 mM mentre alle concentrazioni più basse di 0,10 mM l'inibizione è risultata molto inferiore al 50% soprattutto nel caso dell'isobarbaloina.



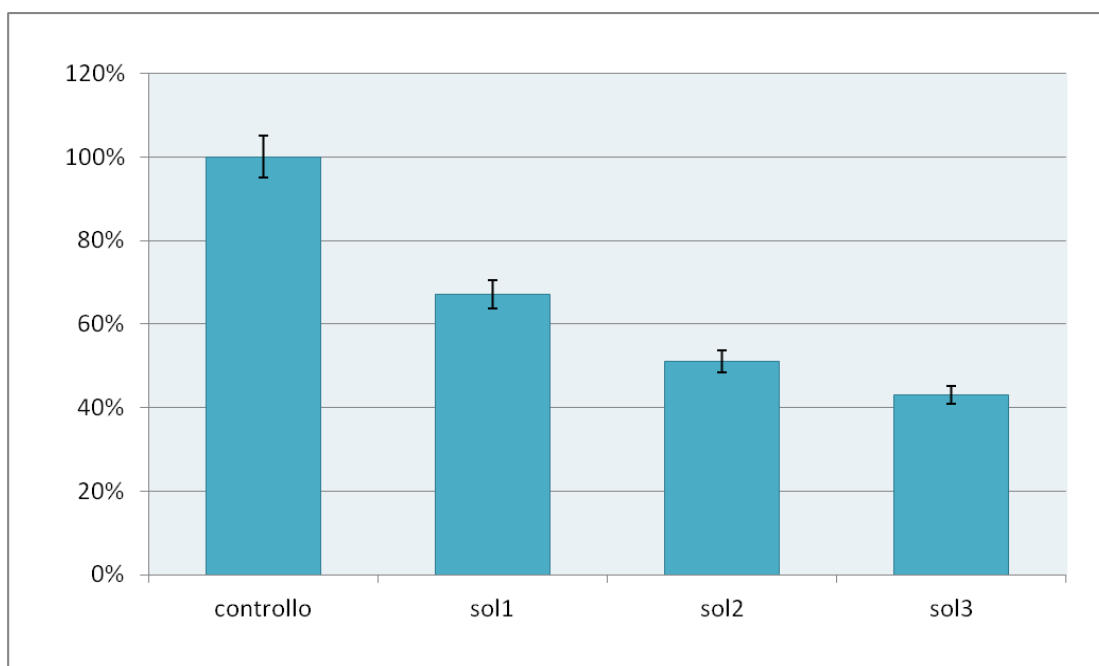
**Fig.24: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule HL60 dopo 20 ore di trattamento con gli standard molecolari a diverse concentrazioni**

### 3.11 Trattamenti delle P3X e HL60 con diverse soluzioni degli standard molecolari

Come riportato in Materiali e Metodi, le cellule di mieloma murino P3X e le cellule della linea umana HL60 sono state trattate con le 9 differenti soluzioni preparate a partire dai singoli standard molecolari a diversa concentrazione, in modo da ricostituire la composizione molecolare dei tre standard così come si trovano nell'estratto e verificare, variandone la concentrazione, il possibile potenziamento dell'effetto inibitorio.

I risultati dei saggi MTT condotti a 20 ore dal trattamento con le diverse miscele sono riportati nella Fig.25 e 26. I test sulle P3X hanno mostrato una inibizione della proliferazione cellulare del 33% rispetto al controllo per quanto riguarda la soluzione 1, in cui le tre molecole sono state miscelate con lo stesso rapporto e alle stesse concentrazioni in cui si trovano nell'estratto di epidermide di *Aloe arborescens*.

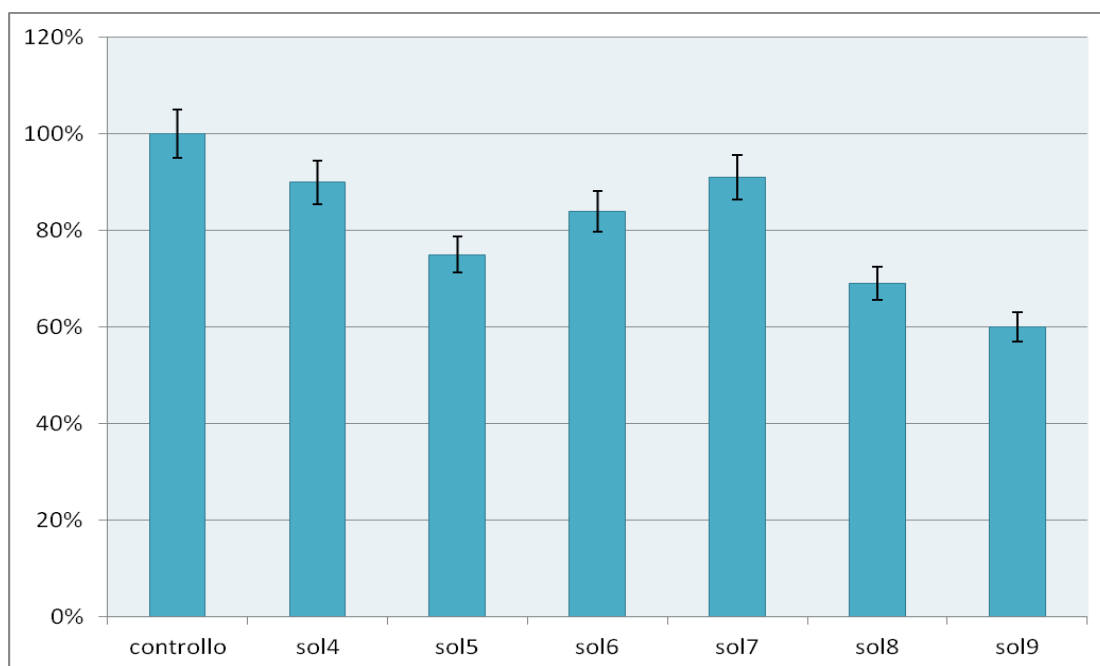
Le cellule trattate con la soluzione 2 mostravano una inibizione della proliferazione del 49%, mentre nelle cellule trattate con la soluzione 3, dove le tre molecole sono ad una concentrazione doppia rispetto alla soluzione 1, si evidenzia una percentuale di inibizione pari al 57%.



**Fig.25: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule P3X dopo 20 ore di trattamento con gli standard molecolari in soluzione**

Le cellule trattate con le soluzioni 4, 5 e 6, dove è stata fatta variare la concentrazione di una molecola per volta lasciando inalterate le altre due, abbiamo ottenuto una inibizione rispettivamente del 10%, 25% e 16%.

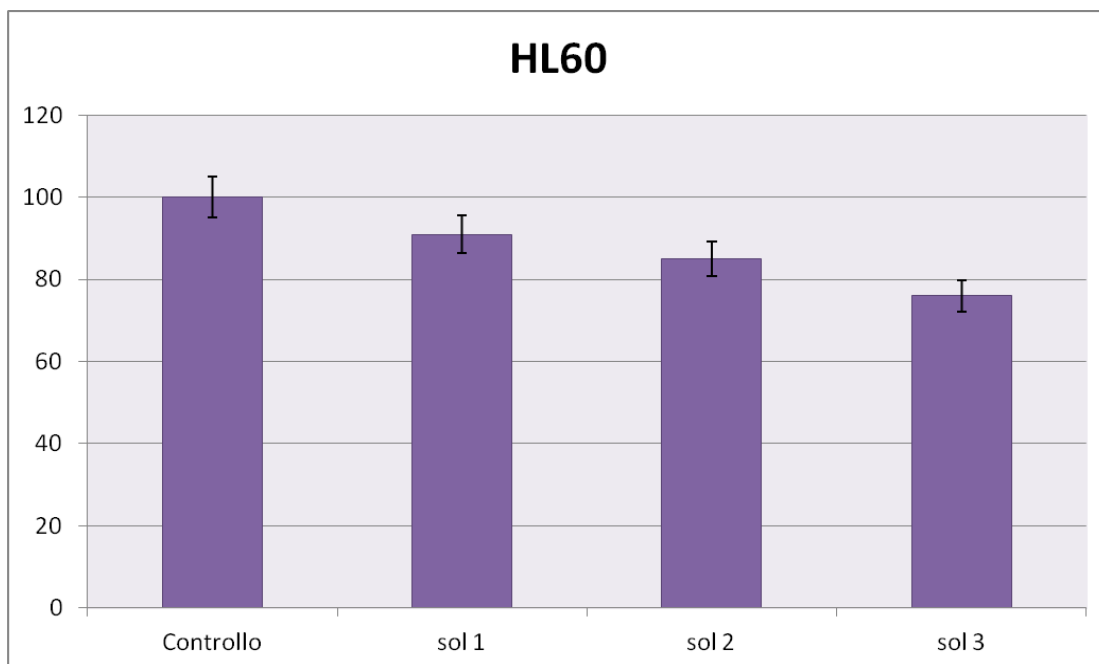
Le cellule trattate con le soluzioni 7, 8 e 9, dove è stata fatta variare la concentrazione di due molecole lasciando inalterata la terza, l'inibizione è risultata rispettivamente pari al 9%, 31% e 40%.



**Fig.26: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule P3X dopo 20 ore di trattamento con gli standard molecolari in soluzione**

I saggi biologici effettuati sulla linea cellulare umana delle HL60, analizzati mediante test MTT a 20 ore dal trattamento con le diverse miscele e riportati in Fig.27 e 28 hanno mostrato una inibizione della proliferazione cellulare del 5% rispetto al controllo per quanto riguarda la soluzione 1, in cui le tre molecole sono state miscelate con lo stesso rapporto e alle stesse concentrazioni in cui si trovano nell'estratto.

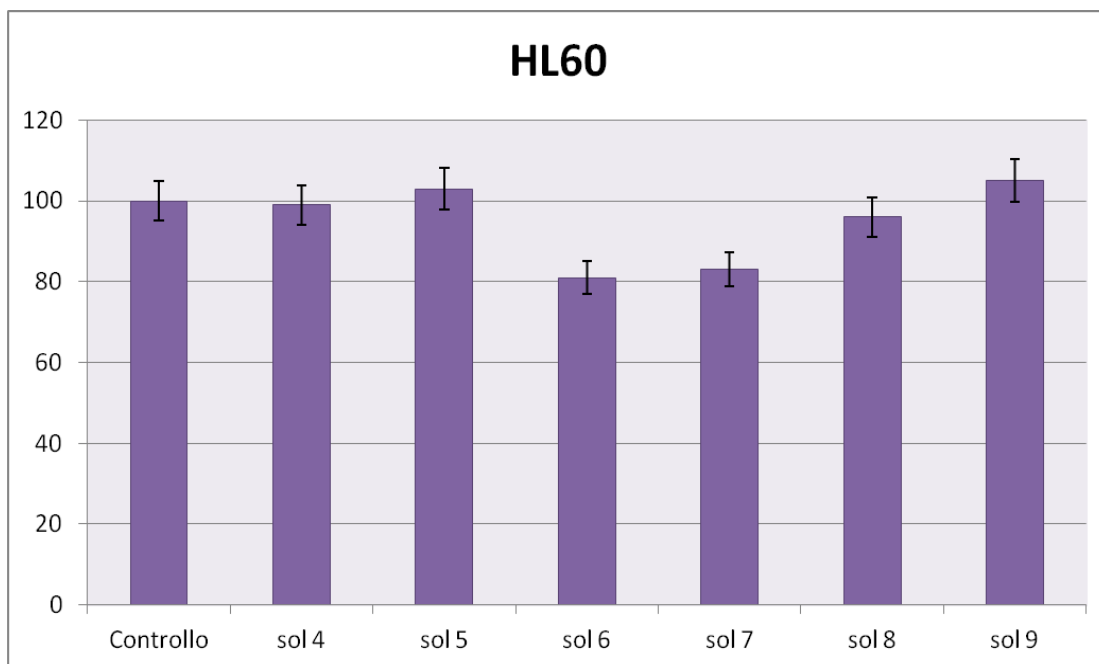
Le cellule trattate con la soluzione 2 mostravano una inibizione della proliferazione del 13%, mentre nelle cellule trattate con la soluzione 3, dove le tre molecole sono ad una concentrazione doppia rispetto alla soluzione 1 si evidenzia una percentuale di inibizione pari al 30%.



**Fig.27: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule HL60 dopo 20 ore di trattamento con gli standard molecolari in soluzione a diverse concentrazioni**

Le cellule trattate con le soluzioni 4 e 6, dove è stata fatta variare la concentrazione di una molecola per volta lasciando inalterate le altre due, è stata ottenuta una inibizione rispettivamente del 19% e 17%. Per quanto riguarda la soluzione 5 non si è avuta inibizione della proliferazione cellulare e le cellule sono risultate ad una percentuale paragonabile al controllo.

Le cellule trattate con la soluzione 7, dove è stata fatta variare la concentrazione di due molecole lasciando inalterata la terza, l'inibizione è risultata rispettivamente pari al 22%, mentre anche nel caso delle soluzioni 8 e 9 come già evidenziato per la soluzione 5, le cellule sono risultate in numero simile al controllo non subendo alcun tipo di inibizione della crescita.



**Fig.28: Grafico relativo al test MTT effettuato su cellule HL60 dopo 20 ore di trattamento con gli standard molecolari in soluzione a diverse concentrazioni**

I risultati ottenuti per entrambe le linee cellulari quindi evidenziano una maggior attività antiproliferativa della miscela 3 dove le molecole sono presenti nello stesso rapporto in cui sono presenti nell'estratto ma ad una concentrazione doppia; l'inibizione ottenuta è risultata comunque più bassa rispetto all'inibizione ottenuta utilizzando l'estratto di Aloe e questo fa supporre la possibile presenza di altre molecole biologicamente attive presenti nell'estratto, che insieme alle tre molecole testate potenziano l'effetto della miscela. Questi dati dimostrano anche l'importanza di mantenere inalterato il rapporto in cui le tre molecole si trovano nella pianta e ciò si evidenzia nell'inefficacia delle soluzioni in cui questo rapporto è stato variato.

## 4 Discussione

Negli ultimi tempi sta notevolmente aumentando l'interesse scientifico, la caratterizzazione e l'applicazione di molecole di origine vegetale (Triggiani et al. 2006) ed una intensa attività di ricerca è stata svolta nel campo delle sostanze naturali al fine di individuare, in particolare, nuove molecole come possibili principi attivi per farmaci. Sin dall'antichità le piante di Aloe sono state usate dall'uomo per le loro proprietà medicinali e di recente molti prodotti farmaceutici a base di Aloe sono presenti sul mercato.

Al fine di fornire nuove conoscenze sia a livello biologico che chimico abbiamo effettuato studi riguardanti l'attività biologica di estratti di epidermide fogliare e di molecole di *Aloe arborescens* su due linee cellulari di mammifero. Gli esperimenti sono stati condotti su cellule di mieloma murino della linea P3X-Ag.653 e su cellule leucemiche umane della linea HL-60.

La prima linea è utilizzata comunemente nella procedura di ottenimento di ibridomi per la produzione di anticorpi monoclonali. Questa linea cellulare è ben conosciuta e da tempo studiata a livello ultrastrutturale, biochimico, molecolare e genetico. Si tratta inoltre di cellule trasformate che rappresentano un buon modello cellulare su cui effettuare esperimenti preliminari in parte poi relazionabili a quelli che si effettuano su cellule di mieloma umane.

La HL-60 (*cellule umane di leucemia promielocitica*) è una linea cellulare leucemica umana che cresce in sospensione, come le cellule della linea P3X, ed è una linea molto utilizzata e ben conosciuta. Sono cellule trasformate e mancano di specifici marcatori per cellule linfoidei ma esprimono recettori di superficie per il frammento e il complemento FC (Gallagher *et al.*, 1979). Manifestano inoltre un'attività di fagocitosi e di risposta a stimoli chemiotattici, possono formare colonie in mezzi semi-solidi e produrre tumori sottocutanei in topi nudi.

La scelta di effettuare l'estrazione in etanolo delle molecole presenti nell'epidermide di *Aloe arborescens* è stata dettata da diverse motivazioni: innanzitutto l'estrazione alcolica ha permesso di denaturare, più o meno parzialmente, le proteine e al tempo stesso di portare in soluzione piccole molecole quali polisaccaridi, alcaloidi nonché lipidi con basso tenore di idrofobicità; in aggiunta, l'alcool ha fornito un effetto sterilizzante nei confronti di funghi e spore fungine che spesso vivono incuneati sotto la cuticola fogliare, negli interstizi tra cellule contigue. Il processo di omogenizzazione ha portato poi ad una

diminuzione della concentrazione alcolica nell'estratto finale: trattandosi di materiale di origine vegetale, infatti, il contenuto di acqua al suo interno è molto elevato, intorno al 98%.

Come chiaramente dimostrato dai test MTT, l'estratto epidermico di *Aloe arborescens* è una fonte potenziale di composti con attività antiproliferativa sia per la linea cellulare di mieloma murino P3X che per le cellule leucemiche umane HL60, anche se in questo caso la percentuale di inibizione è risultata inferiore rispetto a quella ottenuta per le P3X. Dall'analisi delle curve di crescita ottenute mediante saggi di tossicità cellulare MTT è emersa una correlazione dose-effetto dell'estratto su entrambe le linee cellulari.

Al fine di effettuare una valutazione più ampia dell'attività dell'estratto etanologico, sono state condotte indagini a livello citologico, sia su cellule di mieloma murino che sulle cellule leucemiche umane. Come dimostrato da tecniche di immunofluorescenza usando un anticorpo monoclonale per la subunità  $\alpha$  della tubulina applicate su entrambe le due linee cellulari, il confronto tra le cellule di controllo (cellule non trattate) e le cellule trattate, mostra una differente organizzazione microtubulare e il trattamento con l'estratto sembra indurre profonde modificazioni sia all'organizzazione che alla distribuzione dei microtubuli, la scomparsa del centro di origine di microtubuli (il MTOC) e la presenza di una diffusa colorazione fluorescente nel citoplasma, probabilmente legata alla presenza di molecole di tubulina libera non polimerizzata. In particolare, nelle HL60 oltre alla marcata depolimerizzazione microtubulare si riscontra la presenza di un nucleo fortemente frammentato. La distribuzione dei microtubuli all'interno di cellule animali (Del Casino *et al.*, 1994) e vegetali (Del Casino *et al.*, 1992) è stata lungamente studiata ed è ormai chiaro che condizioni di stress (per es. chimico o fisico) ne alterano la caratteristica distribuzione all'interno del citoplasma; in tal senso, le indagini di immunofluorescenza rappresentano un ulteriore elemento di conferma a riguardo il possibile "utilizzo" della componente microtubulare del citoscheletro come target citoplasmatico per la valutazione dell'azione di citotossicità. Questi saggi sono correntemente effettuati nel laboratorio dove è stata svolta questa Tesi. (Mamadalieva *et al.* in press)

Osservazioni effettuate in un lavoro precedente (Bedini Chiara, Tesi di Laurea, aa.2004/2005) avevano evidenziato l'induzione del meccanismo apoptotico nelle cellule della linea P3X, in seguito a trattamento con l'estratto di epidermide di *Aloe arborescens*, mediante una tecnica basata su una miscela di coloranti fluorescenti che consentivano di visualizzare contemporaneamente cellule sane, cellule apoptotiche e cellule necrotiche. Era stato messo in evidenza come l'estratto di epidermide agisse sulle cellule della linea P3X

inducendone la morte per apoptosi rispetto al controllo. Inoltre l'apoptosi mostrava una chiara correlazione con il tempo di trattamento e con la dose di estratto somministrata.

Ciò sembra essere confermato dai dati ottenuti in questa Tesi dagli esperimenti di immunofluorescenza effettuati su cellule trattate utilizzando anticorpi diretti contro la subunità  $\alpha$  della tubulina descritti in precedenza, infatti le alterazioni rilevate rientrano nell'insieme dei cambiamenti cui va incontro il citoplasma durante la cosiddetta "fase esecutiva" dell'apoptosi (Mills *et al.*, 1999).

Per indagare ulteriormente sul meccanismo apoptotico innescato è stata valutata l'espressione della proteina p53. Questa proteina è un oncosoppressore essenziale per prevenire una proliferazione inappropriata delle cellule ed è importante nel mantenimento della stabilità e dell'integrità genomica in quanto modula la risposta cellulare del danno al DNA attraverso la regolazione trascrizionale di geni coinvolti nell'apoptosi, nell'arresto del ciclo cellulare e nel differenziamento (Vousden and Lu, 2002; Oren, 2003). I livelli di p53 sono tenuti bassi dal suo normale turnover di proteolisi da parte dell'ubiquitina ligasi MDM2. (Marine *et al.*, 2006). Una volta attivata, p53 può indurre, a seconda delle circostanze, l'arresto del ciclo cellulare o l'apoptosi. Sembra che alti livelli di p53 possano attivare preferenzialmente i geni apoptotici, i cui promotori, infatti, sono legati da p53 a bassa affinità. Inoltre, modificazioni post-traduzionali di p53 favorirebbero la trascrizione dei geni apoptotici e l'accumulo della proteina nel nucleo in una forma trascrizionalmente attiva (Vousden, 2002). Fondamentale nell'attivazione del meccanismo apoptotico p53-dipendente sembra essere la fosforilazione sul residuo di serina 46, (Oda *et al.*, 2000), o del suo omologo murino, serina 58 (Cecchinelli *et al.*, 2006).

Dai risultati ottenuti in questa Tesi è emersa, nelle cellule P3X trattate con 1,2 mg/ml di estratto epidermico di Aloe, una espressione leggermente maggiore della proteina p53 rispetto alle cellule di controllo, dato confermato anche dalle indagini di immunofluorescenza dove le cellule trattate mostrano una maggiore intensità di marcatura della p53 rispetto al controllo.

Interessante sarebbe andare ad individuare il target cellulare coinvolto nella cascata di reazioni che attivano il meccanismo apoptotico ma la varietà di possibili bersagli molecolari è tale da far ritenere che diversi costituenti l'estratto di Aloe possano agire su recettori diversi. Questo anche in virtù della natura chimica di ciascuno: molecole polari, che non attraversano facilmente la membrana, agiranno probabilmente su recettori di superficie (Ashkenazi *et al.*, 1998), mentre sostanze apolari, che diffondono liberamente

attraverso il plasmalemma, potranno andare ad interagire con enzimi citoplasmatici o nucleari.

Ulteriori informazioni sono emerse dalle indagini di microscopia elettronica condotte al SEM ed al TEM. Le cellule della linea P3X trattate con l'estratto di epidermide fogliare hanno mostrato una riduzione del diametro cellulare e la presenza di lobature e strutture filamentose sulla superficie cellulare; all'interno del citoplasma è stata chiaramente osservata la presenza di vacuoli di grandi dimensioni e strutture membranose riconducibili a processi degenerativi.

Lo stesso tipo di trattamento effettuato sulla linea delle HL60 ha mostrato al SEM ed al TEM profonde modificazioni della struttura esterna e interna della cellula, la presenza di lobature sulla superficie, la scomparsa di strutture filamentose presenti nel controllo ed è ben evidente all'interno della cellula una profonda riorganizzazione sia del nucleo che risulta frammentato, che del citoplasma, mostrando quella che sembra essere una tipica organizzazione di una cellula in apoptosi.

L'innesco di questo tipo di processo a carico di questa linea cellulare era stato individuato in un precedente lavoro di Tesi effettuate presso il nostro laboratorio (Fuschino, Tesi di Laurea aa 2005/2006) in cui per mezzo di analisi al FACS nelle cellule trattate era individuabile una riduzione del picco G0/G1, la presenza del piccolo picco subdiploide, cioè del picco apoptotico che indicava la presenza di cellule in apoptosi, ed un leggero aumento del picco G2/M mitotico.

E' noto che nella maggior parte delle piante la composizione chimica e la concentrazione delle molecole varia in relazione sia all'ambiente che alla stagione. Si tratta di metaboliti prodotti dal metabolismo primario della pianta e anche molecole prodotte dal metabolismo secondario della pianta; la diversa distribuzione di tali metaboliti può essere diversa anche nelle varie parti della foglia e può dipendere dall'età della pianta, dalla posizione della foglia sulla pianta e dal suo orientamento. Questo aspetto è stato evidenziato anche nelle foglie della pianta di *Aloe arborescens*. (Beppu et al., 2004). Il contenuto di molecole come aloenina e barbaloina nella pianta di Aloe è distribuito sulla foglia diversamente; va diminuendo dall'apice alla base della foglia e diminuisce anche nelle foglie orientate verso l'alto rispetto a quelle orientate verso il basso (Gutterman et al., 2000).

E' da notare anche che parametri antropici e/o ambientali possono avere effetti su queste molecole. Dopo una frequente potatura, nelle foglie il contenuto di questi metaboliti polifenolici può risultare incrementato notevolmente; durante la conservazione in acqua ci può essere una rapida degradazione di aloenina ed una lenta degradazione di barbaloina e

isobarbaloina ed infatti il contenuto di barbaloina nei prodotti liquidi diminuisce del 50% dopo una conservazione per un mese al freddo e al buio. (Yasuda et al., 1997). Il contenuto di aloenina decresce dell'85% durante un giorno di conservazione delle molecole polverizzate in acqua. Quando queste sostanze sono conservate seccate in polvere possono mantenere la loro struttura chimica inalterata per molti anni (Gutterman, 2000).

Sulla base di queste acquisizioni scientifiche e la diretta osservazione della non semplice riproducibilità dei saggi effettuati durante lo svolgimento della Tesi, esperimenti sono stati mirati al tentativo di svincolarsi dalla pianta e dalle sue variazioni fenologiche, investigare sulle possibili molecole con azione biologica contenute nell'estratto e valutare se l'attività dell'estratto di epidermide fogliare fosse imputabile a singole molecole o invece al cosiddetto fitocomplesso (insieme di molecole cooperanti nell'attuazione dell'effetto biologico), tentando quindi di ricostituire *in vitro* la composizione e l'attività tramite standard molecolari, ricostituendo almeno in parte il fitocomplesso e tentando, mutando i rapporti stechiometrici tra molecole, di potenziarne l'azione.

Al tal fine, abbiamo effettuato indagini di cromatografia su strato sottile (TLC) per effettuare una preliminare separazione chimica di gruppi di molecole (spot) e dopo i saggi biologici dei singoli spot sulle due linee cellulari, analizzati mediante test MTT, siamo stati in grado di confermare che nessuno degli spot testati aveva un'attività riconducibile per intero a quella dell'estratto etanolic di epidermide; lo Spot E però risultava essere lo *spot* con maggiore attività antiproliferativa sia sulle cellule P3X che sulle HL60, anche se altri spot mostravano comunque attività antiproliferativa seppur meno marcata. Il fatto che l'attività dello Spot E sulle cellule sia risultato inferiore rispetto alla attività dell'estratto di epidermide fogliare, riconduce all'idea che più molecole in sinergia potrebbero essere responsabili dell'effetto di inibizione della proliferazione cellulare; tale attività antiproliferativa quindi potrebbe dipendere anche da altre molecole presenti nell'estratto di epidermide di foglie che, insieme a quelle presenti nello spot E, vanno a costituire, il cosiddetto fitocomplesso attivo sulle nostre due linee cellulari.

Per mezzo della cromatografia liquida ad alta prestazione HPLC, l'estratto etanolic di epidermide è risultato essere costituito principalmente da 4 picchi, risultato confermato anche dalla bibliografia (Kuzuya et al. 2001).

Tramite analisi di spettrometria di massa, effettuate mediante la collaborazione con laboratori di Toscana Life Science a Siena, è emerso che nell'estratto sono presenti principalmente quattro molecole riconducibili ai quattro picchi riscontrati mediante HPLC:

**aloenina, isobarbaloina, barbaloina, 2'-O-feruloylaloesina**

Mediante la collaborazione con i laboratori dell'Istituto di Chimica delle Sostanze Naturali dell'Università di Milano è stato possibile effettuare l'analisi NMR dello spot E ed in questo spot è emersa la presenza di tre molecole: **aloenina**, **barbaloina (Aloina A)** e **isobarbaloina (Aloina B)**.

Tali molecole sono già state studiate su altri modelli cellulari. Come per altri antrachinoni anche per l'aloina sono state segnalate azioni biologiche che comportano alterazioni del ciclo cellulare in fase M (Esmat et al., 2005) e questa sembra indurre apoptosi attraverso l'inibizione del ciclo cellulare tramite down-regolazione della ciclina B1 (Esmat et al., 2006). A causa dei diversi meccanismi cellulari coinvolti nei due processi apoptotici (mitocondrio dipendente e non), la determinazione se la tossicità dell'aloina coinvolga i mitocondri o meno, potrebbe consentire previsioni riguardo ad eventuali effetti sistemici di tossicità per la valutazione di un potenziale utilizzo terapeutico. Per esempio potrebbe consentire il trattamento di tossicità aloe-indotta con sostanze che inibiscono l'apoptosi, a livello dei mitocondri, come gli inibitori della proteasi (Weaver et al., 2005). In studi condotti sui fibroblasti mai sottoposti a incubazione con 500  $\mu$ M di aloina A e irradiati con UVA non si è notata fototossicità cosa notata con l'aloe emodina. (Wayne et al., 2003).

Il trattamento con aloina sulle cellule Jurkat ha comportato una riduzione delle dimensioni delle cellule, compromessa l'integrità della membrana, e la perdita di potenziale della membrana mitocondriale in modo dose-dipendente. Inoltre, il trattamento con aloina ha comportato alterazione del ciclo cellulare, in particolare un blocco in fase G2 / M. È importante sottolineare che la perdita di integrità delle membrane cellulari è stata preceduta da una perdita di potenziale di membrana mitocondriale, suggerendo l'insorgere di un processo apoptotico mitocondrio-dipendente indotto dall'aloina. (Buenz et al. 2008)

E' stato anche riportato l'effetto antiossidante dell'aloina sul DNA (Bing 2004), mentre aloina A, aloina B e la sua derivata aloe emodina sono segnalati per avere effetti anti-infiammatori (Yamamoto et al. 1991) e attività antitumorale (Shimpo et al. 2003)

Al fine di ricostruire parzialmente l'estratto nella composizione chimica e valutarne la relativa attività biologica si è proceduto, dopo uno studio sulle concentrazioni delle molecole ed sul loro rapporto stechiometrico, ai saggi con le tre molecole individuate come facenti parte dell'estratto: aloenina, barbaloina e isobarbaloina.

Come mostrato dalle indagini NMR, queste tre molecole sono anche le componenti dello spot E e saggi biologici condotti con questo spot hanno evidenziato una certa attività inibitoria della proliferazione sulle cellule di mieloma murino e sulla linea HL60.

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando le tre molecole eluite in etanolo. L'uso di antrachinoni solubilizzati in etanolo e poi successivamente saggiati su linee cellulari è riportato in letteratura (Alves D.S. *et al.*, 2004).

Dagli esperimenti effettuati trattando le cellule P3X e le HL60 con le singole molecole è risultato evidente che la barbaloina e l'isobarbaloina hanno una attività antiproliferativa dose-dipendente, L'aloenina presenta questa attività dose-dipendente in modo meno marcato.

I test eseguiti sulle cellule P3X e HL60 trattate con le singole molecole alla stessa concentrazione in cui queste si ritrovano nell'estratto hanno mostrato una inibizione della proliferazione cellulare inferiore rispetto all'estratto. I test successivi effettuati cercando di ricostruire esattamente la concentrazione e i rapporti stechiometrici in cui le tre molecole si ritrovano nell'estratto, variandone però la concentrazione totale, mostrano che il valore più elevato della percentuale di inibizione cellulare era riscontrabile nel trattamento delle cellule con la soluzione 3, dove le molecole si trovavano nello stesso rapporto stechiometrico in cui sono presenti nell'estratto ma ad una concentrazione maggiore. Questa soluzione è risultata maggiormente attiva sia sulla linea P3X che sulle HL60 ma comunque in misura minore rispetto all'estratto etanolico questo poteva essere imputato al fatto che le molecole commercializzate nel corso dei processi di purificazione e di stoccaggio subiscono dei danni di natura ossidativa che ne compromettono la funzionalità biologica; oppure tale dato poteva confermare quanto detto in precedenza ossia che l'estratto *in vivo* potrebbe avere più efficacia poiché in esso sono presenti anche altre molecole che favoriscono l'esplicazione dell'attività citotossica sulle cellule.

Al fine di comprendere se il valore dell'attività antiproliferativa poteva essere incrementato variando le concentrazioni delle singole molecole nella miscela e variando conseguentemente i rapporti stechiometrici tra le tre molecole, sono stati effettuati saggi MTT di cellule di mieloma murino sottoposte a trattamenti con soluzioni contenenti le molecole: aloenina barbaloina, e isobarbaloina, variando la concentrazione di una o due di esse tenendo a riferimento la loro concentrazione nell'estratto, ed è emerso che come si alterano i rapporti stechiometrici tra le molecole l'attività della soluzione sembra diminuire. Questo non solo rafforza l'idea della esplicazione di attività biologica dipendente dal fitocomplesso nella sua totalità ma è una dimostrazione che le molecole devono anche mantenere un rapporto di concentrazione ben preciso tra di loro per poter far sì che il fitocomplesso sia attivo sulle cellule e innescare meccanismi di morte cellulare.

## CAPITOLO 2

### 1 INTRODUZIONE

La farmacoresistenza (multidrug resistance, MDR) è una delle principali cause del fallimento della terapia chemioterapica; nell'organismo umano si assiste infatti alla continua insorgenza di forme tumorali resistenti ad un ampio spettro di chemioterapici strutturalmente e funzionalmente diversi. La "resistenza multipla ai farmaci antitumorali" può essere considerata come conseguenza di un ridotto influsso del farmaco, di un incremento dell'efflusso o di entrambi (Gerlach et al., 1986). Nella maggior parte dei casi questa resistenza multipla è correlata all'attività della glicoproteina-P (P-gp) (Fig.1) oppure, tra i meccanismi non P-gp dipendenti, è possibile citare la resistenza associata ad una diminuzione od alterazione dell'attività della topoisomerasi II, (Kaufmann et al., 1998), quelli associati ad una risposta apoptotica modificata dovuta ad una diversa espressione di Bcl-2 (Jia et al., 1999), ed altri associati all'espressione e funzione alterate della p-53 (Wattel et al., 1994). E' stata scoperta per la prima volta nelle linee cellulari dell'ovaio del criceto (CHO) resistenti alla colchicina. Esistono tre classi di glicoproteina P: le prime due hanno la capacità di trasportare i farmaci e, quando sono sovraesprese, sono in grado di indurre la multifarmacoresistenza mentre, la classe III della P-gp non è in relazione con la resistenza a farmaci. Il genoma umano contiene solo le classi I e III della P-gp, chiamate anche *mdr1* o *ABCB1* e *mdr3* o *ABCB4*; nei roditori, invece, sono presenti tutti e tre le classi (Zhang, 2001). La farmacoresistenza mediata dalla P-gp costituisce la forma di multidrug resistance aspecifica (MDR-P-gp) più frequente e anche più studiata. La P-gp, codificata dal gene *MDR1* situato sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q21.1), è una glicoproteina di membrana, ad alto peso molecolare (circa 170 kD), localizzata sia sul plasmalemma sia sulle membrane degli organelli citoplasmatici che la cellula utilizza come pompa di efflusso ATP-dipendente per diversi farmaci. La P-gp ha una struttura pseudo-dimerica ed il suo ruolo fisiologico è quello di espellere dalla cellula diversi substrati, quali piccole molecole idrofobiche, ormoni steroidei, peptidi lipofilici, ma soprattutto gli xenobiotici. È costituita da 1280 aminoacidi organizzati in due unità ripetute di 610 aminoacidi unite da una regione linker di circa 60 aminoacidi. In ciascuna unità ci sono 6 domini transmembrana (TMD) e un dominio idrofilico legante il nucleotide (NBD)

localizzato esternamente alla faccia citoplasmatica della membrana. La proteina è composta di due dimeri di ugual peso con alta omologia di sequenza soprattutto nella regione C-terminale. Internamente alla proteina si trovano 12 regioni idrofobiche che corrispondono alle zone di attraversamento della membrana cellulare e, grazie all'analisi della struttura primaria, sono stati evidenziati 8 siti potenzialmente glicosilabili di cui 5 posti nella regione N-terminale. L'aggiunta di inibitori specifici della glicosilazione N-terminale impedisce i processi di modificazione post-traduzionale della proteina. Il tempo di dimezzamento della proteina è superiore alle 24 ore. Un altro dato importante è la presenza di due siti di legame per l'ATP posti in ciascuna metà della proteina sull'estremità carbossi-terminale. Quando non legano il nucleotide i domini transmembrana formano una struttura a forma di botte di 5-6 nm di diametro e 5nm di altezza, con un poro che si apre verso la superficie extracellulare. Dopo aver legato il nucleotide, i domini transmembrana sembrano riorganizzarsi per aprire il poro centrale in maniera tale da permettere l'accesso per il trasporto del substrato (Chan et al., 2006). Generalmente la sovraespressione della proteina è legata ad un processo di amplificazione genica, cioè ad un aumento del numero di copie del gene (Kakehi *et al.*, 1988). Poiché la P-gp espelle dalla cellula molecole lipofile, l'aumento di attività conseguente all'incremento del numero di trasportatori sulla membrana impedisce l'accumulo dei chemioterapici all'interno delle cellule tumorali e determina l'espressione del fenotipo di resistenza.

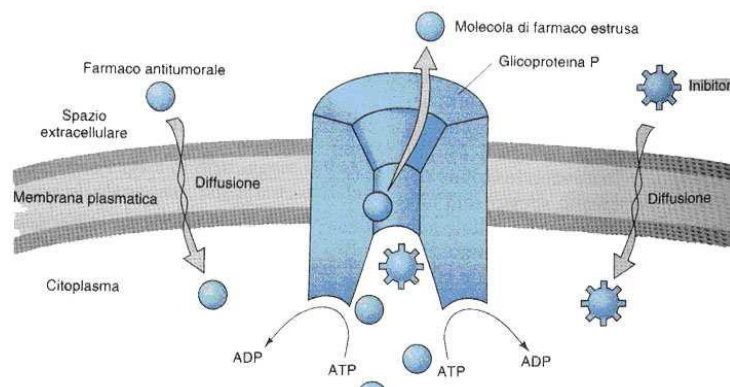


Fig.1. Rappresentazione schematica della P-gp

## **2 MATERIALI E METODI**

### **2.1 Isolamento di cellule resistenti al trattamento prolungato con estratto di epidermide a basse concentrazioni**

Le cellule di mieloma murino sono state sottoposte a trattamenti prolungati con basse dosi di estratto al fine di isolare cellule resistenti al trattamento e di caratterizzarle poi morfologicamente e biochimicamente. I campioni comprendevano cellule di controllo non trattate e cellule trattate rispettivamente con 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml e con 1,2 mg/ml di estratto per 15 giorni.

Per ogni campione sono state seminate 100.000 cellule/ml di DMEM in piastre da 96 pozzetti (200 µl/pozzetto).

E' stato importante effettuare saggi MTT, condotti al tempo 0, a 24, 48, 72 e 96 ore dall'inizio del trattamento per valutare l'effetto dell' estratto.

L'estratto veniva somministrato ogni 24 ore e ogni due giorni alle cellule veniva sostituito il terreno ormai esausto con terreno fresco.

Al 15° giorno le cellule sono state riseminate 100.000 per ml di terreno di coltura ed è stata effettuata la somministrazione della dose massiccia dell'estratto di epidermide di *Aloe* per osservare le differenze di risposta cellulare tra quelle che avevano subito il trattamento prolungato e quelle che invece non avevano avuto nessun trattamento.

### **2.2 Attività biologica del mezzo di coltura di cellule di mieloma murino sottoposte a trattamenti prolungati di estratto.**

Per determinare se le cellule "resistenti", dopo il trattamento prolungato con l'estratto a basse dosi potessero rilasciare nel medium una particolare molecola-segnaie in grado di stimolare la resistenza nelle cellule mai trattate con l'estratto. Cellule di mieloma murino di controllo e cellule "resistenti" sono state seminate in numero pari a 100.000 per ml di DMEM dopo un lavaggio in pbs in due fiasche distinte.

Dopo 4 ore di incubazione, le cellule sono state di nuovo prelevate e centrifugate, è stato prelevato il sopranatante delle cellule "resistenti" ed è stato aggiunto alle cellule P3X di

controllo (che non erano mai entrate in contatto con l'estratto di epidermide di foglie di Aloe).

Dopo 24 ore le cellule di controllo e cellule messe a contatto con il medium di quelle resistenti sono state trattate con dose massiccia di estratto (1,2 mg/ml).

Dopo 20 ore è stato effettuato il test MTT e saggi di immunofluorescenza alle cellule di mieloma murino denominate rispettivamente "resistenti" e "indotte" e a cellule di controllo.

### **2.3 Immunofluorescenza su cellule di mieloma murino (P3X) – Visualizzazione dell' $\alpha$ -tubulina, della glicoproteina P e della p53**

L'immunofluorescenza è stata effettuata su cellule P3X di controllo, cellule "resistenti" e cellule "indotte".

La procedura utilizzata è la stessa descritta precedentemente in questa Tesi (cap 1- Materiali e Metodi).

I campioni sono stati incubati con anticorpo monoclonale primario per la subunità  $\alpha$ -tubulina (Amersham, UK) diluito 1:400 in tampone bloccante.

Per la glicoproteina P è stato invece utilizzato un anticorpo monoclonale C219 (Abcam plc, UK), diluito 1:100 in tampone bloccante (BSA).

In entrambi i casi è stato usato un anticorpo secondario policlonale coniugato con Fluoresceina IsoTioCianato (Alexa Fluor 594) diretta contro le IgG di topo, diluito 1:100 in tampone bloccante BSA.

L'anticorpo utilizzato FL393 (Santa Cruz Biotechnology, Inc), diretto contro la proteina p53 è stato diluito 1:100 in tampone bloccante (BSA).

Come secondario è stato utilizzato un anticorpo policlonale coniugato con rodamina diretto contro le IgG di coniglio (Alexa Fluor 488), diluito 1:100 in tampone bloccante (BSA).

Le immagini sono state prese utilizzando un Microscopio Axiophot 2 dotato di una videocamera a colori (AxioCam MRC) e un software AxioVision.

Mediante il software dell'analizzatore di immagini è stato possibile effettuare una misurazione dei diametri sia delle cellule di controllo che delle cellule "resistenti".

## **2.4 Western Blot**

Il Western Blot è stato effettuato in collaborazione con il Dottor Giampiero Cai dell'Università degli Studi di Siena. La procedura impiegata è la stessa descritta precedentemente in questa Tesi (cap 1-Materiali e Metodi)

Gli anticorpi utilizzati sono stati gli stessi impiegati nell'immunofluorescenza diluiti 1:500. Dopo l'immunoblotting, l'intensità delle bande è stata calcolata con il software Quantity One ed espressa come Integrated Density (ID). Il software effettua una misura dell'intensità delle bande rispetto a un valore di fondo, che è il background del blot, e ne calcola la differenza di intensità. Il Western blot per la P-gp è stato effettuato su cellule P3X di controllo, cellule "resistenti" e cellule "indotte". Sono stati caricati 28 µg di proteine per lane. Lo stesso saggio è stato effettuato sullo stesso tipo di campioni per valutare l'espressione della p53 e sono stati caricati 30 µg di proteine per lane.

## **2.5 Microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM)**

Le indagini di microscopia elettronica sono state effettuate presso il centro di microscopia elettronica dell'Università della Tuscia di Viterbo (CIME) dalla Dott.ssa Anna Rita Taddei. Circa 3.000.000 cellule delle linee P3X sono state seminate in 30 ml di DMEM in fiasche da 75 cm<sup>3</sup>. Le analisi di microscopia elettronica sono state effettuate su cellule P3X di controllo e su cellule "resistenti" e cellule "indotte" ottenute come descritto in precedenza. I campioni sono stati trattati utilizzando la stessa procedura descritta precedentemente in questa Tesi ed osservate con un microscopio elettronico a scansione JEOL 1200 EX II e con un microscopio elettronico a trasmissione.JSM JEOL 5.200.

## **2.6 Trattamento cellulare con Vinblastina**

Le cellule della linea P3X non trattate e "cellule resistenti" al trattamento massiccio con estratto di Aloe, sono state seminate in piastre da 96 pozzetti ad una concentrazione pari a 100.000 cellule/ml di DMEM.

Le cellule sono state incubate per 24h con vinblastina (Vinblastine sulfate salt - Sigma aldrich) 1µg/ml e 2µg/ml solubilizzata in DMSO e successivamente sottoposte a saggio MTT.

### 3 RISULTATI

#### 3.1 Curve di crescita di cellule P3X sottoposte a trattamento prolungato

In Fig.2 è riportato il grafico relativo alle curve di crescita di cellule P3X sottoposte ad un trattamento prolungato con basse concentrazioni di estratto di epidermide di aloe e monitorate periodicamente con saggi MTT. In questo modo è stato possibile valutare l'effetto dell'estratto somministrato a basse concentrazioni per lungo tempo.

Come si può notare, le cellule trattate con dosi elevate di estratto (0.6 mg/ml e 1,2 mg/ml) sono andate rapidamente incontro ad una netta riduzione di numero e, dopo circa 96 ore di trattamento, sono risultate praticamente tutte morte.

Nei trattati con 0.3 mg/ml di estratto, invece, il numero di cellule si è ridotto molto meno drasticamente, e a 72 ore dal trattamento si è potuto notare un incremento nella proliferazione cellulare.

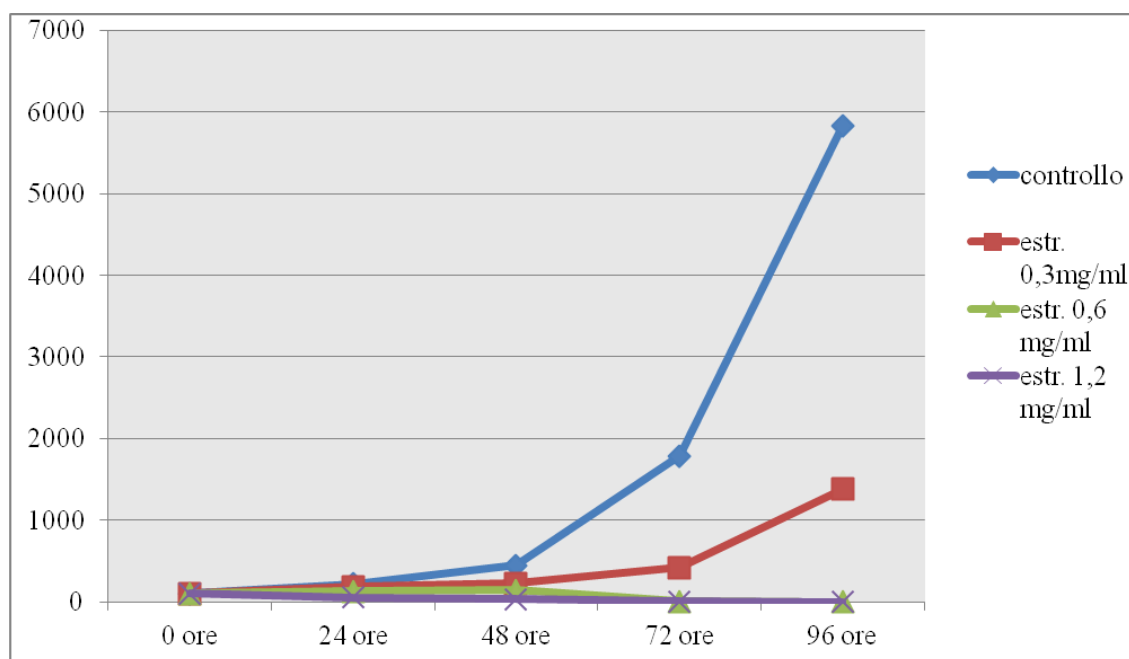
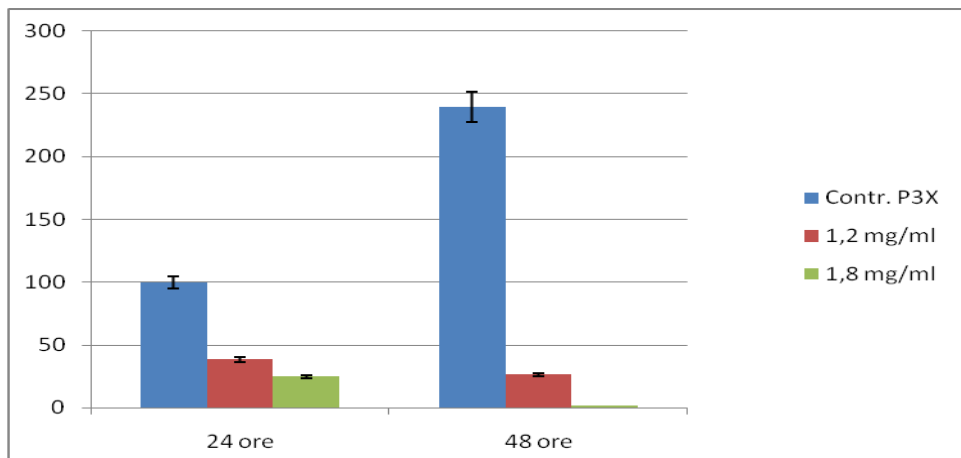


Fig.2 : Grafico relativo alla percentuale di cellule P3X vive a 20h e 40h dal trattamento

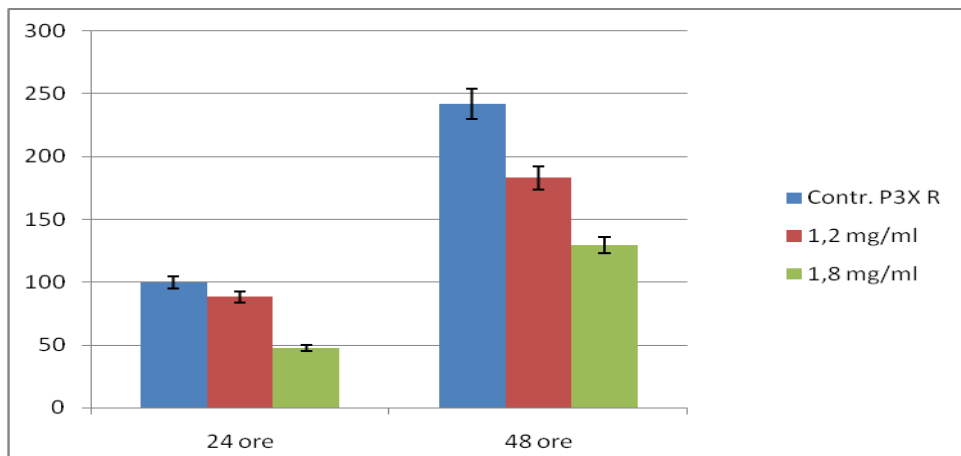
Al fine di valutare se questo fenomeno fosse dovuto all'induzione di un fenotipo di resistenza in queste cellule o se invece fosse imputabile ad una dose troppo bassa di estratto, non sufficiente per indurre la morte cellulare, queste cellule sono state successivamente sottoposte a trattamenti con dosi maggiori, con 1,2 mg/ml e 1,8 mg/ml.

Dal grafico (Fig.3) si evidenzia che le cellule di controllo trattate con 1,2 mg/ml e con 1,8 mg/ml di estratto dopo 24 ore dal trattamento avevano subito una riduzione rispettivamente del 85% e del 91% rispetto al controllo delle cellule non trattate; e a 48 ore dell'92% e del 98% circa.

Le cellule "resistenti" (Fig.4) invece avevano subito una riduzione, con 1,2 mg/ml di estratto, solo del 12% a 24 ore dal trattamento e del 25% a 48 ore; mentre con il trattamento di 1,8 mg/ml di estratto l'inibizione subita a 24 e 48 ore è stata pari a al 54% e del 47% rispettivamente.



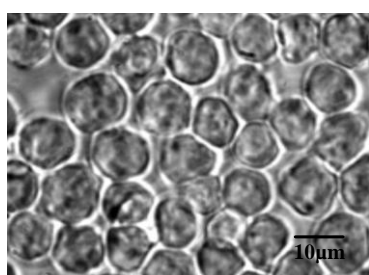
**Fig.3:Grafico relativo ai test MTT effettuati su cellule P3X trattate con estratto di Aloe**



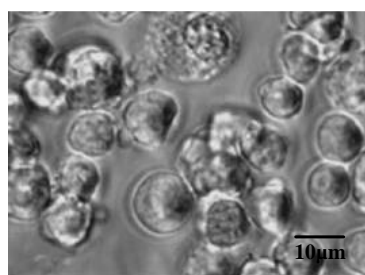
**Fig.4:Grafico relativo ai test MTT effettuati su cellule P3X "resistenti" trattate con estratto di Aloe**

Questo dimostrava che le cellule che hanno subito un trattamento prolungato con basse dosi, diventano meno sensibili alla somministrazione di dosi massicce di estratto di quelle non sottoposte al trattamento, acquisendo quindi una resistenza a successivi trattamenti.

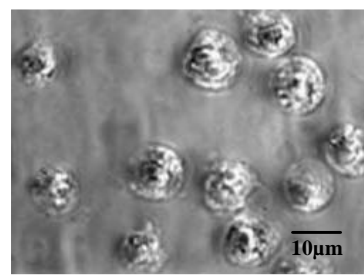
Questo tipo di risposta corrisponde anche ad un cambiamento morfologico della cellula riscontrabile al microscopio ottico dove le cellule resistenti apparivano di dimensioni maggiori (Fig.5d) rispetto al controllo (Fig.5a), e tendevano a formare dei “grappoli” in sospensione, indicazione di una condizione di crescita ottimale.



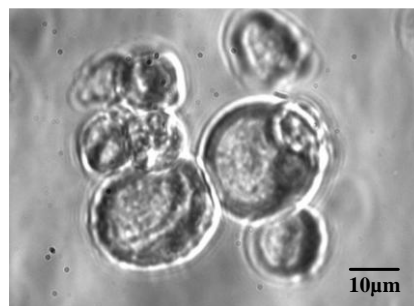
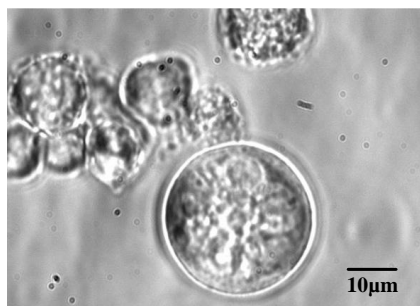
5a. P3X - controllo



5b. P3X - 0.3 mg/ml di estr



5c. P3X - 1.2 mg/ml di estr



5d. P3X - Sottoposte al trattamento prolungato

**Fig.5: Immagini al microscopio ottico (40X) di cellule P3X**

## **3.2 Microscopia elettronica**

### **3.2.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

Le indagini sono state condotte al microscopio elettronico a scansione su cellule P3X di controllo (non trattate) e su cellule P3X sottoposte al trattamento prolungato. Come si può notare dalla Fig.6a le cellule di mieloma non trattate presentano una forma sferoidale, con un diametro che oscilla tra gli 8 e i 10  $\mu\text{m}$ . All'interno della popolazione si possono riconoscere due differenti tipologie cellulari: una caratterizzata in superficie da numerose lobature più o meno profonde, l'altra riconoscibile per il minor numero di protuberanze e la presenza di piccole strutture filamentose; non sappiamo se le due tipologie possano essere correlate a stadi diversi del ciclo cellulare.

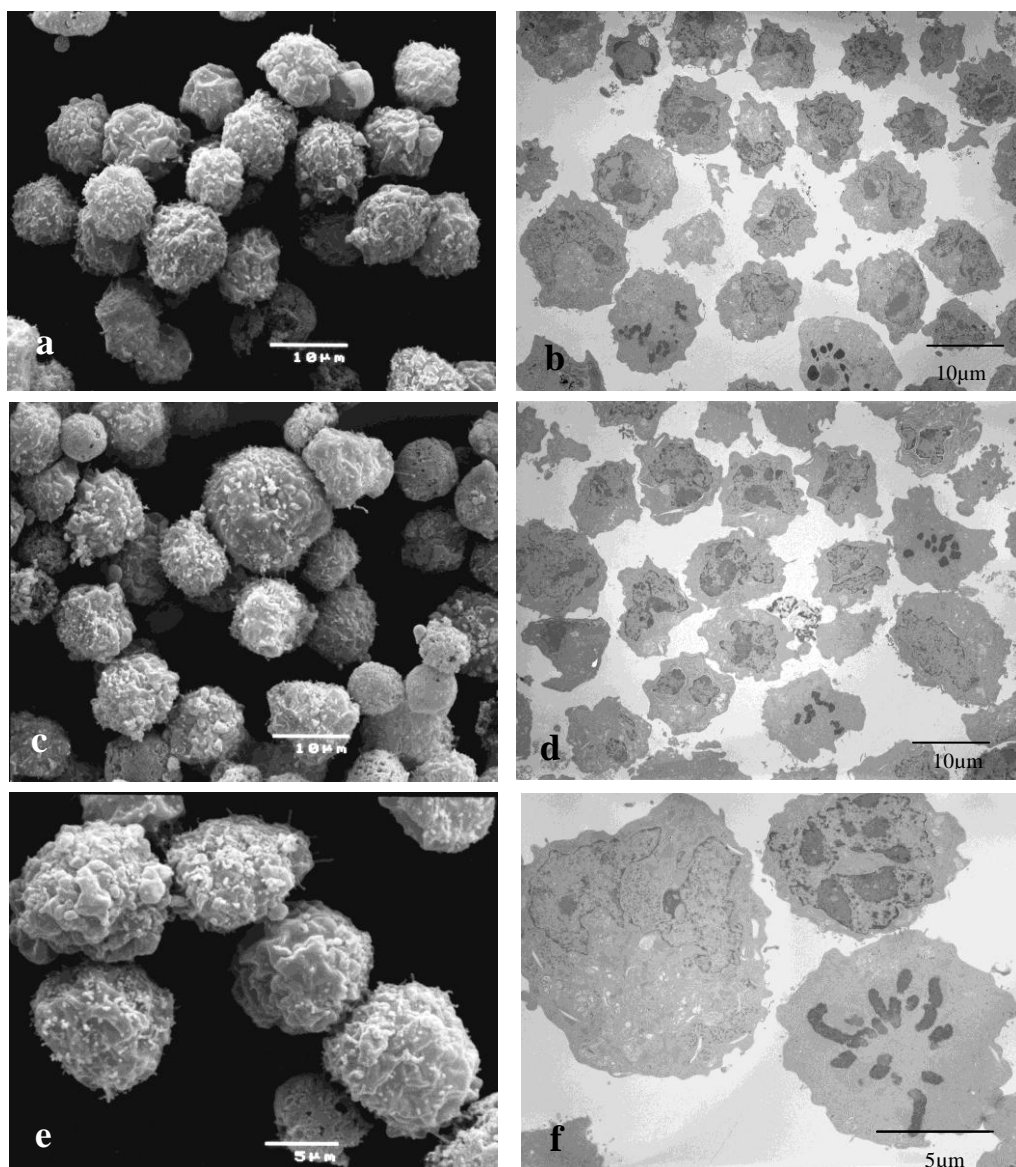
Le cellule di mieloma sottoposte a trattamento prolungato (Fig.6c, 6e) con basse dosi di estratto di epidermide di *Aloe arborescens*, come si può notare, per la maggior parte mantengono una morfologia simile a quella riscontrata nelle cellule di controllo. Si possono distinguere cellule appartenenti alle due fondamentali tipologie cellulari anche se appare aumentato il numero di quelle caratterizzate da protuberanze in superficie. E' evidente un aumento delle dimensioni cellulari rispetto al controllo, con un diametro che raggiunge anche i 15-20  $\mu\text{m}$ . Anche le osservazioni preliminari condotte al microscopio ottico avevano messo in evidenza un aumento di dimensioni in queste cellule resistenti a trattamenti prolungati con basse dosi di estratto.

### **3.2.2 Microscopia elettronica a trasmissione**

Le osservazioni di cellule di controllo e resistenti sono state effettuate anche al microscopio elettronico a trasmissione. In Fig.6b sono visibili cellule di controllo: anche in questo caso si possono distinguere cellule appartenenti alle due tipologie cellulari già osservate al SEM a seconda che sulla superficie presentino lobature, più o meno

pronunciate, o strutture filamentose. Le cellule presentano un grosso nucleo, che in alcuni casi occupa fino ai 2/3 della sezione e al cui interno è visibile cromatina disaggregata.

In Fig.6d sono riportate cellule sottoposte al trattamento prolungato con estratto di epidermide. Si notano alcuni frammenti cellulari, residui di cellule morte e, tra le cellule vive, se ne distinguono alcune in cui la superficie cellulare risulta frastagliata e la cromatina nel nucleo si presenta maggiormente condensata in alcune zone. Si evidenziano nella Fig.6f cellule in attiva divisione mitotica, caratterizzate dalla presenza dei cromosomi visibili come entità distinte nel nucleo e questo dimostra che le cellule sopravvissute al trattamento sono in grado di proliferare normalmente anche in presenza dell'estratto.

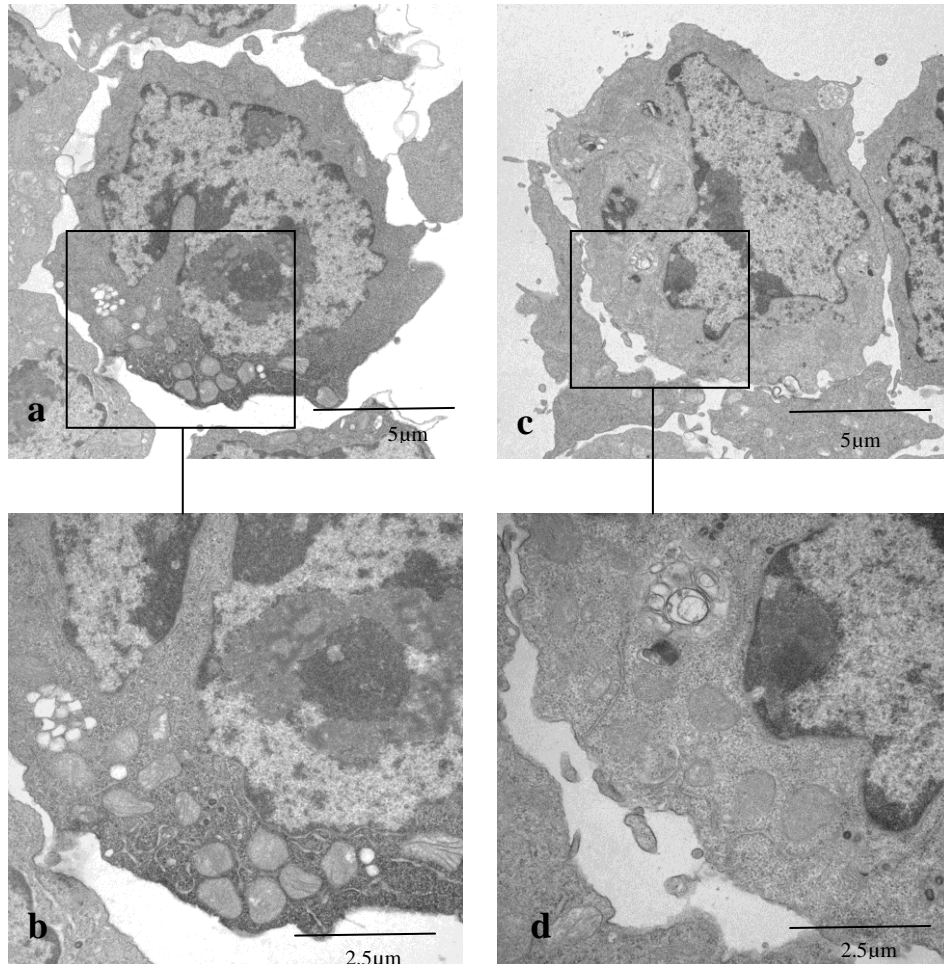


**Fig.6: Immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) di cellule P3X**

**a,b)** SEM e TEM di cellule P3X di controllo

**c,e,d,f)** SEM e TEM di cellule P3X sottoposte al trattamento prolungato con 0,3 mg/ml di estratto di aloe

Nel citoplasma compaiono inclusioni membranose (Fig.7c, 7d) di forma semicircolare, spesso racchiuse in vescicole, mentre nel citoplasma delle cellule di controllo sono riconoscibili tutta una serie di organelli e numerose vescicole (Fig.7a, 7b)



**Fig.7: Immagini al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di cellule P3X**

**a,b)** TEM di cellule P3X di controllo

**c,d)** TEM di cellule P3X sottoposte al trattamento prolungato con 0,3 mg/ml di estratto di aloe

### 3.3 Studi di immunofluorescenza su cellule “resistenti”

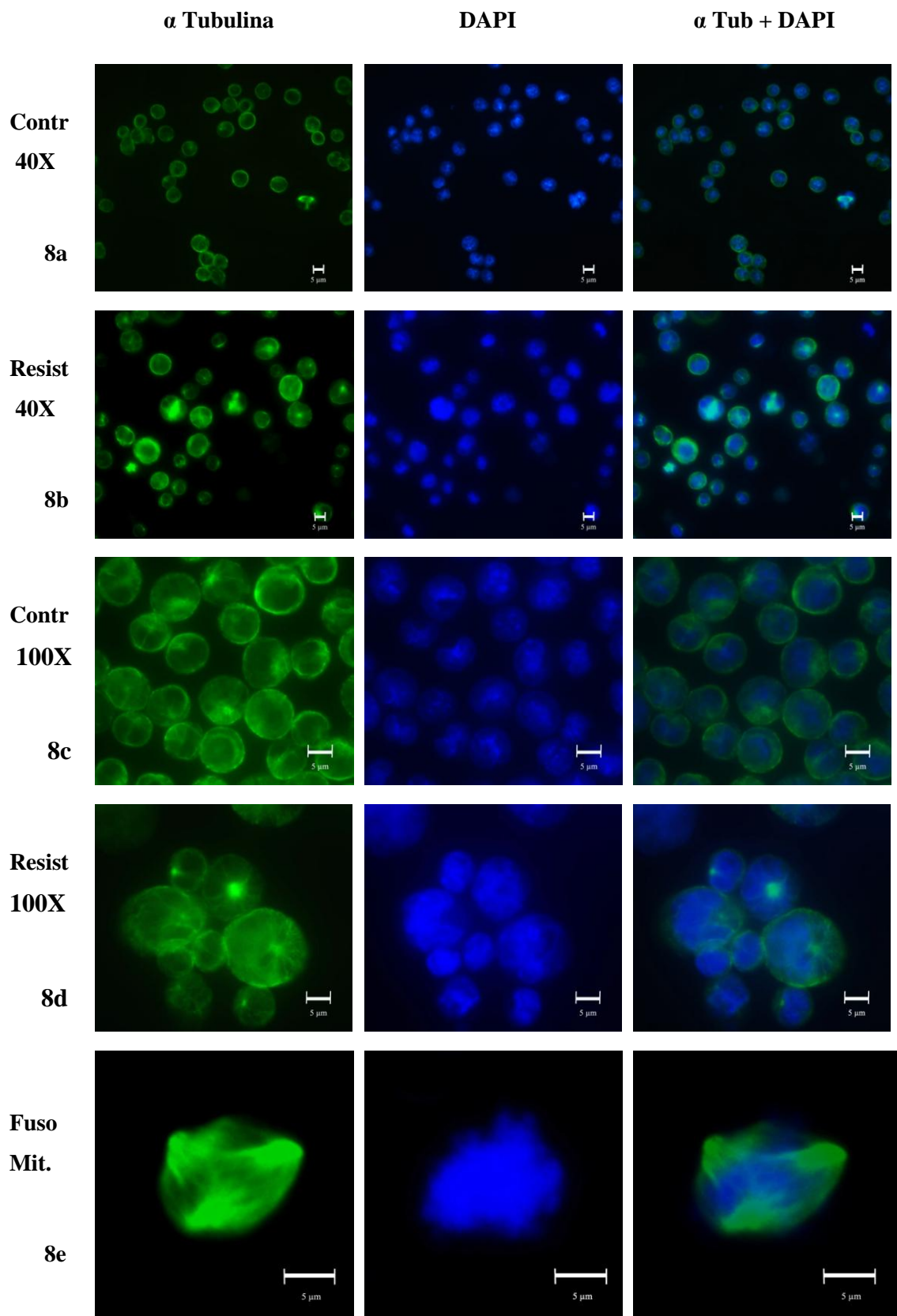
Allo scopo di analizzare l'organizzazione microtubulare e verificarne la sua possibile alterazione rispetto alle cellule di controllo, le cellule di mieloma murino di controllo e le cellule denominate “resistenti” sono state analizzate mediante immunofluorescenza con l'ausilio di anticorpi monoclonali diretti contro la subunità  $\alpha$  della tubulina.

Le immagini ottenute forniscono informazioni riguardo la struttura e distribuzione spaziale dei microtubuli.

Nella figura 8a e 8c sono rappresentate cellule di controllo dove è ben visibile un nucleo fluorescente blu marcato mediante la colorazione DAPI, mentre in verde è evidente l'apparato microtubulare con la presenza di un centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC) da cui si dipartono i microtubuli, i quali formano una fitta rete che si distribuisce nel citoplasma.

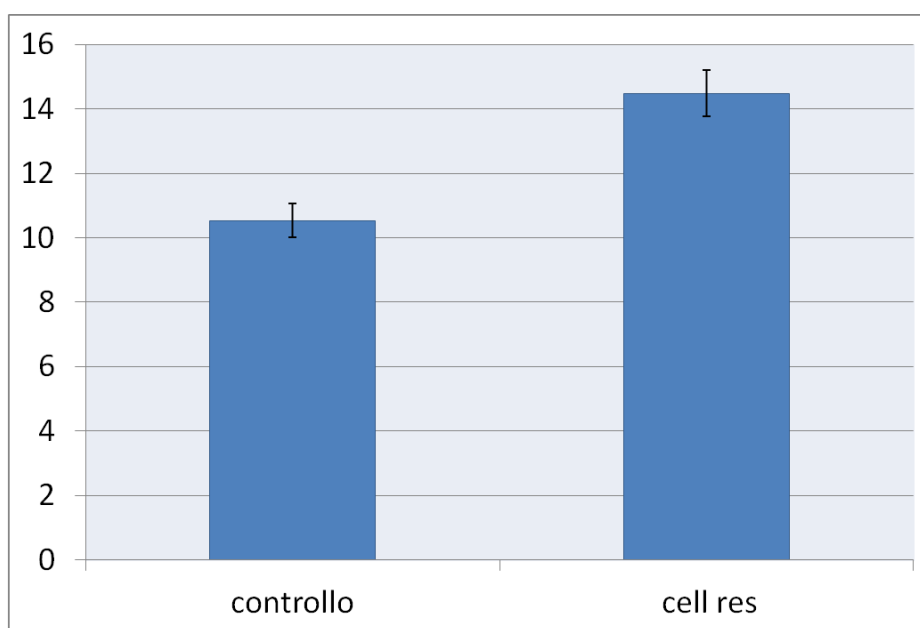
Sovrapponendo le immagini date dalle due marcature si ha una visione più chiara della specificità della colorazione.

Nella figura 8b e 8d sono riportate immagini di cellule di mieloma murino “resistenti” e si nota, come già evidenziato al microscopio ottico ed elettronico a scansione, la presenza di cellule di grandi dimensioni e con la presenza, in alcuni casi, di un MTOC molto più marcato rispetto a quanto osservato nelle cellule di controllo. E' stata spesso evidenziata, inoltre, la presenza di fusi mitotici aberranti con tre MTOC (Fig.8e), da cui si dipartono altrettanti fasci microtubulari, segno evidente di una profonda modificazione nell'organizzazione dell'intera cellula.



**Fig.8: Fluorescenza di cellule P3X di Controllo e Resistenti marcate con anti - $\alpha$  tubulina e DAPI**

Grazie all'analizzatore di immagini è stato possibile poi procedere ad una stima della media dei diametri sia delle cellule di controllo che delle cellule "resistenti". Come si può notare dal grafico (Fig.9), per le cellule normali si ha una media della dimensione dei diametri di 10,5  $\mu\text{m}$  mentre nel caso di cellule resistenti la media è risultata di circa 15  $\mu\text{m}$ .



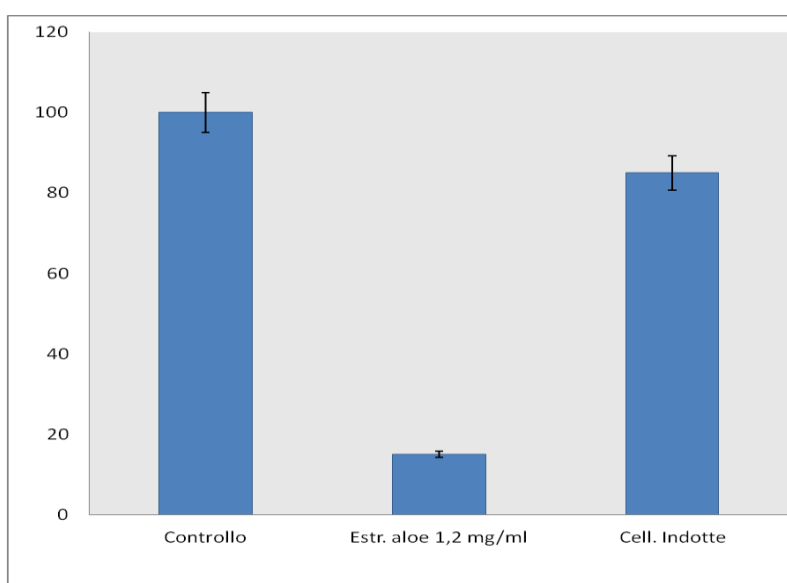
**Fig.9: Grafico relativo alla media dei diametri di cellule P3X di controllo e resistenti**

### **3.4 Induzione della resistenza nelle cellule di mieloma murino mediante medium delle cellule "resistenti"**

Test biologici sono stati effettuati sul soprannatante delle cellule resistenti al fine di valutare a riguardo la eventuale presenza di molecole-segnale prodotte da queste cellule e che avrebbero potuto indurre resistenza anche nelle cellule che non erano mai venute in contatto con l'estratto. Come riportato nei Materiali e Metodi, cellule mai sottoposte al trattamento sono state messe in coltura nel medium di cellule resistenti e dopo 24 ore di incubazione, cellule del controllo e cellule tenute in coltura nel medium delle cellule resistenti trattate con il soprannatante sono state sottoposte al trattamento con la dose massiccia di estratto. Come si può vedere dal grafico (Fig.10) sottoponendo queste cellule a 1,2 mg/ml di estratto, la proliferazione cellulare del controllo era del 15%, mentre quella

delle cellule tenute in coltura nel soprannatante delle cellule resistenti e successivamente trattate con la stessa dose di estratto era dell'85%.

Si può quindi dedurre che nell'induzione di un nuovo meccanismo di resistenza sia coinvolto il mezzo di coltura; si può supporre che le cellule resistenti (cellule ormai insensibili al trattamento con estratto di Aloe) abbiano rilasciato nel mezzo di coltura un sorta di molecola-segnaie che possa scatenare lo stesso meccanismo di risposta alla difesa dall'azione dell'estratto e quindi rendere meno sensibili anche cellule che non avevano subito nessun tipo di trattamento e che non erano mai state in contatto con le molecole consistenti l'estratto di Aloe.



**Fig.10: Grafico relativo alla percentuale di cellule P3X di controllo e indotte, trattate con estratto di *Aloe arborescens***

### 3.5 Valutazione dell'espressione della Glicoproteina P

Le cellule P3X di controllo, cellule "resistenti" e "indotte" sono state sottoposte ad analisi di Western Blot e immunofluorescenza per verificare la diversa espressione, rispetto al controllo, di una proteina di membrana importante nel processo di detossificazione della cellula, la glicoproteina P e quindi appurare se il meccanismo di resistenza fosse dovuto ad una maggiore presenza di questa proteina nelle cellule trattate per lungo periodo con l'estratto.

### 3.5.1 Immunofluorescenza

L'esperimento è stato condotto su cellule di controllo, su cellule "resistenti" e su cellule "indotte". Utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la P-gp, si evidenzia una colorazione localizzata nel plasmalemma e sulle membrane degli organelli citoplasmatici. Nelle cellule "resistenti" (Fig.11b) come si può vedere dalle immagini, si evidenzia una maggior espressione della P-gp rispetto al controllo (Fig.11a). Lo stesso tipo di analisi è stata condotta anche su cellule di mieloma murino "indotte" (Fig.11c) tenute in coltura nel medium delle cellule "resistenti". Anche queste cellule sono state sottoposte ad immunofluorescenza con l'ausilio dell'anticorpo anti P-gp per poter valutare la maggior espressione di questa proteina di membrana. Come è possibile vedere dalle foto, nelle cellule "indotte", rispetto al controllo, la P-gp risulta maggiormente espressa.

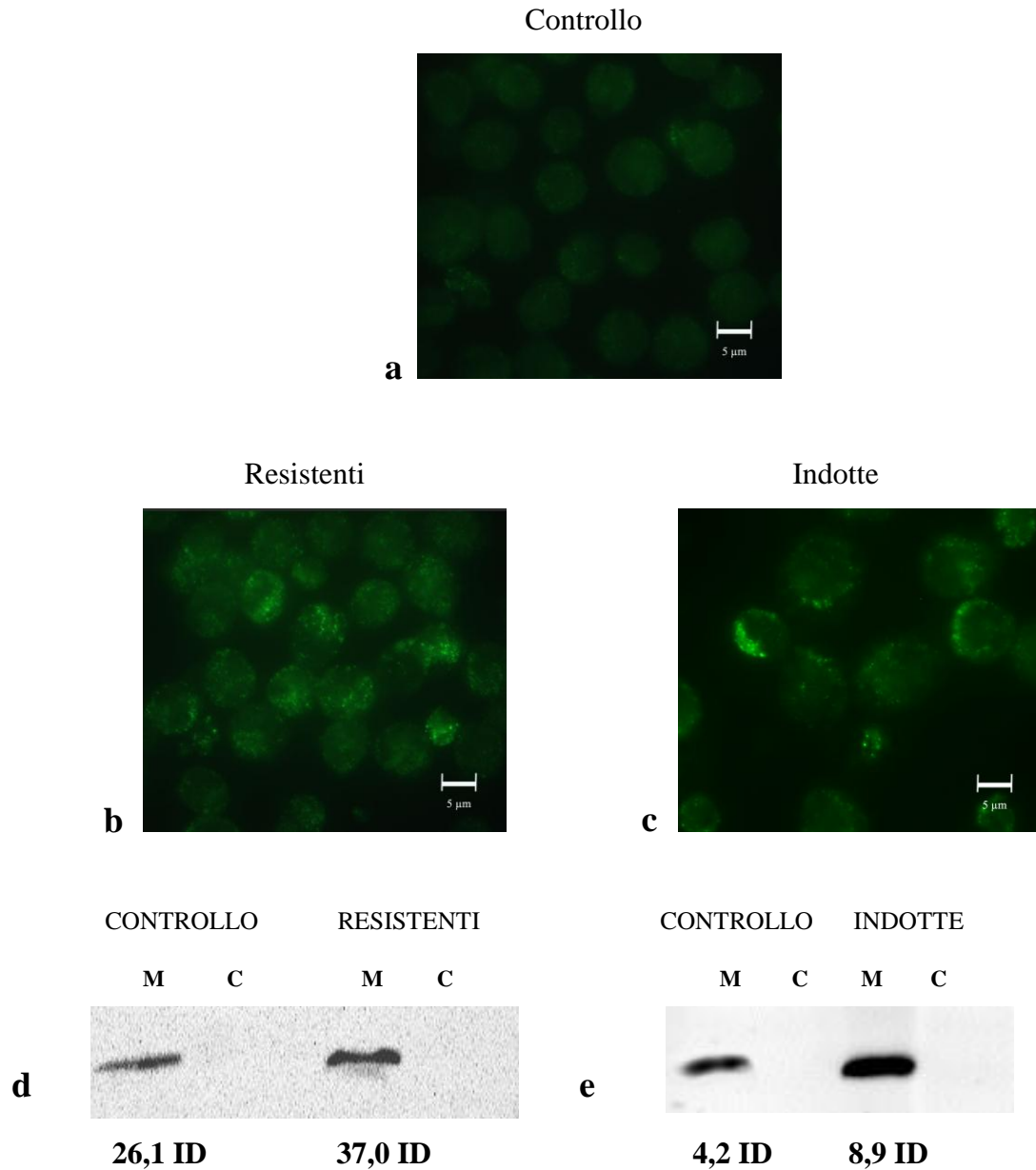
### 3.5.2 Western Blot

Dai risultati dei blot (Fig.11d), nelle cellule di controllo e nelle cellule "resistenti", nella corsia della frazione membranosa è presente una banda riconosciuta dall'anticorpo anti-Pg-P di peso molecolare pari a 170/178 kDa e riconducibile alla proteina di nostro interesse.

L'intensità delle bande, calcolata con il software Quantity One ed espressa come Integrated Density (ID), rispetto a un valore di fondo che è il background del blot, è risultata pari a 26,13 ID per le cellule di controllo e 36,95 ID per quelle "resistenti"; ciò dimostra una maggiore espressione della glicoproteina P nelle cellule sottoposte al trattamento prolungato rispetto al controllo.

Il western-blot è stato effettuato anche per indagare la maggior espressione della glicoproteina P in cellule "indotte", ottenute mediante incubazione nel medium di coltura delle cellule rese resistenti con il trattamento prolungato di Aloe. Dall'immagine riportata (Fig.11e) si evince la presenza di una sola banda individuata dall'anticorpo anti pg-P che ha identificato un polipeptide con peso molecolare compreso tra 170-178 kDa. Si evidenzia inoltre come nelle cellule "indotte" ci sia una maggiore espressione della glicoproteina P rispetto a cellule di controllo. Anche in questo caso è stata effettuata una misura dell'intensità delle bande relative alla proteina mediante il software Quantity One ed espressa come Integrated Density (ID), che è risultata pari a 8,9 ID nelle indotte e 4,2 ID

nelle cellule di controllo. Questi risultati confermano i dati precedentemente ottenuti mediante il Western blot.



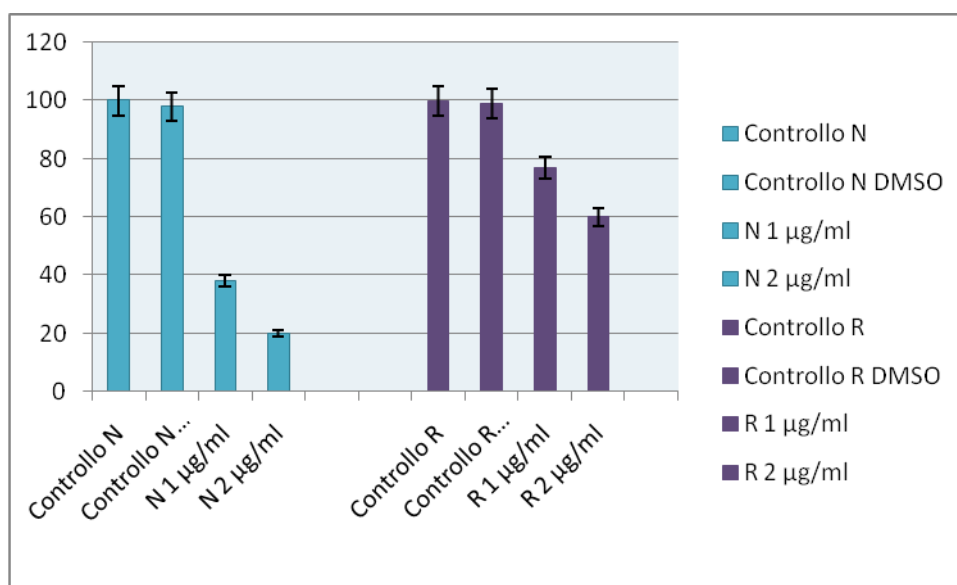
**Fig.11: Valutazione dell'espressione della Glicoproteina P in cellule P3X di Controllo, Resistenti e Indotte**

- a,b,c)** Immunofluorescenza di cellule P3X di controllo, resistenti e indotte marcate con anti P-gp  
**d)** Analisi mediante western blot dell'espressione della P-gp in cellule P3x di Controllo e Resistenti  
**e)** Analisi mediante western blot dell'espressione della P-gp in cellule P3x di Controllo e Indotte

### 3.6 Trattamento cellulare con Vinblastina

Per verificare se le cellule sottoposte al trattamento prolungato fossero resistenti anche ad altre molecole e come ulteriore conferma che nel meccanismo di resistenza indotto dall'estratto di Aloe sulle cellule P3X fosse implicata la Glicoproteina P, è stato utilizzato un substrato noto della P-gp, la Vinblastina, che induce normalmente apoptosi in linee cellulari (Jordan et al., 2004).

Come mostrato dal grafico (Fig.12), le cellule della linea P3X sottoposte a trattamento con vinblastina hanno mostrato a 24 ore dalla somministrazione una inibizione della proliferazione cellulare pari al 62% alla concentrazione di 1  $\mu\text{g/ml}$ , e al 80% alla concentrazione di 2  $\mu\text{g/ml}$  mentre le cellule resistenti hanno subito una riduzione del loro numero relativo alle stesse concentrazioni pari a 23% e 40%. Quindi le cellule resistenti sono risultate resistenti anche al trattamento con la vinblastina.



**Fig.12: Grafico relativo alla percentuale di cellule P3X di controllo e resistenti sottoposte al trattamento con Vinblastina**

## **3.7 Valutazione dell'espressione della P53**

Le cellule P3X di controllo, cellule “resistenti” e “indotte” sono state sottoposte ad analisi western blot e immunofluorescenza per verificare la diversa espressione della proteina p53, per appurare se il processo di resistenza fosse dovuto solamente ad una maggiore espressione della P-gp o se fosse coinvolto qualche altro meccanismo di resistenza.

### **3.7.1 Immunofluorescenza**

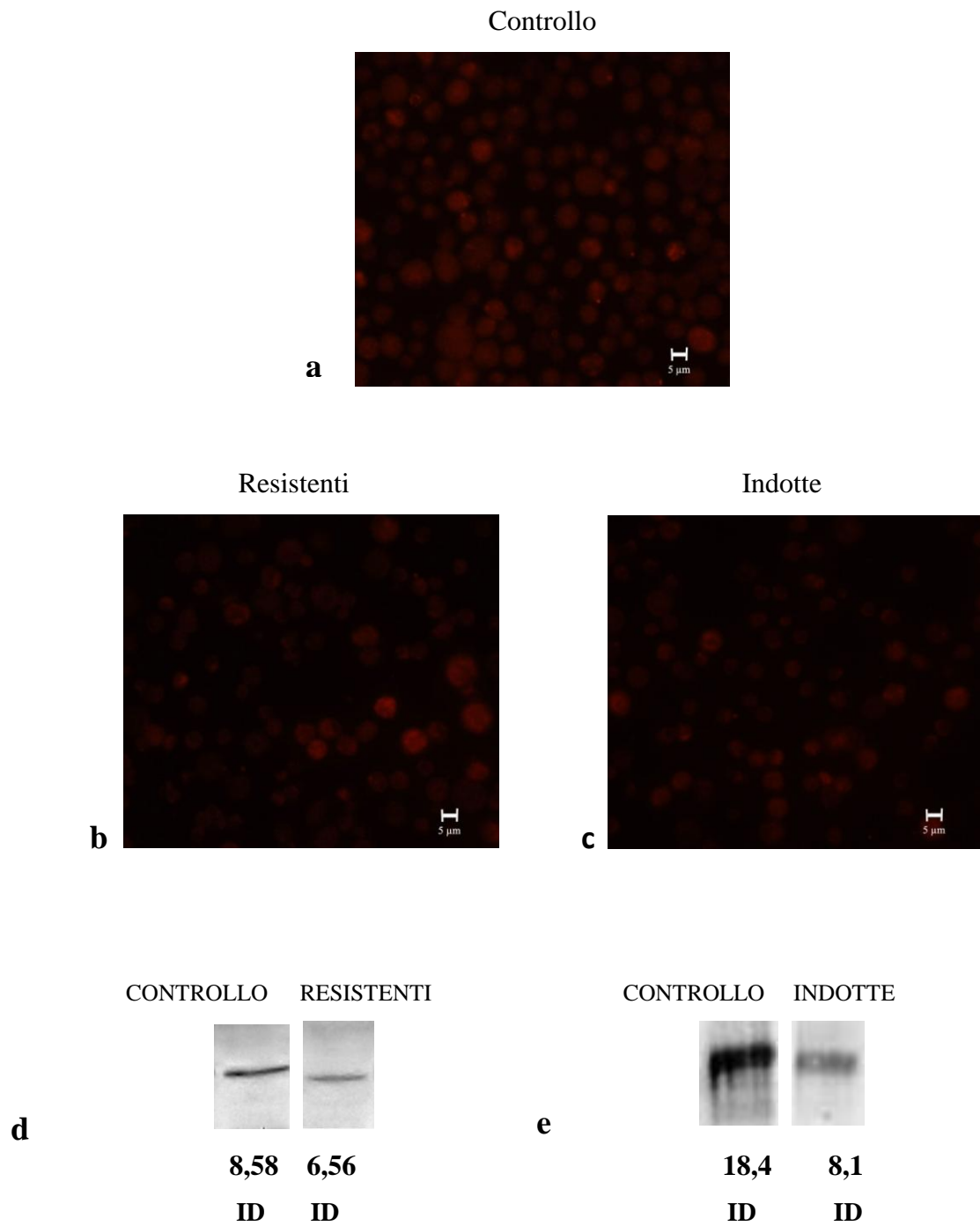
Il saggio è stato condotto su cellule P3X di controllo, cellule “resistenti” e “indotte”; dai risultati ottenuti, utilizzando un anticorpo diretto contro la proteina p53, si è evidenziato nelle cellule resistenti (Fig. 13b) e indotte (Fig. 13c) una espressione della proteina p53 meno marcata rispetto alle cellule P3X utilizzate come controllo (Fig. 13a).

### **3.7.2 Western Blot**

Come evidenziato dai risultati ottenuti (Fig.13b), nelle cellule “resistenti” è presente una banda riconosciuta dall'anticorpo anti-p53, lo stesso utilizzato nelle indagini di immunofluorescenza, di peso molecolare poco al di sopra di 50 kDa e riconducibile alla proteina di nostro interesse.

L'intensità delle bande, calcolata con il software Quantity One ed espressa come Integrated Density (ID), è risultata pari a 8,58 ID per le cellule di controllo e 6,56 ID per quelle “resistenti”, che mostrano quindi una espressione minore della proteina rispetto alle cellule di controllo.

Lo stesso tipo di analisi è stata ripetuta per le cellule definite “indotte” (Fig.13c) mostrando anche in questo caso la presenza di una banda riconosciuta dal nostro anticorpo di circa 50 kDa e l'intensità è risultata essere pari a 18,4 ID per le “indotte” rispetto a 8,1 ID del controllo. Questo dato conferma il risultato ottenuto mediante immunofluorescenza effettuato sulla stessa tipologia di campioni cellulari.



**Fig.13: Valutazione dell'espressione della proteina p53 in cellule P3X di Controllo, Resistenti e Indotte**

**a,b,c)** Immunofluorescenza di cellule P3X di controllo, resistenti e indotte marcate con anti p53

**d)** Analisi mediante western blot dell'espressione della p53 in cellule P3x di Controllo e Resistenti

**e)** Analisi mediante western blot dell'espressione della p53 in cellule P3x di Controllo e Indotte

## 4 DISCUSSIONE

Nel corso dei numerosi test biologici effettuati in questa Tesi è stato osservato che mentre la somministrazione di dosi massicce di estratto di epidermide provocava rapidamente la morte di quasi tutte le cellule, il trattamento prolungato con basse dosi di estratto non manifestava questo effetto devastante ed era possibile trovare un certo numero di cellule vitali anche dopo diversi giorni di trattamento. Questi risultati potevano essere dovuti alla somministrazione di una dose di estratto di Aloe troppo bassa o all'insorgere di un meccanismo che inducesse nelle cellule l'insorgenza di una forma di resistenza.

Ulteriori test hanno dimostrato che le cellule, dopo essere state sottoposte ad un trattamento prolungato di basso dosaggio, risultavano essere insensibili a dosi massicce di estratto e che la loro percentuale di proliferazione era maggiore rispetto a quella delle cellule non trattate per lungo periodo e sottoposte poi a somministrazione massiccia. Questo risultato preliminare dimostra quindi che trattamenti prolungati con basse dosi di estratto fogliare di *Aloe arborescens* inducono nelle cellule di mieloma murino una forma di resistenza a successive somministrazioni. Inoltre, le basse dosi somministrate per un lungo periodo non danneggiano la cellula in modo rilevante ma attivano dei sistemi di difesa che permettono ad alcune di queste di sopravvivere e diventare "resistenti".

Le indagini condotte al microscopio elettronico a scansione mostrano che le cellule sottoposte a trattamenti prolungati mantengono i caratteri morfologici peculiari del tipo cellulare a cui appartengono, ma presentano anche delle differenze: le strutture filamentose presentano una morfologia non perfettamente integra, le lobature superficiali risultano più marcate e numerose e si possono notare nella popolazione cellule morte, dall'aspetto simile ad ammassi spugnosi. L'effetto più evidente, tuttavia, è un consistente aumento del diametro medio delle cellule. Al microscopio elettronico a trasmissione le cellule di controllo presentano un assetto strutturale piuttosto caratteristico: sono infatti di forma sferoidale e al loro interno sono visibili, oltre ad un grosso nucleo, alcuni organelli cellulari. Tra le cellule trattate con basse dosi di estratto si ritrova una maggiore eterogeneità di strutture: si rinvengono contemporaneamente frammenti cellulari, cellule in apoptosi e cellule sane in diverse fasi del ciclo cellulare. La cromatina dei nuclei presenta infatti delle zone a diversi livelli di condensazione, ma ciò che è risultato rilevante è il numero elevato di cellule in mitosi, caratterizzate dai cromosomi riconoscibili come entità distinte.

Le cellule divenute “resistenti”, sottoposte ad immunofluorescenza utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro la subunità  $\alpha$  della tubulina, non sembravano subire un grosso cambiamento morfologico a carico dell'apparato microtubulare, mentre il MTOC, rispetto al controllo, è risultato essere di dimensioni maggiori con emissione di fluorescenza più intensa. Un numero di cellule consistente era di dimensioni maggiori rispetto al controllo e risultavano inoltre presenti alcune cellule con fusi aberranti con tre MTOC da cui si dipartivano altrettanti fasci di microtubuli.

La regolazione del volume in risposta ai cambiamenti in osmolalità extracellulare è una proprietà fondamentale della maggior parte delle cellule. Molti tipi di cellule vanno incontro a rigonfiamento cellulare attivato dai canali del cloro e una delle proteine che sono state identificate come implicate nella regolazione dell'attività osmotica è la glicoproteina-P (Gill et al, 1992;. Valverde et al, 1992;. Luckie et al. 1994; Hardy et al, 1995; Valverde et al. 1996). La glicoproteina-P (P-gp) è una proteina di membrana ad alto peso molecolare (circa 170 kD), localizzata sia sul plasmalemma sia sulle membrane degli organelli citoplasmatici, con funzione di trasportatore ATP-dipendente aspecifico della famiglia dei trasportatori ABC (Chan *et al.*, 2006).

Il naturale substrato della P-gp in cellule non neoplastiche sono ormoni steroidei (Yang et al., 1990), fosfolipidi (Gottesman e Higgins, 1992; Smit et al, 1993.; Ruetz e Gros, 1994), piccole molecole idrofobiche, peptidi lipofilici. Inoltre la pg-P è trasportatore attivo che può conferire resistenza alle cellule tumorali, pompando all'esterno farmaci citotossici e svolgendo un ruolo fondamentale nella detossificazione delle cellule (Schinkel et al., 1994). Questo fenotipo è noto come *multidrug resistance* (MDR) cioè “resistenza multipla ai farmaci antitumorali”, e svolge un ruolo cruciale per la sopravvivenza delle cellule; la sovraespressione di questa proteina nelle cellule tumorali rende queste ultime insensibili contemporaneamente ad una vasta gamma di agenti citotossici, molti dei quali utilizzati come chemioterapici (Gerlach *et al.*, 1986; Luciani *et al.*, 2002; Molinari *et al.*, 2002). Questa ATP-asi di membrana è codificata da un gene denominato MDR1 e generalmente la sovraespressione della proteina è legata ad un processo di amplificazione genica, cioè ad un aumento del numero di copie del gene (Kakehi *et al.*, 1988). E' stato osservato però che la P-gp è in grado di trasportare solo le forme coniugate di determinati composti tossici: questo ha fatto ipotizzare che questa proteina possa far parte (insieme ad enzimi della fase I e della fase II) del complesso macchinario intracellulare coinvolto nelle reazioni di detossificazione di composti sia endogeni che esogeni (Bao, 1999). E' stato dimostrato che molte sostanze sono in grado di interferire con il funzionamento di questa pompa di

membrana: primi tra tutti i veleni cellulari, quali il cianuro, che bloccano la produzione di energia, farmaci di sintesi chimica quali norverapamil (Woodland et al., 2003) e soprattutto composti naturali quali flavonoidi (Boumendjel et al., 2002), antracicline (Gate et al., 2003) e triterpeni (Ramachandran et al., 2003) e curcuminoidi (Limtrakul et al., 2003). Sono stati ampiamente studiati anche molti modulatori della P-gp. In uno studio condotto la sintesi di derivati dell'aloenina (4'-O-alchilati di aloenina) e loro derivati, solfati, hanno migliorato la proprietà e la citotossicità dei composti rispetto a quelli da cui derivano, su cellule umane di cancro del colon-retto (HCT 116), HCT 116/VCR 100-1-1 (vincristina indotta resistente) e epatoma umano (Hep G2) (Guang-zhu et al., 2005)

La rilevanza clinica della P-gp nei tumori è stata dimostrata in molte indagini cliniche (Efferth & Eichhorn., 2008) e di conseguenza su questa glicoproteina si stanno concentrando gli studi allo scopo di migliorare l'efficacia delle terapie chemioterapiche. Grazie alle continue acquisizioni scientifiche si è evidenziato come la somministrazione concomitante del farmaco antitumorale con inibitori di trasporto della P-gp può migliorare l'efficacia della terapia (Nobili et al., 2006; Takara et al., 2006).

Come detto in precedenza la P-gp è coinvolta nel processo di regolazione del volume cellulare. Mentre il processo apoptotico generalmente è associato all'iperosmosi cellulare dovuta al rilascio di ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e acqua, (Hofman et al. 09; Lang et al. 2007; Okada et al., 2009) l'induzione del fenotipo di resistenza nelle cellule tumorali genera iperosmosi, conseguenza dell'attivazione dei canali del cloro e della modulazione dei movimenti del  $\text{NaCl}$ , contribuendo a contrastare l'apoptosi (Poulsen et al., 2010). Sulla base di queste acquisizioni scientifiche, si è pensato di indagare la maggiore espressione della glicoproteina P nelle cellule di mieloma murino rese resistenti con il trattamento prolungato rispetto alle cellule di controllo.

Per poter valutare la sovraespressione della glicoproteina P è stato effettuato un test di western blot, strumento utile per lo studio dell'espressione di proteine (Burnette, 2009).

Nelle cellule "resistenti" si è riscontrata la presenza di una banda più marcata nella corsia della frazione delle membrane pari a 36,95 ID (integrated density) rispetto alla stessa frazione delle cellule di controllo dove la banda risultava meno marcata con un valore di 26,13 ID. Tale banda identificava una proteina con peso molecolare compreso tra 170-178 kDa, dato in accordo con quanto riportato in letteratura a riguardo la P-gp (Chan *et al.*, 2006).

La sovraespressione della glicoproteina P è stata ulteriormente confermata da un'analisi di immunofluorescenza utilizzando lo stesso anticorpo impiegato precedentemente nel

Western blot. Dalle immagini ottenute si evince una maggiore espressione della glicoproteina P nelle cellule “resistenti” rispetto al controllo.

A supporto dell’ipotesi che nel meccanismo di resistenza indotto tramite l’estratto di Aloe sulle cellule P3X fosse implicata la Glicoproteina P e per verificare se le cellule sottoposte al trattamento prolungato fossero resistenti anche ad altre molecole, sono stati condotti saggi utilizzando la Vinblastina, un alcaloide estratto dalla vinca rosea (*Catharanthus roseus*), conosciuto come substrato della Pg-p. Questa proteina è in grado, legandolo, di ridurre la sua concentrazione intracellulare estromettendolo dalla cellula (Gottesman 1993). La vinblastina è utilizzata comunemente come chemioterapico, interferisce con i microtubuli incidendo sulla loro instabilità dinamica e causandone la depolimerizzazione, come conseguenza di questo induce inibizione della proliferazione cellulare e apoptosi. (Jordan 2002; Dhamodharan et al., 1995; Jordan et al., 2004)

Le cellule P3x di controllo e cellule “resistenti” all’estratto di Aloe sono state trattate con vinblastina e dai risultati ottenuti è emerso che le cellule resistenti sembrano essere meno sensibili al trattamento con questa molecola rispetto alle cellule di controllo. Da questi dati emerge quindi che la resistenza acquisita a seguito dei ripetuti trattamenti con basse dosi di estratto di Aloe, non è specifica solo per l’estratto di questa pianta ma le cellule resistenti risultano meno sensibili anche al trattamento con un substrato noto della pg-P che induce apoptosi.

Sono stati eseguiti inoltre esperimenti volti a dimostrare che nella induzione di resistenza di cellule P3X mai venute a contatto con l’estratto di Aloe possa essere coinvolto il mezzo di coltura. A tale scopo cellule di questa linea sono state tenute in coltura nel mezzo prelevato da colture di cellule resistenti, e ne è stata successivamente valutata la proliferazione cellulare mediante test MTT dopo trattamento con dosi elevate di estratto.

Queste cellule sono state denominate "indotte". Dai dati è emersa una inibizione della proliferazione cellulare inferiore rispetto a cellule di controllo non messe a contatto con il medium ma solo sottoposte a trattamento con estratto.

Questo potrebbe essere spiegato con un rilascio nel medium, da parte delle cellule resistenti, di molecole-segnale in grado di indurre il fenotipo di resistenza.

Il test western blot, effettuato sulle cellule “indotte” per verificare se la glicoproteina P fosse maggiormente espressa, ha mostrato la presenza di una banda più marcata nella corsia della frazione delle membrane con ID pari a 8,9 rispetto a 4,2 del controllo, a conferma che, la P-gp risultava espressa in maggiore quantità rispetto al controllo.

Un'ulteriore conferma della sovraespressione della P-gp in cellule "indotte" si è avuta effettuando l'immunofluorescenza; dalle immagine ottenute era ben visibile la maggiore espressione della glicoproteina P rispetto alle cellule di controllo.

Il meccanismo implicato nella maggiore espressione del gene MDR1 non è stato ancora pienamente compreso. Lo studio di questo meccanismo molecolare e delle vie di trasduzione del segnale, coinvolte nella regolazione di geni associati a MDR, potrebbe essere utile al fine di migliorare l'efficacia dei trattamenti chemioterapici. Dalla letteratura è noto però che diversi fattori di crescita stimolano una cascata che coinvolge una proteina chinasi che attiva in sequenza Raf, MEK, e ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase). Recenti studi dimostrano che la modulazione dell'attivazione di ERK può essere un nuovo metodo per invertire la MDR (Li, 2008, Hu et al. 2003).

Da uno studio effettuato su una linea cellulare Doxorubicina-resistente, generata dalla linea cellulare Daudi, sembra che l'acquisizione della MDR sia associata con una maggiore traslocazione nucleare di YB-1, un fattore oncogeno di trascrizione/traduzione che è sovraespresso in numerosi di tipi di cancro, e una maggiore attività MAPK/ERK. La Doxorubicina infatti può aumentare l'espressione del gene MDR1 attraverso l'attivazione della via di trasduzione MAPK/ERK, la maggiore espressione di YB-1, inducendone la traslocazione nucleare e migliorandone l'attività di legame al DNA. (Huiling et al 2011). Il percorso MAPK/ERK potrebbe essere un nuovo bersaglio con cui interrompere la traslocazione nucleare di YB-1, che ha importanti implicazioni per l'ulteriore sviluppo di strategie terapeutiche.

Un altro studio ha dimostrato che YB-1 è normalmente localizzata nel citoplasma, tuttavia, il trattamento con farmaci antitumorali, ipotermia, e la luce ultravioletta ha indotto la sua rapida traslocazione al nucleo, dove ha portato all'attivazione del gene MDR1 (Schitt et al 2007).

Tuttavia, i meccanismi attraverso i quali YB-1 partecipa alla MDR e come si attiva per indurre l'espressione di MDR1 non è stato ancora compreso pienamente.

Coles e collaboratori (Cole et al. 2005) hanno riportato che YB-1 è fosforilato da ERK2 in vitro e che il legame di YB-1 ai geni a valle è regolato da questa fosforilazione. Questi risultati confermano che percorsi ERK / MAPK possono regolare l'espressione di MDR1 attraverso l'azione di YB-1.

Quindi le P3X resistenti potrebbero rilasciare nel medium un fattore che, attivando la via di trasduzione MAPK/ERK e il fattore YB-1, induce la maggiore espressione del gene di

resistenza nelle cellule non trattate permettendo loro di acquisire resistenza a successivi trattamenti con estratto. Questa ipotesi sarà oggetto di ulteriori studi.

Ulteriori esperimenti sono stati svolti allo scopo di verificare se il processo di resistenza all'Aloe, espresso nel nostro modello cellulare, fosse dovuto solamente ad una maggiore espressione della P-gp o se fosse implicato qualche altro meccanismo di resistenza. Tra i meccanismi P-gp indipendenti è possibile citare la resistenza associata all'alterazione dell'espressione e della funzione della p-53 (Wattel E. *et al.*, 1994) infatti la mancata attivazione della risposta apoptotica innescata da p53 rende le cellule resistenti ai trattamenti radio- e chemioterapici (Hollstein et al., 1991). L'attivazione del gene p53 e la sovraespressione del gene MDR1 possono essere correlati nella resistenza a farmaci, in uno studio effettuato per studiare il meccanismo di regolazione dell'espressione del gene di multiresistenza (MDR-1) e la resistenza associata a proteine (MRP), si è indagato se p53, WT1, RB, C-myc, N-myc, ciclina D1, p16INK4 (p16) fossero coinvolte nella acquisizione del fenotipo multiresistenza (MDR) nelle cellule umane vincristina (VCR)-resistenti di leucemia, ed è emerso che nelle cellule in cui era presente la sovraespressione di MDR-1, p53 era down regolata, sembra infatti che p53 può direttamente o indirettamente mediare l'espressione di MDR-1 (Masao et al.'98)

Nel nostro studio, al fine di valutare l'espressione della p53 nelle cellule di controllo, resistenti e indotte, sono stati condotti esperimenti di western blot e immunofluorescenza utilizzando un anticorpo diretto contro la p53.

Risultati preliminari sembrano dimostrare, nelle cellule resistenti e indotte, una minore espressione della proteina p53 in contemporanea ad una maggiore espressione della P-gp confermando quanto emerso dalla bibliografia.

Gli esperimenti condotti in questa Tesi hanno come modello cellulare le cellule di mieloma di topo e ovviamente ulteriori e più approfonditi studi necessiteranno per valutare se quanto qui riportato può avere una possibile rilevanza per applicazioni sull'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

- Akao T., Che Q.M., Kobashi K., Hattori M., Namba T.; - A purgative action of barbaloin is induced by Eubacterium sp. Strain BAR, a human intestinal anaerobe, capable of transforming barbaloin to aloe-emodin anthrone- Biol. Pharm. Bull., 19 (1): 136-138 (1996)
  
- Alves Daiane S., Laura Pe´rez-Fons, Amparo Estepa, Vicente Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin Micol Biochemical Pharmacology 68 549–561 (2004)
  
- Ando N., Yamaguchi I.; - Sitosterol from Aloe vera ( Aloe vera (L.) Burm. f.) gel- Kenkyu Kiyō-Tokyo Kasei Daigaku, 30: 15-20 (1990)
  
- Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, et al. Aloe-emodinquinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. Pharmacol Toxicol;87:229–33 (2000)
  
- Ashkenazi A., Vishva M.; - Science, 281: 1305-1308 (1998)
  
- Bao T.Z.; - A novel hypothesis for the mechanism of action of P-glycoprotein as a multidrug transporter- Mol. Carcinog., 25: 1-13 (1999)
  
- Bedini Chiara, Tesi di Laurea, aa 2004/2005
  
- Beppu H., Koike T., Shimpo K., Chihara T., Hoshino M., Ida C., Kuzuya H.; - Radical-scavenging effects of Aloe arborescens Miller on prevention of pancreatic islet B-cell destruction in rats- Journal of Ethnopharmacology, 89: 37-45 (2003)
  
- Beppu H., Nagamura Y., Fujita K.; - Hypoglycaemic and antidiabetic effects in mice of Aloe arborescens Miller var. natalensis Berger- Phytotherapy Research, 7: 37-42 (1993)

- Beppu H., - Studies on the components of *Aloe arborescens* from Japan-monthly variation and differences due to part and position of the leaf Hidehiko Beppu *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 783-795 (2004)
  
- Berridge M. V., Tan A. S., Mc Coy K. D., Wang R.; -The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochem.* (4): 15-20 (1996)
  
- Bing Tian, Yuejin Hua,. Concentration-dependence of prooxidant and antioxidant effects of aloin and aloe-emodin on DNA. *Food Chem*; 91, 413–418 (2004)
  
- Boudreau MD, Beland FA - An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 24, 103-154 (2006).
  
- Boumendjel A., di Pietro A., Dumontet C., Barron D.; - Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance- *Inc. Med. Res. Rev.*, 22 (5): 512-529 (2002)
  
- Breimer D.D., Baars A.J.; - Pharmacokinetics and metabolism of anthraquinone laxatives- *Pharmacology*, 14: 30-47 (1976)
  
- Buenz EJ. Aloin induces apoptosis in Jurkat cells. *Toxicol Vitro*; 22: 422–429 (2007)
  
- Burnette W.N. –Western blot: remembrance of past things. *Methods in molecular biology, protein blotting and detection* Vol536 (pp.5-8).Humana Press (2009)
  
- Byeon S.W., Pelley R.P., Ulrich S.E., Waller T.A., Bucana C.D. e Strickland F.M.; -*Aloe barbadensis* extracts reduce the production of interleukin-10 after exposure to ultraviolet radiation. *J.Invest.Dermatol.* 110 (5): 811-7 (1998)
  
- Capasso F., Borrelli F., Capasso R., Di Carlo G., Izzo A.A., Pinto L., Mascolo N., Castaldo S., Longo R.; - Aloe and its therapeutic use- *Phytotherapy Research*, 12: 124-127 (1998)

- Cartoni G. P. e Goretti G.; -Cromatografia. La Goliardica Editrice Universitaria di Roma. (1986)
  
- Cecchinelli B, Porrello A, Lazzari C, Gradi A, Bossi G, D'Angelo M, Sacchi A, Soddu S. Ser58 of mouse p53 is the homologue of human Ser46 and is phosphorylated by HIPK2 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, 13: 1994-1997 (2006).
  
- Cera L.M., Hegggers J.P., Robson M.C., Hagstrom W.J.; - The therapeutic efficacy of Aloe vera cream (Dermaide Aloe(TM)) in thermal injuries. Two case reports-Journal of the American Animal Hospital Association, 16: 768-722 (1980)
  
- Chan C.F., Zhao Y.; J.Med.Chem., , - Flavonoid dimmers as bivalent modulators for P-gp based MDR: synthetic apigenin homodimers linked with PEG spacers increase drug retention and enhance chemesensitivity in resistant cancer cells 49(23), 6742-6759 (2006)
  
- Chauser-Volfson E., Guttermann Y.; - The barbaloin content and distribution in Aloe arborescens leaves according to the leaf part, age, position and season- Israel Journal of Plant Sciences, 44 (4): 289-296 (1996)
  
- Chihara T., Shimpo K., Shinzato M et al.; - Inhibition of N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced duodenal tumorigenesis in mice by wholeleaf Aloe arborescens Miller var. natalensis Berger- Asian Pacific Journal Cancer Prevention, 1: 283-288 (2000)
  
- Chithra P., Sajithlal G.B., Chandrakasan G.; - Influence of *Aloe vera* on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats. Indian J. Exp. Biol. 36 (9): 896-901 (1998a)
  
- Chithra P., Sajithlal G.B., Chandrakasan G.; - Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. J. of Ethnopharmacology 59: 3 179-186 (1998b)
  
- Cohen J., Duke R., Fadok V.A., Sellins K.S.; - Apoptosis and programmed cell death in immunity- Ann. Rev. Immunology, 10: 267 (1992)

- Coles LS, Lambrusco L, Burrows J, et al. Phosphorylation of cold shock domain/Y-box proteins by ERK2 and GSK3b and repression of the human VEGF promoter. *FEBS Lett.*;579:5372–5378 (2005)
  
- Dagne E, Bisrat D, Viljoen A, Van Wyk BE Chemistry of Aloe species. *Current Organic Chemistry* 4, 1055-1078 (2000)
  
- Danhof I.E.; - Aloe in cosmetics. Does it do anything?- *Cosmetic Toiletries*, 102: 62-63 (1987)
  
- Davis R.H., DiDonato J.J., Johnson R.W., Stewart C.B.; - Aloe vera, hydrocortisone, and sterol influence on wound tensile strength and antiinflammation- *Journal of the American podiatric Medical Association*, 84: 614-621 (1994)
  
- Davis R.H., Leitner M.G., Russo J.M. e Byrne M.E.; - Anti inflammatory activity of *Aloe vera* against a spectrum of irritants. *J Am. Podiatr. Med. Assoc.* 79 (6): 263-76 (1989)
  
- De Filippi P. and Tarone G.; -Colture cellulari: tecniche di base. Microart's S.p.A.- Recco (Ge). 1993
  
- Del Casino C., Tiezzi A., Scali M., Neri G., Moscatelli A., - The influence of vinyl cyclohexene dioxide on the cytoskeleton of cultured mouse fibroblasts: immunofluorescence investigations. *Toxicology in Vitro* Vol.8 (6): 1277-1283 (1994)
  
- Del Casino C., Tiezzi A., Wagner V.T. e Cresti; - The organization of cytoskeleton in the generative cell and sperms of *Hyacinthus orientalis*. *Protoplasma* 168, 41-50 (1992)
  
- Dhamodharan R, Jordan MA, Thrower D, Wilson L, Wadsworth P. Vinblastine suppresses dynamics of individual microtubules in livinginterphase cells. *Mol Biol Cell*;6:1215–29 (1995)
  
- Efferth T., Eichhorn T., *Journal of Ethnopharmacology*- P-glicoprotein and its inhibition in tumors by phytochemicals derived from Chinese herbs. 2011, in press.

- El-Shemy HA, Aboul-Soud MA, Nasr-Allah AA, Aboul-Enein KM, Kabash A, Yagi A. Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes' activity by Aloe vera leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Current Medicinal Chemistry* **17**, 129-138 (2010)
  
- Engeland M, Helma J. H. Kuijpers, Frans C.S. Ramaekers, Chris P.M. Reutelingsperger, and Bert Schutte. Plasma membrane Alterations and Cytoskeletal Change in Apoptosis- Experimental cell research 235, 421-430 (1997)
  
- Esmat, A.Y., El-Gerzawy, S.M., Rafaat, A., DNA ploidy and S phase fraction of breast and ovarian tumor cells treated with a natural anthracycline analog (aloin). *Cancer Biology & Therapy* **4**, 108–112 (2005)
  
- Esmat, A.Y., Tomasetto, C., Rio, M.C.,. Cytotoxicity of a natural anthraquinone (Aloin) against human breast cancer cell lines with and without ErbB-2: topoisomerase II alpha coamplification. *Cancer Biology & Therapy* **5**, 97–103 (2006)
  
- Fanali S, Aturki Z, D'Orazio G, Rocco A, Mercolini L, Raggi MA. Analysis of Aloe based phytotherapeutic products by using nano LC-MS. *Journal of Separation Science* **33**, 2663-2670 (2010)
  
- Farkas A.; - Topical medicament including polyuronide derived from Aloe- U.S. Patent 3, 103, 466 (1963)
  
- Femenia A., Sánchez E.S., Simal S., Rossellò C.; - Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues- *Carbohydrate Polymers* **39**: 109-117 (1999)
  
- Franz G.; - Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts- *Planta Medica*, **55**: 493-497 (1989)
  
- Fujita K., Teradaira R. e Nagatsu T; - Bradikininase activity of aloe extract. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 205 (1976)

- Furukawa F., Nishikawa A., Chihara T., Shimpo K., Beppu H., Kuzuya H., Lee I. S. Hirose M.; - Chemopreventive effects of *Aloe arborescens* on N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine-induced pancreatic carcinogenesis in hamsters- *Cancer Letters*, 178: 117-122 (2002)
  
- Fuschino Alessia Tesi di Laurea, aa 2005/2006
  
- Gallagher, R., S. Collins, J. Trujiuo, K. Mc Credie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti, and R. Gallo. - Characterization of the continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 54: 713-733 (1979)
  
- Gate L., Couvreur P., Nguyen-Ba G., Tapiero H. ; - N-methylation of antracyclines modulates their cytotoxicity and pharmacokinetic in wild type and multidrug resistant cells- *Biomed. Pharmacother.*, 57 (7): 301-308 (2003)
  
- Gerlach J.H., Kartner N., Bell D.R., Ling V.; - Multidrug resistance- *Cancer Surv.*, 5 (1): 25-46 (1986)
  
- Ghannam V., Kingston M., Al-Meshaal I.A., Tariq M., Parman N.S., Woodhouse N.; - The anti-diabetic activity of aloes: preliminary clinical and experimental observation- *Hormone Research*, 24: 288-294 (1986)
  
- Gill D.R., Hyde.S.C., Higgins.C.F., Valverde.M.A., Mintenig.G.M. and Sepulveda.F.V. *Cell*. 71, 23-32. (1992)
  
- Gjerstad G.,; *Adv. Front. Plant Sci.* 28: 311-315 (1971)
  
- Gottesman.M.M. and Higgins.C.F. *Trends Biochem. Sci.* 17,18-21. (1992)
  
- Gottesman MM *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter Annu Rev Biochem.*;62:385-427 (1993).

- Gowda D.C., Neelisiddaiah B., Anjaneyalu Y.V.; - Structural studies of polysaccharides from Aloe vera- *Carbohydrates Research*, 72: 201-205 (1979)
  
- Grindlay D. and Reynolds T.; - The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *J. Ethnopharmacol.* 16, 117-151 (1986)
  
- Groom Q.J., Reynolds T.; - Barbaloin in aloe species- *Planta Medica*, 52: 345-348 (1986)
  
- Guang-zhu Jin, Hong-Ji Quan, Jyunichi Koyanagi, Kazuhiro Takeuchi, Yoshihiko Miura, Fusao Komada, Setsuo Saito 4'-O-Alkyaloenin derivatives and their sulfates directed toward overcoming multidrug resistance in tumor cells- *Cancer Letters* 218 15–20 (2005)
  
- Guttermann Y., Chauser-Volfson E.; - The distribution of the phenolic metabolites barbaloin, aloeresin and aloenin as a peripheral defense strategy in the succulent leaf parts of *Aloe arborescens*- *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 825-838 (2000)
  
- Gutterman Y, Chauser-Volfson E. Changes in secondary phenolic metabolites during storage as an aqueous suspension in comparison with the content in harvested *Aloe arborescens* leaves. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 662-666. (2006)
  
- Hamman J. Composition and applications of *Aloe barbadensis* leaf gel. Review. *Molecules* 13, 1599-1616 (2008)
  
- Hardy.S.P., Goodfellow.H.R., Valverde.M.A., Gill,D.R., Sepulveda,F.V. and Higgins,C.F. *EMBO J.* 14, 68-75 (1995)
  
- Harris C., Pierce K., King G., Yates K. M., Hall J., Tizard I.; -Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasma. *Mol. Biotherapy* 3: 207-13 (1991)
  
- Harris C., Pierce K., King G., Yates K. M., Hall J., Tizard I.; - Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasma. *Mol. Biotherapy* 3: 207-13 (1991)

- Hay R., Macy M., Chen T.R., McClintock P., Reid Y.; - ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, sixth edition (1988)
  
- Hay JE, Haynes LJ. The aloins. Part 1. The structure of barbaloin. J Chem Soc; 3141–3147 (1956)
  
- Heggers J. P., Kucukcelebi A., Listengarten D., Stabenau J., Ko F., Broemeling L. D., Robson M. C. e Winters W. D.; -Beneficial effect of Aloe on wound healing in an excisional wound model. J. Altern Complement Med. 2 (2): 271-7 (1996)
  
- Hikino H., Takahashi M., Murakami M., Konno C., Mirin Y., Karikura M., Hayashi T.; - Isolation and hypoglycemic activity of arborans A and B, glycans of Aloe arborescens var natalensis leaves- International Journal of Crude Drug Research, 24: 183-186 (1986)
  
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiol Rev 89: 193–277,(2009).
  
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutation in human cancers. *Science*, 253: 49-53 (1991).
  
- Hormann H.P., Korting H.C.; - Evidence for the efficacy and safety of topical herbal drugs in dermatology: part I: antiinflammatory agents- Phytomedicine, 1: 161-171 (1994)
  
- Hu Y, Bally M, Dragowska WH, Mayer L. Inhibition of mitogen-activated protein kinase/extracellular signalregulated kinase kinase enhances chemotherapeutic effects on H460 human non-small cell lung cancer cells through activation of apoptosis. Mol Cancer Ther; 2: 641-649 (2003)
  
- Huiling Shena,b,, Wenlin Xu,, Wenjuan Luo, Leilei Zhou, Wei Yong, Fang Chen Chaoyang Wu, Qiaoyun Chen, and Xiao Han Upregulation of mdrl gene is related to activation of the MAPK/ERK signal transduction pathway and YB-1 nuclear translocation in B-cell lymphoma, Experimental Hematology;39:558–5 (2011)

- Hutter J. A., Salmon M., Stavinoha W. B., Satsangi N., Williams R. F., Streeper R. T. e Weintrab S. T.; -Antiinflammatory C-glucosyl chromone from *Aloe barbadensis*. J. Nat. Prod. 59 (5): 541-543 (1996)
  
- Hyung S. K., Sam K., Byung M. L.; - *In vitro* chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). Carcinogenesis 20 (8): 1637-1640 (1999)
  
- Ishii Y., Tanizawa H., Takino Y.; - Studies of Aloe. III. Mechanism of cathartic effect- Chem. Pharm. Bull., 38: 197-200 (1990)
  
- Ishii, Y., Tanizawa, H., Takino, Y. (Studies of aloe. IV. Mechanism of cathartic effect. (3). Biol. Pharm. Bull. (1994)
  
- Ishii Y., Takino Y., Toyo'oka T., Tanizawa H.; - Studies of Aloe. VI. Cathartic effect of isobarbaloin- Biological and Pharmaceutical Bulletin, 21 (11): 1226-1227 (1998)
  
- Izhaki I.; - Emodin- a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants- New Phytologist, 155: 205-217 (2002)
  
- Jia L, Macey Mg, Yin Y, et al. Sub cellular distribution and redistribution of Bcl-2 family proteins in human leukemia cells undergoing apoptosis. Blood ;93(7):2353-9 (1999)
  
- JingYuan L, Hongxing W, Taixia W, Dan W, Zhenghai H Effects of shading on cell ultrastructure and aloin content of Aloe vera L. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica* 26, 1588-1592 (2006).
  
- Jones K. Aloe vera as an immunomodulator. *Nutracos* 7, 11-14 (2008)
  
- Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*;2:1-17 (2002)

- Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*;4:253–65 (2004)
  
- Kahlon J., Kemp M.C.X., Carpenter R.H., McAnalley B.H., McDaniel H.R., Shannon W.M.; - Inhibition of AIDS virus replication by acemannan in vitro- *Molecular Biotherapy*, 3: 127-135 (1991a)
  
- Kahlon J., Kemp M.C.X., Yawei N., Carpenter R.H., Shannon W.M., McAnalley B.H.; - In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir- *Molecular Biotherapy*, 3: 214-223 (1991b)
  
- Kakehi Y., Kanamru H., Yoshida O., Ohkubo H., Nakanishi S., Gottesman M.M., Pastan I.; - Measurement of multidrug-resistance messenger RNA in urogenital cancers; elevated expression in renal cell carcinoma is associated with intrinsic drug resistance- *Journal Urol.*, 139 (4): 862-865 (1988)
  
- Kaufmann SH, Karp Je, Svingen PA, et al. Elevated expression of the apoptotic regulator Mcl-1 at the time of leukemic relapse. *Blood*; 91(3):9911-1000 (1998)
  
- Kawai K., Beppu H., Koike T., Fujita K., Marunauchi T.; - Tissue culture of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger- *Phytotherapy Research*, 7: 5-10 (1993)
  
- Kim H. S., Kacew S., Lee B. M.; - In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*)- *Carcinogenesis*, 20 (8): 1637-1640 (1999)
  
- Kim H.S., Lee B.M.; - Inhibition of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by *Aloe barbadensis* Miller- *Carcinogenesis*, 18 (4): 771-776 (1997)
  
- Klein A.D., Penneys N.S.; - *Aloe vera*- *Journal of the American Academy of Dermatology*, 18: 714-720 (1988)
  
- Korsmeyer S.J.; - Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death- *Blood*, 80 (4): 879-886 (1992)

- Kuo P.L., Lin T.C., Lin C.C.; - The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines- *Life Science*, 71 (16): 1879-1892 (2002)
  
- Kuzuya H., Tamai I., Beppu H., Shimpo K., Chiara T.; - Determination of aloenin, barbaloin and isobarbaloin in Aloe species by micellar electrokinetic chromatography- *Journal of Chromatography*, 752: 91-97 (2001)
  
- Lang F, Foller M, Lang K, Lang P, Ritter M, Vereninov A, Szabo I, Huber SM, Gulbins E. Cell volume regulatory ion channels in cell proliferation and cell death. *Methods Enzymol* 428: 209–225, (2007)
  
- Langmead L., Makins R.J., Rampton D.S.; - Anti-inflammatory effects of Aloe vera gel in human colorectal mucosa in vitro- *Aliment Pharmacological Therapy*, 19: 521-527 (2004)
  
- Lee C. K., Han S. S., Mo Y. K., Kin R. S., Chung M. H., Park Y. I., Lee S. K., Kim Y.S.; -Prevention of ultraviolet radiation- induced suppression of accessory cell function of Langerhans cells by *Aloe vera* gel components. *Immunopharmacology* 37 (2-3): 153-162. (1997)
  
- Lee HZ, Hsu SL, Liu MC, Wu CH. Effects and mechanisms of aloe-emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma. *European Journal of Pharmacology* 431, 287–295 (2001)
  
- Limtrakul P., Chearwae W., Anuchapreeda S., Nandigama K., Ambudkar S.V.; Biochemical mechanism of modulation of Human P-glycoprotein (ABCB1) by curcumin I,II, and III purified from Turmeric powder. *Biochemicol Pharmacology* 6820043-2052. (2004)
  
- Li Y, Li S, Han Y, Liu J, Zhang J, Li F, Wang Y, Liu X, Yao L. Calebin-A induces apoptosis and modulates MAPK family activity in drug resistant human gastric cancer cells. *Eur JPharmacol*; 591: 252-258 (2008)

- Lindsey K.L., Jager A.K., Viljoen A.M; - Cyclooxygenase inhibitory activity of Aloe species- South African Journal of Botany, 68 (1): 47-50 (2002)
  
- Lissoni P, Rovelli F, Brivio F, Zago R, Colciago M, Messina G, Mora A Porro G. Biochemotherapy with Chemotherapy plus *Aloe arborescens* in Patients with Metastatic Cancer, *in vivo* 23: 171-176 (2009)
  
- Lone MA, Dinisha M, Pooja M, Aarti D, Safena RC. Anti-inflammatory and antimicrobial activity of anthraquinone isolated from Aloe vera (Liliaceae). *Asian Journal of Chemistry* 21, 1807-1811 (2009)
  
- Lowe S.W., Schmitt E.M., Osborne B.A., Jacks T.; - P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes- *Nature*, 362: 847-849 (1993)
  
- Luciani F., Molinari A., Lozupone F., Calcabrini A., Lugini L., Stringaro A., Puddu P., arancia G., Cianfruglia M., Fais S.; - P-glycoprotein-actin association through ERM family proteins: a role in P-glycoprotein function in human cells of lymphoid origin- *Blood*, 99 (2): 641-648 (2002)
  
- Luckie,D.B., Krouse,M.E., Harper,K.L., Law,T.C. and Wine,J.J. *Aiti. J. Physiol.*, 267. C650-C658 (1994)
  
- MacKay D., Miller A.L.; - Nutritional support for wound healing- *Alternative Medicine Review*, 8 (4): 359-377 (2003)
  
- Malterud K.E., Farbrot T.L., Huse A.E., Sund R.B.; - Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and antrones- *Pharmacolgy*, 47: 77-85 (1993)
  
- Mamadaliyeva N. Z., Yuldasheva N. K., Ul'chenko N. T., Glushenkova A. I., Ovidi E., Triggiani D., Engamberdieva D., Tiezzi A. Phytochemical investigation of lipophilic fractions of *Scutellaria ramosissima* and their effect on proliferation and microtubule of cancer cells- *Records of natural products*. In press.

- Mandal G., Das A.; - Structure of the glucomannan isolated from the leaves of *Aloe barbadensis* Miller- *Carbohydrates Research*, 87: 249-256 (1980)
  
- Marine JC, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G. Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ.*, 13:927-34 (2006).
  
- Masao Hirose, Yasuhiro Kuroda - P53 may mediate the mdr-1 expression via the WT1 gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines *Cancer Letters* - 129 165–171 (1998)
  
- Maugini E.; – *Manuale di Botanica Farmaceutica*. VII edizione aggiornata – Padova, Italia: Piccin (1994)
  
- Mc Keown E.; - *Aloe vera- Cosmetic Tioletries*, 102: 64-65 (1987)
  
- McAnalley B.H.; - Process for preparation of Aloe products- *European Patent WO 89/06539* (1993)
  
- McDaniel H.R.; - A clinical pilot study using Carrsyn (*Aloe vera* concentrate) treatment of AIDS patients- *American Juornal of Clinical Pathology*, 88 (1987a)
  
- McDaniel H.R., McAnalley B.H.; - Evaluation of poymannoacetate (Carrisyn) in treatment of AIDS- *Clinical Research*, 35: 483A (1987b)
  
- McDaniel H.R., Perkins S., McAnalley B.H.; A clinical pilot study using Carrsyn in the treatment of AIDS- *American Journal of clinical Pathology*, 88: 534 (1987c)-
  
- Mi-Young Park, Hoon-Jeong Kwon, Mi-Kyung Sung, Dietary aloin, aloesin, or aloe-gel exerts anti-inflammatory activity in a rat colitis model, *Life Sciences* 88 486–492 (2011)
  
- Mills J.C., Stone N.L., Pittman R.N.; 1999-

- Nobili S., Landini I., Giglioni B., Mini E., - Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *The journal of cell biology*, 146 (4): 703-707 (2006)
  
- Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell*. 102: 849-862 (2000).
  
- Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ.*, 10: 431-42 (2003).
  
- Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Manabe K, Mori S, Nabekura T. Dual roles of plasmalemmal chloride channels in induction of cell death. *Pflügers Arch* 448: 287–295, (2004).
  
- Okamura N., Asai M., Hine N., Yagi A.; - High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in *Aloe* species. *Journal of Chromatography A* 746: 225-231 (1996)
  
- Park M. K., Park J., Kim N., Shin Y., Choi Y., Lee J., Kim K., Lee S.; -Analysis of 13 phenolic compounds in aloe species by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 9 (4): 186-191 (1998)
  
- Park MY, Kwon HJ, Sung MK. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem*;73: 828–32 (2009a)
  
- Mi-Young Park, Hoon-Jeong Kwon, Mi-Kyung Sung. Dietary aloin, aloesin, or aloe-gel exerts anti-inflammatory activity in a rat colitis model. *Life Sciences* 88 486–492 (2011)
  
- Peaz A, Gebre GM, Gonzalez ME, Tschaplinski TJ. Growth, soluble carbohydrates and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. *Environmental and Experimental Botany* 44, 133-139 (2000)

- Pecere T., Gazzola M. V., Mucignat C., Parolin C., Dalla Vecchia F., Cavaggioni A., Basso G., Diaspro A., Salvato B., Carli M.e Palù G.; -Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Research* 60: 2800-2804 (2000)
  
- Pellizzoni M, Molinari GP, Lucini L Stability of the main Aloe fractions and Aloe-based commercial products under different conditions. *Agrochimica*, LV, 288-296 (2011)
  
- Peng S.Y., Norman J., Curtin G., Corrier D., Mc Daniel H. R., Busbee D.; -Decreased mortality of Norman Murine Sarcoma in mice treated with the immunomodulator Acemannan. *Mol. Biother.* 3: 79-87 (1991)
  
- Penneys N.S.; - Inhibition of arachidonic acid oxidation in vitro by vehicle components- *Acta Derm. Venereol.* 62: 59-61 (1982)
  
- Poulsen, K.A., Andersen, E.C., Hansen, C.F., Klausen, T.K., Hougaard, C., Lambert, I.H., and Hoffmann, E.K., Deregulation of Apoptotic Volume Decrease and Ionic Movements in Multidrug Resistant Tumor Cells: Role of Chloride Channels, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, , vol. 298, pp. C14–C25 (2010)
  
- Ramachandran C., Rabi T., Fonseca H.B., Melnick S.J., Escalon E.A.; - Novel plant triterpenoid drug amooranin overcomes multidrug resistance in human leukaemia and colon carcinoma cell lines- *International Journal of Cancer*, 105 (6): 784-789 (2003)
  
- Rebecca W., Kayser O., Hagels H., Zessin K.H., Madundo M., Gamba N.; - The phytochemical profile and identification of main phenolic compounds from the leaf exudate of *Aloe secundiflora* by high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy- *Phytochemical Anal.*, 14(2): 83-86 (2003)
  
- Reynolds T. Observations on the phytochemistry of the aloe leaf exudate compounds. *Botanical Journal of the Linnean Society* 90, 179–200 (1985)
  
- Ruetz,S. and Gros.PCell, 77. 1071-1081 (1994)

- Reynolds T., Dweck A.C.; - Aloe vera leaf gel: a review update- Journal of Ethnopharmacology, 68: 3-37 (1999)
  
- Sabeh F., Wright T., Norton S.J.; - Isozymes of superoxide dismutase from Aloe vera- Enzyme Protein, 49: 212-221 (1996)
  
- Sakai R.; - Epidemiologic survey on lung cancer with respect to cigarette smoking and plant diet. Jpn. J. Cancer Res. 80 (6): 513-20 (1989)
  
- Sato Y., Ohta S., Shinoda M.; - Studies on chemical protectors against radiation. XXXI. Protection effects of *Aloe arborescens* on skin injuri induced by X-irradiation. Yakugaku Zasshi. 110: 876-84 (1990)
  
- Schinkel,A.H. et al. Cell, 77, 491-502 (1994)
  
- Schmitt CA. Cellular senescence and cancer treatment. Biochim Biophys Acta; 1775: 5-20 (2007)
  
- Shelton R.M.; - Aloe vera. Its chemical and therapeutic properties- International Journal of Dermatology, 30: 679-683 (1991)
  
- Shimpo K., Chihara T., Beppu H., Ida C., Kaneko T., Nagatsu T., Kuzuya H.; - Inhibition of Azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in rat colorectum by whole-leaf *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger- Phytotherapy Research, 15: 705-711 (2001)
  
- Shimpo K., Chikako I., Chihara T., Beppu H., Kaneko T., Kuzuya H.; - Aloe arborescens extract inhibits TPA-induced ear oedema, putrescine increase and tumour promotion in mouse skin- Phytotherapy research, 16: 491-493 (2002)
  
- Shimpo K, Chihara T, Beppu H, Ida C, Kaneko T, Hoshino M, Kuzuya H. Inhibition of azoxymethane-induced DNA adduct formation by *Aloe arborescens* var. *natalensis*. Asian Pac J Cancer Prev; 4: 247–251 (2003)

- Smit, J.J.M. et al. *Cell*, 75, 451-462 (1993)
  
- Speranza G, Morelli CF, Tubaro A, Altinier G, Durì L, Manitto P. Aloeresin I, an antiinflammatory 5-methylchromone from cape aloe. *Planta Med*;71:79–81 (2005)
  
- Strasburger, - *Trattato di Botanica, Parte sistematica* (1995).
  
- Strickland F. M., Darvill A., Albersheim P., Eberhard S., Pauly M., Pelley R. P.; -Inhibition of UV-induced immune suppression and interleukin-10 production by plant oligosaccharides and polysaccharides. *Photochem. Photobiol.* 69 (2): 141-7 (1999)
  
- Sydiskis R. J., Owen D. G., Lohr J. L., Rosler K. H., Blomster R. N.; -Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother* 35 (12): 2463-2466 (1991)
  
- Syed T. A., Ahmad S. A., Holt A. H., Ahmad S. H. e Afzal M.; - Management of psoriasis with Aloe vera extract in a hydrophilic cream: a placebo-controlled double-blind study. *Trap. Med. Int. Health* 1 (14): 505-509 (1996)
  
- Takara K., Sakaeda T., Okumura K., –An update on overcoming MDR1-mediated multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Curr Pharm Des.*;12(3):273-86. (2006)
  
- Takzare N, Hosseini MJ, Hasanzadeh G, Mortazavi H, Takzare A, Habibi P. Influence of Aloe Vera gel on dermal wound healing process in rat. *Toxicol Mech Methods*;19(1):73–7 (2009)
  
- T’Hart L.A., Van den Berg A.J., Kuis L., Van Dijk H., Labadie R.P.; - An anti-complementary polysaccharide with immunological adjuvant activity from the leaf parenchyma gel of Aloe vera- *Planta Medica*, 55: 509-512 (1989)
  
- Triggiani D, Ceccarelli D, Tiezzi A. From plants to pharmaceuticals. In basic and applied research: A. Tiezzi and A. Santucci, Editors. *Plant Biomolecules*:. Gangemi Press; 163-176 (2006)

- Tsuda H., Matsumoto K., Ito M. e Hirono I.; - Inhibitory effect of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger (Kidachi Aloe) on induction of preneoplastic focal lesions in the rat liver. *Phytotherapy research*. Vol. 7, 543-547 (1993)
  
- Uehara N., Iwahori Y., Asamoto M. et al.; - Decreased levels of 2 amino- 3-methylimidazo (4,5-f)quinoline-DNA adducts in rats treated with betacarotene, a-tocopherol and freeze-dried Aloe- *Japan Journal Cancer Research*, 87: 342-348 (1996)
  
- Valverde,M.A., Diaz,M., Sepulveda,F.V., Gill,D.R., Hyde,S.C. and Higgins,C.F. *Nature*, 355, 830-833 (1992)
  
- Valverde Miguel A , Tamara D.Bond1, Simon PRHardy1, Jenny C.Taylor1, Christopher F.Higgins113, Julio Altamirano4'5 and Francisco J.Alvarez-Leefmans4'5'6The EMBO The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease *Journal* vol.15 no.17 pp.4460-4468 (1996)
  
- Van Den Berg A. J. J. e Labadie R. P.; -Quinones. *Methods in plant biochemistry* Vol. 1 (451-486) (1989)
  
- Van den Berg A.J.J., Labadie R.P.; - Quinones. In: Dey PM, Harborne JB, eds. *Methods in plant biochemistry*, Vol.1 plant phenolics- London, UK: Academic Press, 451-491 (1989)
  
- Vasquez B, Avila G., Segura D. e Escalante B.; - Antiinflammatory activity of extract from *Aloe vera* gel. *J. Ethnopharmacol.* 55 (1): 69-75 (1996)
  
- Vousden KH, Lu X. Live or die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2:594-604 (2002).
  
- Waller G.R., Mangiafico S., Ritchey C.R.; - A chemical investigation of *Aloe barbadensis* Miller- *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 58: 69-76 (1978)

- Wamer, W.G., Vath, P., Falvey, D.E. In vitro studies on the photobiological properties of aloe emodin and aloin A. *Free Radic. Biol. Med.* (2003)
  
- Wang HH, Chung JG, Ho CC, Wu CT, Chang SH. Aloe-emodin effects on arylamine N-acetyl transferase activity in the bacteria *Helicobacter pylori*. *Planta Medica* 64, 176-178 (1998)
  
- Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. P53 mutation are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*; 84:3148-57 (1994)
  
- Weaver, J.G., Tarze, A., Moffat, T.C., Lebras, M., Deniaud, A., Brenner, C., Bren, G.D., Morin, M.Y., Phenix, B.N., Dong, L., Jiang, S.X., Sim, V.L., Zurakowski, B., Lallier, J., Hardin, H., Wettstein, P., van Heeswijk, R.P., Douen, A., Kroemer, R.T., Hou, S.T., Bennett, S.A., Lynch, D.H., Kroemer, G., Badley, A.D., Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *Journal of Clinical Investigation* 115, 1828–1838 (2005)
  
- Woodland C., Koren G., Wainer I.W., Batist G., Ito S.; - Verapamil metabolites:potential P-glycoprotein-mediated multidrug resistance reversal agents- *Cancer Journal Physiol. Pharmacol.* 81 (8): 800-805 (2003)
  
- Wu YW, Ouyang J, Xiao XH, Gao WY, Liu Y. Antimicrobial properties and toxicity of anthraquinones by microcalorimetric bioassay. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 24, 45-50 (2006)
  
- Yagi A., Egusa T., Arase M., Tanabe M., Tsuji H.; -Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation - promoting activity on human and hamster cells in vitro from *Aloe vera* gel. *Planta Med.* 63 (1): 18-21 (1997)
  
- Yagi A., Kabash A., Mizuno K., Moustafa S.M., Khalifa T.I., Tsuji H.; - Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel- *Planta Medica*, 69: 269-271 (2003)

- Yagi T., Yamauchi K., Kuwano S.; - The synergistic purgative action of aloe-emodin anthrone and rhein anthrone in mice: synergism in large intestinal propulsion and water secretion. *J. Pharm Pharmacol.* 49 (1): 22-25 (1997)
  
- Yamamoto M., Akimoto N., Masui T.; - Studies on determination of b-sitosterol in aloe- Shizuoka-ken Eisei Kankyo Senta Hokoku, 29: 47-51 (1986)
  
- Yamamoto M., Masui T., Sugiyama K., Yokota M., Nakagomi K., Nakazawa H.; - Anti-inflammatory active constituents of *Aloe arborescens* Miller- *Agric. Biol. Chem.*, 55: 1627-1629 (1991)
  
- Yang,C.P.H., Cohen,D., Greenberger,L.M., Hsu,S.I.H. and Horwitz,S.B. *J. Biol. Chem.*, 265, 10282-10288 (1990)
  
- Yasuda, K., Yokoyama, K., Ushiyama, H., Ogava, H. & Kawai, Y.. Barbaloin content and stability in foods containing Aloe. *Journal of food Hygienic Society of Japan*, 38, 33-340 (1997)
  
- Yoshimoto R., Kondoh N., Isawa M., Hamuro J.; - Plant lectin, ATF1011, on the tumor cell surface augments tumor- specific immunity through activation of T cells specific for the lectin – *Cancer Immunology Immunotherapy*, 25: 25-30 (1987)
  
- Zhang J.T. The multi-structural feature of the multidrug resistance gene product Pglycoprotein: implications for its mechanism of action (hypothesis). *Molecular membrane Biology* 18: 145-152 (2001).