

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Farmacologia ed Anestesiologia di Padova

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE
INDIRIZZO: Farmacologia, Tossicologia e Terapia
CICLO XXIII

**Studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'attività
antiproliferativa dell'olio essenziale di *Pistacia lentiscus***

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Rosa Maria Gaion
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini
Supervisore: Ch.mo Prof. Maria Carrara

Dottorando: Elisabetta Casarin

SUMMARY

The phytocomplex from *Pistacia lentiscus*, a shrub of the Anacardiaceae family, is an essential oil obtained by hydrodistillation of leaves, fruits or from a trunk exudate (mastic gum). The mastic gum has been known to be effective in several gastric diseases, against *Helicobacter Pylori* and for its antibacterial and antifungine activities. Furthermore, *Pistacia* oil's major chemical constituents are monoterpenes with chemiopreventive and chemiotherapeutic properties.

We investigated the antiproliferative properties of the volatile oil from *Pistacia lentiscus* twigs and leaves using human cell lines from ovarian (2008 and *cis*-platinum resistant, C13*) and colon (LoVo) adenocarcinoma, and human stable fibroblast line (HFFF2) as in vitro models.

The MTT test showed that, after 3-hour treatment, phytocomplex (about 150 µg/ml) was able to inhibit the growth of all adenocarcinoma cell lines. After 24 hour treatment the IC₅₀ on 2008 and LoVo cells resulted 3 times lower. On fibroblast line the phytocomplex was active only after 72 hour treatment. Western blotting analysis confirmed the oil capability to reduce carcinoma cell growth by decreasing the expression of p-ERK, MAPKs induced by mitogenic stimuli. In treated cells: vacuolisation, decreasing cellular size and brightness, directly proportional to reduction of cell viability, were observed by optical microscope.

Using annexin V with propidium iodide we observed that oil was able to stimulate apoptosis in a dose-dependent manner.

ROS has been recognized as an important mediator of the stress response; in particular, by regulating the loss of $\Delta\Psi_m$. Furthermore upstream of ROS generation there is a respiratory chain block that leads even an increase of mitochondrial membrane potential.

Analysis of mitochondrial membrane potential, with Rhodamine123, and ROS generation, with H₂DCF-DA, showed the oil capability to activate mitochondrial apoptotic pathway. Oil-treatment also induced alteration on H⁺ gradient and interruption of electron flow between respiratory chain complexes III and IV, thereby causing loss of ATP.

In the initiation of apoptosis caspases play critical roles. They can be grouped into "apoptotic initiators", for example caspase 8 and 9, and "apoptotic effectors", such as caspase 3, according to their substrate specificities and target proteins. Our data indicated that *Pistacia lentiscus* oil caused programmed cell death via a caspase-dependent pathway. In fact, after 3-hour treatment and 21-hour incubation, caspase 3 activity level, resulted higher than in the control, especially for the highest dose used.

We also performed a flow cytometry-based cell cycle analysis, observing that the phytocomplex induced dose-dependent arrest in G₂/M phase by decreasing cyclin B1 levels on all adenocarcinoma lines, especially on ovarian cells, and acting on acetylated tubulin and microtubules' polymerization/depolymerization.

RIASSUNTO

Il fitocomplesso ricavato da *Pistacia lentiscus*, una pianta arbustiva della famiglia delle *Anacardiaceae*, è un olio essenziale ottenuto per idrodistillazione da foglie, frutti o dall'essudato del tronco (mastice). Il mastice (il più noto dei fitocomplessi) è risultato essere efficace verso vari disturbi a livello gastrico e contro l'*Helicobacter Pylori* ed inoltre di avere attività antibatterica ed antifungina. I principali costituenti degli oli ottenuti dal genere *Pistacia* sono i monoterpeni che presentano proprietà preventive e chemioterapiche. Oggetto di studio di questi tre anni di dottorato è un olio essenziale di *Pistacia lentiscus*, ottenuto per idrodistillazione da foglie e ramoscelli, testato su una linea cellulare di adenocarcinoma del colon (cellule LoVo), una di adenocarcinoma dell'ovaio (cellule 2008) e la loro variante *cis*-platino resistente (cellule C13*) ed una linea di fibroblasti umani (cellule HFFF2).

Il test dell'MTT dimostra che dopo 3 ore di trattamento il fitocomplesso, alla dose di 150 µg/ml circa, è in grado di inibire la proliferazione di tutte le linee di adenocarcinoma. Dopo 24 ore di trattamento, invece, l'IC₅₀ risulta 3 volte inferiore per le linee LoVo e 2008. Per contro, sulla linea non tumorale di fibroblasti umani il fitocomplesso si dimostra attivo solo dopo 72 ore di trattamento. L'analisi mediante Western blotting conferma la capacità dell'olio di ridurre la crescita cellulare delle cellule di adenocarcinoma diminuendo in maniera dose-dipendente l'espressione delle p-ERK, MAP chinasi indotte da stimoli mitogeni. Mediante microscopia ottica, inoltre, si può apprezzare come le cellule trattate risultino più piccole, rotondeggianti e meno "luminose", ad indicare una loro minore vitalità.

Approfondendo i meccanismi d'azione dell'olio (mediante l'utilizzo di annexina V e ioduro di propidio) si osserva che il trattamento è in grado di attivare nelle cellule tumorali meccanismi di morte cellulare programmata.

E' noto che i ROS sono degli importanti mediatori della risposta agli stress cellulari, in particolare attraverso la mediazione della perdita del potenziale della membrana mitocondriale $\Delta\Psi_m$, e che, a monte della produzione di ROS, c'è un blocco della catena respiratoria che porta ad un concomitante aumento del $\Delta\Psi_m$. Le analisi del $\Delta\Psi_m$, mediante Rodamina 123, e della generazione di ROS, utilizzando H₂DCF-DA, dimostrano la capacità dell'olio di attivare la via apoptotica mitocondriale. Il trattamento è quindi anche in grado di indurre un'alterazione nel gradiente protonico ed un'interruzione del passaggio di elettroni attraverso la catena respiratoria causando così anche la diminuzione della produzione di ATP.

Nell'attivazione del processo apoptotico le caspasi giocano un ruolo cruciale. Questi enzimi, a seconda della specificità di substrato e del target, possono essere raggruppati in "iniziatori" o "effettori" di apoptosi, tra questi ultimi la caspasi 3 risulta essere sicuramente la più importante. I nostri risultati indicano che l'olio di *Pistacia lentiscus* è in grado di attivare la morte cellulare

programmata attraverso la via caspasi-dipendente. Infatti, dopo 3 ore di trattamento e 21 di incubazione, i livelli della caspasi 3 si dimostrano più alti rispetto a quelli del controllo, specialmente per la dose maggiore adottata.

E' stata effettuata anche un'analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare che ha permesso di osservare come il fitocomplesso induca un arresto del ciclo in fase G₂/M in maniera dose-dipendente. Questo arresto avviene attraverso una diminuzione dei livelli citoplasmatici di ciclina B1, specialmente nelle linee di adenocarcinoma ovarico, e agendo sui livelli di tubulina acetilata e sui meccanismi di polimerizzazione/depimerizzazione dei microtubuli.

INDICE

CAPITOLO 1	1
<i>Introduzione</i>	<i>1</i>
1.1 FARMACI DI ORIGINE VEGETALE	1
1.1.1 Droghe vegetali e loro variabilità	1
1.1.2 Fitoterapia, Aromaterapia e Fitocomplesso	3
1.1.3 Cancro e prodotti di origine vegetale	6
1.2 ESSENZE E RESINE	6
1.2.1 Composizione	7
1.2.2 Significato fisiologico e diffusione	7
1.2.3 Preparazione	8
1.2.4 Analisi qualitativa e quantitativa	9
1.2.5 Utilizzo	9
1.3 GENERE <i>PISTACIA</i>	10
1.3.1 Variabilità della composizione chimica dell'olio essenziale di <i>Pistacia lentiscus</i>	14
1.3.2 Prevenzione del cancro e terapia mediante monoterpeni di origine alimentare	15
1.4 MORTE CELLULARE PROGRAMMATA: APOPTOSI	17
1.3.1 I geni della famiglia Bcl-2	17
1.3.2 Le caspasi	17
1.3.3 La via intrinseca	18
1.3.4 La via estrinseca	20
1.5 CICLO CELLULARE	20
1.5.1 Cdk e cicline	20
1.5.2 mitosi	21
1.5.3 microtubuli e fuso mitotico	22
1.5.4 Farmaci che agiscono sui microtubuli	23
CAPITOLO 2	25
<i>Scopo</i>	<i>25</i>

CAPITOLO 3	29
<i>Materiali e metodi</i>	29
3.1 SOLUZIONI	29
3.2 LINEE CELLULARI	30
3.3 TERRENI DI COLTURA	30
3.4 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	31
3.5 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO	31
3.5.1 Effetto antiproliferativo in presenza di N-acetilcisteina	32
3.5.2 Effetto antiproliferativo in co-trattamento con <i>cis</i> -platino	32
3.5.3 MTT test	32
3.6 MORFOLOGIA	33
3.7 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE	33
3.7.1 Meccanismi di morte cellulare in presenza di N-acetilcisteina	33
3.8 PERMEABILITA' DI MEMBRANA CELLULARE	34
3.9 VARIAZIONE DEL POTENZIALE DELLA MEMBRANA MITOCONDRIALE	34
3.10 PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS	35
3.10.1 produzione intracellulare di ROS in presenza di N-acetilcisteina	35
3.11 VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE DI ATP	35
3.11.1 Quantificazione delle proteine mediante kit BCA	36
3.12 ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 3 E DELLA CASPASI 8	36
3.13 ESPRESSIONE CITOPLASMATICA DI PROTEINE DELLA PROLIFERAZIONE	37
3.13.1 Preparazione dei lisati	37
3.13.2 Quantificazione delle proteine mediante Lowry modificato	38
3.13.3 Western blotting	38
3.14 PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE	39
3.15 MECCANISMI MITOTICI	39
3.12 ASPETTI STRUMENTALI	40
3.13 ANALISI STATISTICA	41

CAPITOLO 4	43
<i>Risultati</i>	43
4.1 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO	43
4.2 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO SU FIBROBLASTI UMANI	46
4.3 ESPRESSIONE CITOPLASMATICA DELLE ERK FOSFORILATE	47
4.4 MORFOLOGIA	49
4.5 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE	50
4.6 PERMEABILITA' DI MEMBRANA CELLULARE	53
4.7 VARIAZIONE DEL POTENZIALE DELLA MEMBRANA MITOCONDRIALE	54
4.8 PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS	56
4.9 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO IN PRESENZA DI N-ACETILCISTEINA	58
4.10 VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE DI ATP	60
4.11 ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 3	61
4.12 ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 8	62
4.13 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO IN CO-TRATTAMENTO CON <i>CIS</i> -PLATINO	63
4.14 PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE	64
4.15 ESPRESSIONE CITOPLASMATICA DELLA CICLINA B1	67
4.16 INFLUENZA SUI MECCANISMI MITOTICI	68
CAPITOLO 5	71
<i>Discussione</i>	71
BIBLIOGRAFIA	85

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 FARMACI DI ORIGINE VEGETALE

In base alle norme attualmente vigenti nell'Unione Europea, può essere definito farmaco vegetale (*herbal remedy*) un prodotto che contiene, come principi attivi, esclusivamente piante medicinali o preparazioni di piante medicinali. Una "preparazione" (*vegetable drug preparation*) consiste in piante medicinali sminuzzate o polverizzate, estratti, tinture, oli essenziali e grassi, succhi di spremitura, ecc., cioè in generale tutte le preparazioni ottenute con procedimenti di frazionamento, purificazione e concentrazione. Possono far parte delle preparazioni di piante medicinali solventi, diluenti e conservanti (Alberton, 2000).

Accanto ad usi pressoché magici e rituali delle piante (che peraltro spesso sortiscono i risultati desiderati) ancora presenti presso popoli di cultura primitiva, è possibile avvalersi, nelle società più avanzate, di farmaci di origine vegetale estremamente validi anche dal punto di vista scientifico (Pedretti, 1983).

Attualmente le droghe sono oggetto di ricerche in ambito scientifico e la farmacologia moderna, confermando ed ampliando le conoscenze del passato, spesso stimola e viene stimolata dalla sperimentazione clinica controllata. Ogni nuova scoperta in questo campo offre, peraltro, una visione più ampia della materia e meritevole di nuovi studi. Oggi possiamo avvalerci di farmaci fitoterapici titolati in principi attivi di cui conosciamo sempre meglio l'azione farmacodinamica, anche se la complessità della formula chimica e del meccanismo d'azione di tali medicamenti può fornire nuovi elementi di conoscenza (Alberton, 2000).

In tutto il mondo le piante vengono tuttora utilizzate per la cura delle patologie più diffuse: tale scelta è stata avvalorata anche dai grandi organismi internazionali preposti alla difesa della salute pubblica, come l'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'Organizzazione delle Nazioni Unite, che hanno promosso ricerche sull'utilizzazione delle piante medicinali, la classificazione terapeutica delle stesse e l'elaborazione di norme concernenti la purezza dei prodotti e l'attività delle preparazioni galeniche (Alberton, 2000).

1.1.1 Droghe vegetali e loro variabilità

Le droghe vegetali possono essere ricavate sia da piante spontanee che coltivate ed il metodo di produzione scelto è generalmente dettato da fattori economici. In particolare, se la pianta spontanea non è particolarmente diffusa o i costi di raccolta sono elevati, è più

Introduzione

conveniente scegliere la coltivazione; ovviamente vale il contrario se la pianta è diffusa o se i costi di raccolta non sono rilevanti (Fassina e Ragazzi, 1995).

Quando la pianta è coltivata è possibile controllare le condizioni del terreno, la luce, l'umidità e le malattie che la possono colpire, in modo da garantirne uno sviluppo ottimale, soprattutto nel caso di piante erbacee o di non grandi dimensioni. Questo controllo delle condizioni può portare all'ottimizzazione della crescita che si traduce in una maggiore resa in principi attivi (Fassina e Ragazzi, 1995).

Lo sviluppo della pianta, e quindi il suo contenuto in principi attivi, può essere influenzato da fattori sia endogeni che esogeni.

Tra i fattori endogeni si possono ricordare:

- *Selezione* cioè l'identificazione di componenti con caratteristiche utili: è quindi possibile ottenere una popolazione omogenea definita *clone* ricca in principi attivi desiderati;
- *Ibridazione* cioè l'opposto della selezione: vengono infatti incrociati individui dalle caratteristiche diverse e ciò che si ottiene sono caratteri instabili;
- *Mutazioni* cioè il risultato di modificazioni dei caratteri genetici (Fassina e Ragazzi, 1995); possono essere spontanee oppure indotte artificialmente da agenti chimici o fisici e possono determinare sia la perdita di un carattere genetico, che la comparsa di un nuovo carattere ereditario. Un esempio di mutazione è rappresentato dalla *poliploidia*, nella quale il numero di cromosomi passano da $2n$ ad n maggiori;
- *Stadio di sviluppo*: le piante medicinali, o le loro parti atte a fornire la droga, devono essere raccolte in un periodo ben preciso detto *tempo balsamico*, durante il quale vi è il maggiore contenuto in principi attivi. Questo periodo è in rapporto con il ciclo vitale e con l'età della pianta e talvolta anche con l'ora del giorno (Fassina e Ragazzi, 1995).

Tra i fattori esogeni si possono ricordare:

- *Clima* cioè l'insieme di tutti gli elementi che caratterizzano una determinata regione, quali l'illuminazione, la temperatura e l'umidità;
- *Latitudine ed Altitudine*: di notevole importanza sia per la composizione chimica dei grassi vegetali (*latitudine*) che per il contenuto in essenze (*altitudine*);
- *Composizione del terreno* che gioca un ruolo essenziale sull'accrescimento e sulle funzioni dell'organismo vegetale, determinando la disponibilità di ioni organici, acqua, aria e humus nell'ambiente a diretto contatto con l'apparato radicale assorbente;
- *Fattori biotici* cioè le interazioni che si possono creare fra specie vegetali vicine; nascono così fenomeni di *simbiosi*, quando una pianta vicino ad una altra ne facilita la crescita, oppure di *antibiosi*, quando si verifica antagonismo nella crescita;

- *Habitat di origine* cioè l'insieme di microambienti che possono condizionare la crescita della pianta. In laboratorio si possono ricreare le condizioni ottimali per la crescita mediante ricostruzioni di tipo tecnologico-sintetico definite *fitotroni*.

Alla luce di tutto ciò, per assicurare il rispetto di adeguati principi per l'ottenimento di droghe e farmaci di buona qualità, i prodotti devono attenersi alla Farmacopea, nella quale sono descritti le metodiche e i procedimenti analitici adatti al riconoscimento ed alla determinazione quantitativa degli ingredienti attivi che devono essere contenuti nelle forme farmaceutiche, nonché i limiti di tolleranza per il contenuto in ingredienti attivi ed impurezze.

Le attuali conoscenze nel campo della farmacologia vegetale, associate alle raffinate potenzialità diagnostiche moderne, permettono di porre in atto efficaci cure mediche con estratti di piante medicinali scientificamente irreprensibili e generalmente dotati di un alto indice terapeutico (Alberton, 2000).

1.1.2 Fitoterapia, Aromaterapia e Fitocomplesso

L'uso integrale delle droghe delle piante medicinali è un concetto diverso dall'uso della molecola pura e farmacologicamente attiva. Infatti non si usa un composto chimico puro e isolato, ma la droga *in toto* o le sue preparazioni galeniche (Penso, 1987; Pedretti, 1983).

In quest'ottica la pianta medicinale viene vista come un organismo unitario, nel quale ogni costituente ha una propria ragione di essere: nell'economia di una pianta tutte le sostanze hanno una funzione ben precisa e tutte queste funzioni interagiscono reciprocamente dando luogo al suo metabolismo (Penso, 1987; Pedretti, 1983).

Isolando un composto farmacologicamente attivo (es. glucoside, alcaloide, tannino ecc.) esso viene separato dall'insieme degli altri composti ("inattivi o meno attivi") presenti nel tessuto vegetale che ne integrano, anche per sinergismo, la funzione (enzimi, amidi, cere, albumine, mucillagini, gomme, sali minerali ecc.) (Penso, 1987; Pedretti, 1983).

La terapia praticata con medicamenti d'origine vegetali è detta fitoterapia, dal greco *phitòn*, pianta, e *therapeia*, cura, mentre l'applicazione specifica degli oli essenziali è detta aromaterapia, utilizzata già ai tempi degli Egizi e dei Babilonesi (Alberton, 2000).

Per "droga vegetale" s'intende la parte della pianta (corteccia, radice, foglie, fiori ecc.) che si utilizza per il consumo o per l'estrazione del fitocomplesso o dei principi attivi. Il fitocomplesso è un insieme di principi attivi ed ha una determinata azione farmacologia (Alberton, 2000).

In altre parole le droghe delle piante medicinali comprendono un insieme di composti chiamato fitocomplesso, definito come "*entità biochimica complessa che rappresenta l'unità farmacologica integrale della pianta medicinale*".

Introduzione

Il fitocomplesso possiede i seguenti requisiti (Pedretti, 1983):

- è un'entità dinamica, poiché si forma attraverso la concomitante presenza e mutua relazione di molteplici molecole (oligoelementi, sali minerali, vitamine, enzimi ecc.);
- i suoi costituenti se considerati singolarmente mostrano proprietà biologiche modificate, ridotte o addirittura nulle;
- le funzioni biologiche delle singole molecole che lo formano sono complementari e producono, oltre ad azioni specifiche su funzioni ed organi, anche effetti generali sull'intero organismo. I risultati terapeutici, inoltre, sono diversi e più complessi di quelli ottenibili con l'uso dei soli principi attivi (Pedretti, 1983);
- può difficilmente essere studiato analiticamente, con metodiche che ne alterano l'unità ed il dinamismo, ma può venire efficacemente testato attraverso gli effetti clinici (Pedretti, 1983; Weiss, 1996);
- mostra di possedere proprietà nutritive e di modulare l'omeostasi cellulare e tissutale, poiché tende a coadiuvare le funzioni vitali della cellula: da qui gli effetti generalmente lenti e duraturi, la buona tollerabilità e maneggevolezza (Penso, 1987; Pedretti, 1983; Weiss, 1996).

In base a queste caratteristiche è quindi possibile che un estratto possieda proprietà farmacologiche e terapeutiche complessive differenti da quelle dei principali singoli costituenti chimici. In molti casi, può anche avvenire che i principali costituenti siano singolarmente meno potenti del fitocomplesso o addirittura inattivi. Poiché la preparazione degli estratti rappresenta un passaggio obbligato ai fini della caratterizzazione chimica e biologica di una specie vegetale, è sempre presente il quesito sulla convenienza di sviluppare l'estratto piuttosto che un suo costituente puro, la cui risoluzione dipende dai risultati delle indagini farmacologiche e tossicologiche (Penso, 1987; Pedretti, 1983; Rossi, 1995).

Naturalmente per gli stessi motivi è possibile anche il contrario e alcune attività biologiche di interesse farmacologico potrebbero restare celate all'interno del fitocomplesso in virtù della presenza di possibili interazioni negative.

La variabilità della composizione chimica e, conseguentemente, dell'attività biologica delle sostanze vegetali, costituisce non solo il maggiore ostacolo per lo studio e l'applicazione terapeutica, ma anche un problema di difficile soluzione per la stesura di una regolamentazione che voglia garantire la sicurezza, l'efficacia e la qualità dei farmaci vegetali (Firenzuoli, 2003b).

L'interpretazione delle proprietà farmacologiche, tossicologiche e cliniche di una pianta è quindi spesso incerta, perché i risultati delle singole sperimentazioni sono riferibili solo alla specifica droga o preparazione sottoposte ad indagine (Firenzuoli, 2003b). È illustrativo a riguardo la situazione della kawa (nome dato alla pianta dalle popolazioni polinesiane). La radice di questa pianta (*Piper methysticum*) è stata usata per secoli dagli abitanti delle isole del Pacifico come euforizzante durante le feste religiose (Kraft, 2001). In Occidente, ha avuto un

recente successo come ansiolitico. Si sono verificati circa 30 casi di gravi epatotossicità in pazienti che assumevano prodotti a base di kawa, tanto che le autorità dei vari Paesi ne hanno imposto il ritiro dal mercato. Uno studio successivo ha dimostrato come l'estratto acquoso della kawa non solo non sia epatotossico, ma che addirittura possa esercitare un'azione epatoprotettrice (Kraft, 2001). È stato ipotizzato che negli estratti commerciali, per lo più ottenuti con solventi organici, siano presenti dei composti epatotossici che non sono presenti nell'estratto acquoso, ma su questi estratti non sono al momento disponibili dati tossicologici che possano risolvere il dilemma.

Verificare la bioequivalenza è spesso impossibile per la maggior parte delle preparazioni vegetali, dato che i principi attivi sono noti solo in parte o totalmente ignoti e non è quindi possibile sapere cosa occorra determinare negli studi di farmacocinetica e tossicocinetica. Quando sono noti almeno i principali costituenti chimici attivi, questi composti vengono utilizzati per la standardizzazione degli estratti, che può essere effettuata prendendo come riferimento intere classi di composti quando questi sono determinabili analiticamente con lo stesso metodo. Ovviamente, la precisione del titolo degli estratti standardizzati sulla base di una classe chimica diminuisce con l'aumentare del numero dei composti della classe presenti nel fitocomplesso e delle differenze relative nei singoli pesi molecolari. Per esempio, l'escina impiegata per la standardizzazione degli estratti dei semi dell'ippocastano (*Aesculus hippocastanum*) è costituita da tre gruppi di composti (α -escina, β -escina e criptoeugenolo) e in uno di questi (β -escina) si trovano almeno 30 diversi glicosidi di agliconi triterpenici. Non è quindi certo che gli estratti di una stessa pianta standardizzati allo stesso titolo dello stesso marker siano bioequivalenti, tuttavia la standardizzazione rappresenta al momento l'unico sistema per consentire un certo grado di comparabilità degli effetti farmacologici e clinici degli estratti.

Anche gli studi tossicologici e farmacologici *in vitro* risentono della complessità e della variabilità del fitocomplesso. Due impostazioni sono oggi seguite: una tende ancora all'individuazione del singolo componente attivo, mentre l'altra studia il preparato di origine vegetale nel suo complesso titolato nei componenti maggiormente presenti. Entrambe le impostazioni tuttavia presentano dei limiti. La prima perché ignora di fatto la composizione globale, rischiando di tralasciare aspetti fondamentali dell'attività. La seconda, d'altra parte, di fatto "rinuncia" ad una determinazione precisa dell'attività farmaco-tossicologica, impedendone o comunque limitandone l'eventuale applicazione terapeutica.

Vi sono molti studi clinici controllati condotti con prodotti medicinali vegetali, ma purtroppo i loro risultati non sono uniformi. (Firenzuoli, 1999a, 2003b). Errori nella selezione o nella randomizzazione dei pazienti possono dare risultati falsamente positivi (più raramente falsamente negativi). Il metodo migliore è quello basato su meta-analisi o rassegne sistematiche e dei migliori studi clinici (Firenzuoli 1999a, 2003b, Ernst 2004), del tipo di quelli

Introduzione

condotti da organizzazioni come la Cochrane Collaboration e la Peninsula Medical School presso l'Università di Exeter & Plymouth in Inghilterra, diretto da Edzard Ernst (Ernst 2004).

Con questo approccio è stata ragionevolmente provata l'efficacia di un discreto numero di medicine vegetali. Esiste tuttavia un generale accordo sul fatto che, in mancanza di una convincente evidenza di efficacia, l'esperienza empirica maturata nell'utilizzo di determinati prodotti vegetali sia una prova accettabile della loro utilità. L'utilizzo di prodotti appartenenti a quest'ultima categoria è regolamentato in base a norme stabilite dalla Direttiva 2004/24/EC del 31 marzo 2004, pubblicata sulla *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee*.

1.1.3 Cancro e prodotti di origine vegetale

I prodotti naturali hanno da sempre rappresentato un'ottima risorsa per la cura del cancro, da sottolineare infatti che tra le 250.000 varietà di piante saggiate più di un migliaio hanno dimostrato di possedere attività antineoplastica. Molte molecole si sono rivelate di eccezionale efficacia, anche se molto lavoro rimane ancora da fare.

Tra le molecole che hanno raggiunto la pratica clinica è sicuramente da menzionare il Taxolo, che si è dimostrato particolarmente attivo nel trattamento di numerose neoplasie fra quelle ovariche e mammarie refrattarie alle classiche terapie.

Un'altra importante molecola è la Podofillotossina, da cui per modificazioni sintetiche si è giunti allo sviluppo dell'Etoposide, ampiamente utilizzata nella cura dei tumori polmonari e testicolari. Ampiamente studiata è anche la Camptotecina, isolata dalla *Camptoteca acuminata* e risultata attiva su carcinomi della mammella e colonrettali. Se da un lato non possono essere dimenticate Vincristina, Vinblastina e Colchicina da tempo entrate nella pratica clinica, dall'altro deve essere menzionato il Flavoperidolo (Mukherjee, 2001), un analogo semisintetico derivato dalla Rohitukina, alcaloide purificato da un estratto della corteccia di *Dysoxylum binectariferum*, pianta tradizionalmente utilizzata in India nella medicina popolare (Naik, 1988) recentemente entrato in Fase II di sperimentazione clinica.

1.2 ESSENZE E RESINE

Le essenze sono costituite da una miscela di sostanze volatili, presenti principalmente nelle piante appartenenti alle famiglie delle Pinacee, Labiate, Mirtacee e Umbrellifere. Questi composti, noti anche come oli essenziali o oli eterei, sono liquidi caratterizzati da un'elevata tensione di vapore, insolubili o poco solubili in acqua, solubili in alcool, etere ed oli fissi. Come tutte le sostanze grasse lasciano una macchia traslucida sulla carta che però non è stabile e scompare per evaporazione. Possiedono forte odore per lo più gradevole.

Le resine sono prodotti di secrezione delle piante, da cui trasudano spontaneamente o in seguito ad eventi traumatici ed incisioni artificialmente indotte. Si possono formare dagli oli essenziali mediante processi di polimerizzazione ed ossidazione. E' nota infatti la tendenza

degli oli essenziali a resinificare anche *in vitro*. A conferma di questa probabile via biosintetica sta il fatto che spesso le resine si trovano in natura disciolte in oli essenziali a formare balsami, cioè quei liquidi di consistenza sciropposa da cui si può separare per evaporazione la parte volatile della resina. I balsami, od oleoresine, si diversificano quindi dalle resine propriamente dette per il loro contenuto in oli essenziali (15% - 30%) che li rendono più fluidi rispetto alle resine, contengono inoltre elevate quantità di acido benzoico e cinnamico.

Le essenze e le resine sono generalmente presenti nella pianta, indipendentemente dall'evento traumatico, in dotti schizolisigeni, cavità o peli ghiandolari. Si trovano in tutti i tipi di organi (radici, cauli, foglie, fiori, semi). Generalmente, gli oli essenziali ottenuti dai diversi organi di una pianta hanno composizione simile. La composizione chimica delle essenze varia sia in funzione del ciclo vegetativo sia in base a fattori estrinseci quali le condizioni climatiche in cui la pianta si sviluppa. In particolare la temperatura, l'umidità, l'esposizione al sole ed i venti influenzano il contenuto in oli essenziali soprattutto quando sono depositati in strutture superficiali (peli ghiandolari).

Nelle piante si trovano delle miscele chiamate gommo-resine, che si caratterizzano per la presenza di una frazione polisaccaridica simile alle gomme.

Tutti questi prodotti non sono costituiti da composti chimici bene definiti, ma sono un miscuglio di sostanze più o meno complesse. Vengono quindi caratterizzate in base a differenze chimico-fisiche. Le resine sono solide, a struttura amorfa, non volatili, dotate di odore caratteristico, insolubili in acqua, solubili nei solventi organici. Per riscaldamento fondono in liquidi viscosi, ma non diventano volatili. Sono resistenti agli agenti chimici ed alla putrefazione, bruciano con fiamma fuliginosa, vengono precipitate dalle soluzioni alcoliche per aggiunta di acqua (Fassina e Ragazzi, 1995).

1.2.1 Composizione

I principali costituenti chimici degli oli essenziali e delle resine sono rappresentati da idrocarburi terpenici e da derivati ossigenati degli stessi (alcoli, aldeidi, chetoni, acidi, ecc.). Questi ultimi sono responsabili del profumo e del sapore degli oli essenziali. In una determinata essenza, o resina, in genere si trovano principalmente composti dell'uno o dell'altro gruppo; si possono quindi suddividere in essenze e resine terpeniche o fenoliche (Fassina e Ragazzi, 1995).

1.2.2 Significato fisiologico e diffusione

Il ruolo fisiologico degli oli essenziali negli organismi vegetali non è ancora del tutto chiaro. A queste sostanze si attribuiscono principalmente due possibili significati: quello di prodotti di disintossicazione derivanti dal metabolismo o quello di metaboliti secondari di deposito. Alcuni

Introduzione

studiosi attribuiscono invece ad essenze e resine un preciso significato bioetico, quale ad esempio quello di attrarre insetti, di fungere da agenti difensivi contro parassiti, di esplicare azione riparatrice di ferite vegetali.

La secrezione di balsami in seguito a ferite è però un evento limite; generalmente essenze e resine sono infatti presenti nella pianta indipendentemente dall'evento traumatico.

Nei tessuti le essenze possono formarsi in cellule non differenziate, ad esempio nelle cellule epidermiche di foglie e fiori (Lauracee), ma più sovente si formano in particolari cellule di natura epiteliale situate sulla superficie dei tessuti (peli secretori o ghiandole, Fam. Labiate e Composite) o che rivestono cavità (tasche, Fam. Mirtacee e Rutacee) o in canali secretori (Fam. Ombrellifere e Conifere) (Fassina e Ragazzi, 1995).

1.2.3 Preparazione

Alcune droghe contenenti oli essenziali sono usate come tali, ma più spesso le essenze vengono isolate dal materiale vegetale. I metodi di estrazione devono essere adatti alle caratteristiche del materiale di partenza, tenendo presente che il metodo di estrazione può influenzare notevolmente le proprietà organolettiche e farmacologiche dell'essenza. In alcuni casi, l'estrazione avviene per pressione: si schiaccia e si raccoglie l'olio essenziale ottenuto dalle sacche secretrici dell'epicarpo di arancio, limone e bergamotto.

La distillazione in corrente di vapore acqueo è comunque il metodo più utilizzato; si sfrutta infatti l'elevata tensione di vapore degli oli essenziali che vengono così trascinati via dal vapore. La distillazione avviene spesso in presenza di acqua per facilitare l'estrazione dei composti (idrodistillazione). Successivamente, per raffreddamento della miscela acqua-essenza, si effettua la separazione. L'acqua di distillazione contiene sempre piccole quantità di olio essenziale e può quindi venire ridistillata o essere anche impiegata come tale.

Il materiale vegetale, prima di essere sottoposto a distillazione, viene talvolta pre-trattato per ottenere il massimo rendimento: le droghe che possiedono canali o vacuoli nei tessuti più interni sono finemente suddivise in modo da facilitare il processo di diffusione dell'essenza (chiodi di garofano, eucalipto). In questo caso, il materiale frammentato deve essere subito sottoposto a distillazione per evitare trasformazioni (ossidazioni) e perdite dell'essenza stessa. Quando invece l'olio essenziale si trova in peli ghiandolari superficiali (lavanda, menta e salvia) la resa maggiore si ottiene dalla droga intera.

Per quanto riguarda la produzione commerciale delle resine si usa incidere o battere la corteccia delle piante produttrici. In altri casi si procede all'estrazione della droga con solventi, in genere idrocarburi alifatici, ma è necessario valutare l'eventuale tossicità dei solventi impiegati (Fassina e Ragazzi, 1995).

1.2.4 Analisi qualitativa e quantitativa

Nella droga gli oli essenziali possono essere evidenziati direttamente colorando le sezioni con le medesime tecniche usate per gli oli grassi. La determinazione quantitativa si esegue sottoponendo la droga a distillazione in corrente di vapore d'acqua in apparecchio idoneo. Il distillato viene raccolto in un tubo graduato in presenza di cilene per fissare l'essenza e misurarne il volume.

Per quanto riguarda l'analisi delle singole essenze, molti costituenti possono essere identificati microchimicamente: in un opportuno contenitore si lascia evaporare qualche goccia di essenza e, al di sopra di esso, viene sospesa, su carta da filtro, una goccia di reattivo sciolto in acido acetico al 15 - 30% (per esempio, p-nitrofenilidrazina e p-nitrobenzoilidrazina per l'identificazione di aldeidi e chetoni); i componenti volatili reagiscono così formando derivati colorati caratteristici (Fassina e Ragazzi, 1995).

Per riconoscere e caratterizzare un olio essenziale non è generalmente sufficiente considerare un solo costituente che può rappresentare un elemento poco specifico, ma avviene quindi in base a più parametri, quali le caratteristiche organolettiche, fisiche e chimiche (densità, indice di acidità, solubilità in alcol etilico, attività ottica, ecc.). E' anche possibile utilizzare analisi cromatografiche che, rapidamente e con maggior sicurezza, caratterizzano ed eventualmente evidenziano eventuali sofisticazioni della droga. La Farmacopea Ufficiale Italiana (XI Ed.) riporta i gas-cromatogrammi caratteristici di varie essenze.

1.2.5 Utilizzo

L'impiego delle essenze e la conoscenza delle tecniche di distillazione sono molto antiche, ma è solo nel XVIII secolo che inizia il loro impiego sistematico nella cura delle malattie.

Oggi si utilizzano le droghe come tali o, più frequentemente, gli oli essenziali da esse ottenuti. Bisogna però ricordare che l'attività farmacologica dell'olio essenziale non corrisponde, quantitativamente e spesso anche qualitativamente, a quello per la droga per intero. Ad esempio, l'olio essenziale ottenuto dal rosmarino esplica un'azione antibatterica, mentre l'infuso è impiegato come antispasmodico e coleretico nei disturbi digestivi. Questo si spiega ricordando come la composizione della droga sia sempre più complessa rispetto al solo olio essenziale. Si può infatti osservare che l'attività degli oli essenziali, e ancor più delle relative droghe, non può essere imputata ad un singolo componente ma, in genere, al miscuglio dei diversi composti.

Gli oli essenziali sono utilizzati come correttivi dei caratteri organolettici di molte preparazioni, ma possono essere impiegati anche come veri e propri farmaci. Le azioni farmacologiche più note di questo gruppo di composti sono quelle antisettica e antiparassitaria, quella irritante della cute e delle mucose e quella sul sistema nervoso centrale.

Introduzione

L'azione antisettica e antiparassitaria trova applicazione per uso esterno nella preparazione delle pomate, saponi e soluzioni disinfettanti. Responsabili di quest'azione sono principalmente i derivati fenolici, i quali presentano un'attività antisettica da 5 a 20 volte maggiore del fenolo stesso. Per uso interno, gli oli essenziali venivano usati per l'azione antisettica sul tratto urinario e sull'albero respiratorio.

Le proprietà irritanti rendono ragione del loro impiego, molto frequente in passato, come revulsivi per uso esterno, e come espettoranti per uso interno.

Molte droghe contenenti oli essenziali sono tuttora impiegate in preparazioni aperitive, digestive e carminative (anice, finocchio, menta, ecc.). Tali effetti si verificano in parte per via indiretta: molti di questi composti, responsabili spesso del sapore amaro, stimolano infatti le papille gustative determinando per via riflessa secrezione salivare e gastrica. E' tuttavia presente anche un'azione diretta, dovuta all'effetto lievemente irritante sulla mucosa gastrointestinale. Viene inoltre riferita una blanda azione antispastica (melissa, rosmarino, camomilla, menta, ecc.) impiegata in affezioni del tratto digestivo.

Sul sistema nervoso centrale possono esercitare una modesta azione sedativa, per cui sono indicati come coadiuvanti nel trattamento delle insonnie e di disturbi psicosomatici. Altre droghe ed oli essenziali inducono invece effetti stimolanti: la canfora ad esempio, esercita una blanda azione analettica mentre l'assenzio è eccitante sulla corteccia motoria fino alla comparsa di convulsioni. Per alcuni derivati fenolici (eugenolo, safrolo, miristicina, ecc.) si ipotizza una biotrasformazione cerebrale con formazione di analoghi strutturali dell'amfetamina e questo spiegherebbe, almeno in parte, gli effetti eccitatori provocati da elevate dosi di droghe ad essenze.

Tra le azioni peculiari di alcuni oli essenziali, non più sfruttate in terapia, ricordiamo quella antielmintica (chenopodio, seme santo) e quella eccitante la muscolatura uterina (ruta, sabina, thuja, assenzio). Se da un lato gli oli essenziali non trovano più largo impiego terapeutico, dall'altro sono però evidenziate nuove attività: i sesquiterpeni possiedono, ad esempio, un'interessante azione antibiotica (Fassina e Ragazzi, 1995).

1.3 GENERE *PISTACIA*

Il genere *Pistacia* (fam. Anacardacee) comprende diverse specie ed è costituito da alberi di medio sviluppo (4 - 5 m) o da arbusti con corteccia resinosa, tronco ramificato alla base di colore grigio, rami penduli, foglie impari-pennate e caduche. E' una specie dioica (piante maschili e femminili), fiorisce prima dello sviluppo delle foglie, tra marzo e maggio ed ha una fruttificazione alternante negli anni. I frutti sono drupe con epicarpo e mesocarpo di colore chiaro che si separano facilmente dall'endocarpo legnoso, i semi sono ricchi di grassi (54%) e di sostanze azotate (22%) ed hanno un sapore aromatico.

La più completa classificazione delle specie appartenenti al genere *Pistacia* è quella di Zohary (1952), il quale in base alle caratteristiche morfologiche delle foglie e dei semi, ha descritto 11 specie e le ha raggruppate in 4 sezioni (Tabella 1) (Parafitt e Badenes, 1997):

SEZIONI	SPECIE
<i>Lenticella Zoh.</i>	<i>P. mexicana</i> HBK <i>P. texana</i> Swingle
<i>Eu Lentiscus Zoh.</i>	<i>P. lentiscus</i> L. <i>P. saporte</i> Burnatt <i>P. weinmannifolia</i> Poisson
<i>Butmela Zoh.</i>	<i>P. atlantica</i> Desf.
<i>Eu Terebinthus</i>	<i>P. chinensis</i> Bge <i>P. khinjuk</i> Stocks <i>P. palestina</i> Bois <i>P. terebinthus</i> <i>P. vera</i> L.

Tabella 1: Classificazione del genere *Pistacia* secondo Zohary (1952).

Le tre specie maggiormente diffuse nell'area mediterranea, dal Medio Oriente all'Europa sono:

- *P. vera*
- *P. terebinthus*
- *P. lentiscus*

Pistacia vera

La specie *P. vera*, da cui si ricavano le drupe per uso alimentare, è caratteristica delle zone temperate dell'Asia Minore, coltivata in Sicilia, è soprattutto abbondante in Grecia e nelle Isole dell'Egeo. Questa specie è nota fin dall'antichità come dimostrano alcune citazioni del Vecchio Testamento; già i Persiani nel VI secolo a.C. e pure i Greci sin dal III secolo a.C. la conoscevano e la utilizzavano. Nell'antica Roma si diffuse alla fine del regno di Tiberio, anche se alcuni autori ritengono che il Pistacchio (*Pistacia vera*) sarebbe giunto in Italia, precisamente in Sicilia, in un periodo successivo portato dagli Arabi.



Gli alberi sono di altezza non superiore ai 3 metri, con radici profonde e tronco breve, generalmente contorto. I rami principali sono grigiastri e portano radi ramoscelli giallo-rossastri;

Introduzione

le foglie sono composte, trifogliate ma anche 1 o 5 fogliate, di forma ovale a margine intero, caduche coriacee, vellutate da giovani, in seguito glabre su tutta la superficie. E' una specie dioica. I semi, rivestiti di un tegumento fragile e sottile, di sapore aromatico, sono usati come condimento, ma sono anche sfruttati per ottenere un olio giallo pallido, di odore gradevole, utilizzato in alcune preparazioni farmaceutiche.

Pistacia terebinthus

Arbusto diffuso in tutto il bacino del Mediterraneo, in particolar modo in Portogallo (Gola, 1946), in Italia si trova soprattutto nella parte meridionale della penisola e nelle isole. L'albero può raggiungere i 5 metri di altezza, è dotato di foglie composte, costituite da 5-13 foglioline; i fiori sono riuniti in pannocchie che producono drupe di 6 mm di lunghezza e di colore rosso alla maturità. Il Terebinto è caratterizzato da foglie imparipennate e caduche, a picciolo non alato, e da infiorescenze nascenti all'ascella delle foglie caduche.



Le foglie in presenza dell'insetto *Pemphigus utricularius* (Caputo, 1975) formano delle galle di sapore amaro molto ricche di tannino dette "carrube di Giudea", utilizzate un tempo come tonico ed espettorante e nel trattamento della tosse, dell'asma, della febbre, del vomito, dei morsi di serpente e punture di scorpione (Ansari, 1993), ora invece usate in conceria e tintoria. L'estratto della loro resina è costituito essenzialmente da triterpeni tetraciclici e pentaciclici, che hanno dimostrato attività antinfiammatoria nella cura dell'infiammazione auricolare, acuta e cronica, indotta nel ratto (Giner-Larza, 2000).

Pistacia lentiscus

La specie *P. lentiscus* è una pianta sempreverde a portamento arbustivo alta fino a 3 metri, raramente arboreo alta fino a 8 metri, con accentuato odore di resina; la chioma è generalmente densa per la fitta ramificazione, di forma globosa e con rami a portamento tendenzialmente orizzontale; la corteccia è squamosa, di colore cenerino nei giovani rami e bruno-rossastro nel tronco; il legno è di colore roseo.



Le foglie sono alterne, paripennate, glabre, di colore verde cupo; sono composte da 6-10 segmenti ottusi ellittico-lanceolati a margine intero e apice ottuso, lunghi fino a 30 mm, con piccolo mucrone apicale e rachide leggermente alato.

I fiori sono dioici (maschili e femminili separati in piante differenti), attinomorfi, pentameri, tetraciclici, sono raggruppati in pannocchie cilindriche brevi e dense disposte all'ascella delle foglie dei rametti dell'anno precedente: i fiori maschili hanno 4 - 5 stami ed un pistillo rudimentale, sono vistosi per la presenza di stami di colore rosso vivo; i fiori femminili sono verdi con ovario supero e non presentano petali. I frutti sono drupe globose o lenticolari, di diametro 4 - 5 mm, carnose, rossastre, tendente al nero a maturità, che contengono un seme.

La fioritura ha luogo in primavera, da aprile a maggio. I frutti rossi sono ben visibili in piena estate e in autunno e maturano in inverno.

Per quanto riguarda l'habitat, è una pianta eliofila, termofila e xerofila che vegeta dal livello del mare fino a 600 metri. È un tipico componente della macchia mediterranea sempreverde e spesso si ritrova in associazione con l'olivastro, la fillirea ed il mirto; è molto adattabile per il terreno, predilige però suoli silicei. Resiste bene a condizioni di prolungata aridità, mentre teme le gelate. Non è una specie colonizzatrice ma può assumere l'aspetto dominante nelle fasi di degradazione della macchia, in particolare dopo ripetuti incendi (Pignatti, 2003; Conti, 2005).

La droga è data dalle concrezioni di resina essudata dalla pianta, chiamata gomma o mastice di lentisco, si presenta in grani globosi o piriformi, di colore giallo-pallido o verdognolo, di consistenza vetrosa, con superficie trasparente, liscia, lucente, spesso incrinata; ha odore debolmente balsamico, sapore acre amaro. Dal punto di vista chimico è composta per il 25% da acido masticonico, per il 20-30% da masticoresine, per il 4% da acido masticinico e per il 2% da pinene e da sostanze amare. Ha proprietà stomachiche, astringenti, espettoranti ed emostatiche. In Oriente è utilizzata come *masticatorio* per rafforzare le gengive e profumare l'alito (Masseri, 1981).

Le proprietà terapeutiche dell'olio ottenuto dal mastice di *P. lentiscus*, proveniente dall'isola di Chio erano note già nell'antichità.

In epoca più recente la letteratura riporta che:

- l'olio essenziale ricavato dalla resina ha elevata attività antibatterica, è fungicida e può anche proteggere lo stomaco da alcuni insulti cancerosi (Conner e Beuchat, 1984);
- l'estratto acquoso di *P. lentiscus*, ricco di potassio, calcio e magnesio, ha evidenziato nel ratto azione ipotensiva (Sanz, 1988);
- la corteccia e le foglie sono indicate contro la diarrea e la blenorragia;
- Il mastice, anche a basse dosi, agisce rapidamente contro l'ulcera peptica ed è efficace contro l'*Helicobacter pylori* (Huwez, 1998). Per quanto riguarda quest'ultimo punto, studi recenti hanno dimostrato che il mastice è in grado di indurre significative modificazioni morfologiche a carico del batterio. In particolare, le cellule di *H. pylori* mostrano, dopo trattamento, contorni irregolari e frequenti distacchi della parete dalla membrana citoplasmatica.

1.3.1 Variabilità della composizione chimica dell'olio essenziale di *Pistacia lentiscus*

L'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* si ottiene mediante idrodistillazione di foglie e frutti oppure dall'essudato del tronco (mastiche).

Numerosi sono gli studi riguardanti la composizione chimica dell'olio ottenuto dalle foglie di *P. lentiscus*. Il primo, del 1966, riporta l'analisi di un olio proveniente dalla Francia che risulta particolarmente ricco di monoterpeni. Dall'analisi degli studi riportati in letteratura è possibile concludere che, a seconda dell'area geografica di provenienza, i vari oli sono caratterizzati da un diverso monoterpene, in particolare il myrcene è presente per 19 - 25% nell'olio proveniente dalla Spagna e dalla Sicilia (Calabro e Curro, 1974; Boelens e Jemenez, 1991); l' α -pinene è presente per il 16% in quello francese (Buil, 1975); il terpen-4-ol è presente per 22% in quello proveniente dalla Sardegna (Castola, 2000) ed il δ -3-carene caratterizza (65%) l'olio egiziano (De Pooter, 1991). Componenti presenti in minor quantità sono alcuni sesquiterpeni, quali: D-germacrene (9%) (Boelens e Jemenez, 1991), il β -caryophyllene (3.5 - 9%) (Buil, 1975; Boelens e Jemenez, 1991), δ -cadinene e α -cadinolo (6% di ognuno) (Buil, 1975), β -bisabolene, β -bourbonene e caryophyllene oxide (circa 3 - 4% di ognuno) (De Pooter, 1991).

Le concentrazioni dei vari monoterpeni cambiano significativamente se l'olio è ottenuto dal frutto. In particolare, confrontando due oli uno proveniente dalla Spagna (Boelens e Jemenez, 1991) ed uno dall'Australia (Wyllie, 1990) si ottengono, quali maggiori componenti, myrcene (rispettivamente 72 e 39%), α -pinene (10 e 28%) ed il limonene (7 e 11%).

Gli oli ottenuti per idrodistillazione dal mastiche proveniente dalla Spagna e dalla Grecia sono invece caratterizzati da un elevato contenuto di α -pinene (65 - 86%) e da un basso contenuto di myrcene (3 - 25%) (Scurbis e Markakis, 1975; Papageorgiou, 1981; Katsiotis e Oikonomou, 1984; Boelens e Jemenez, 1991).

Magiatis e coll. (1999), mediante gas-cromatografia e spettroscopia di massa, hanno identificato 69 componenti di tre oli essenziali di *P. lentiscus*, var. *chia*, ottenuti rispettivamente dalle foglie, dai ramoscelli e dal mastiche. In tabella 2 sono riportati i componenti presenti in maggiore quantità.

COMPOSTO	FOGLIE	RAMOSCELLI	RESINA
α -pinene	0.78	1.83	66.48
Myrcene	20.58	47.92	8.34
trans-Caryophyllene	8.33	4.75	2.04
Germacrene-D	13.30	15.46	-
δ -cadinene	7.00	2.58	-
α -cadinolo	7.33	2.28	-

Tabella 2: Composizione chimica percentuale dell'olio essenziale di *P. lentiscus* var. *chia*. Composti elencati in ordine di eluizione da una colonna HP-5 MS.

1.3.2 Prevenzione del cancro e terapia mediante monoterpeni di origine alimentare

I monoterpeni sono composti non nutritivi di origine alimentare presenti nell'olio essenziale di agrumi, di ciliegia, di menta verde, di anice e di altre piante commestibili.

Le loro funzioni possono essere sia chemioattrattive che chemiorepellenti, in quanto sono i principali responsabili del profumo della pianta. Si tratta di semplici isoprenoidi costituiti da 10 atomi di carbonio; non sono presenti nei mammiferi, mentre nelle piante derivano dal mevalonato. Nella menta, ad esempio, il *d*-limonene si forma dalla ciclizzazione del geranylpirofosfato per azione dell'enzima limonene sintetasi (Croteau, 1987) e funge a sua volta da precursore di numerosi altri monoterpeni monociclici come il carvone, il carveol ed il perillyl alcool (Elson e Yu, 1994).

Nei roditori il *d*-limonene ha azione chemiopreventiva verso i tumori della mammella, della pelle, del fegato, dei polmoni e dello stomaco (N.T.P., 1990; Hursting, 1995; Vigushin, 1998; Lu, 2003). Anche altri monoterpeni hanno dimostrato un'interessante attività chemiopreventiva soprattutto nelle prime fasi di sviluppo del tumore (Hudes, 2000; Bailey, 2002; Burke, 2002; Clark, 2003; Liston, 2003; Liu, 2003; Azzoli, 2003; Elegbede, 2003; Lu, 2003). Nel ratto il peryllil alcool nella fase di promozione svolge un'attività chemiopreventiva nei confronti del cancro epatico indotto chimicamente (Mills, 1995; Azzoli, 2003) ed è molto efficace nel prevenire le ricorrenze tumorali o tumori secondari negli animali e nell'uomo in terapia con chemioterapici (Haag, 1994; Murren, 2002; Bailey, 2002; Liu, 2003; Azzoli, 2003; Hudes, 2000; Ahn, 2003; Rajesh, 2003a, b). Nel topo il geraniol ha attività antitumorale *in vivo* verso le leucemie l'epatoma e il melanoma (Shoff, 1991; Yu, 1995; Lluria-Prevatt, 2002; Clark, 2003; Burke, 2002). Le proprietà chemioterapiche del peryllil alcool e del *d*-limonene nei tumori mammari e pancreatici dei roditori sono state ben studiate. Ad esempio, per quanto riguarda il *d*-limonene

Introduzione

studi ulteriori hanno confermato come sia l'isomero *d*- a svolgere l'azione di inibizione della crescita di cellule tumorali e come il meccanismo d'azione prevalente sia l'induzione di una morte cellulare programmata (apoptosi) (Lu, 2003, 2004).

Negli ultimi anni sono stati avviati numerosi *trial* clinici per testare l'attività chemioterapica del limonene (Poon, 1996; Crowell, 1999; Vigushin, 1998) e del perillil alcool (Satomi, 1999; Ariazi, 1999; Ripple, 2000; Hudes, 2000; Shi, 2002; Bailey, 2002; Lluria-Prevatt, 2002; Murren, 2002; Burke, 2002; Ahn, 2003; Azzoli, 2003; Liston, 2003; Liu, 2003; Rajesh, 2003a, b; Clark, 2003; Elegbede, 2003; Morgan-Meadows, 2002, 2003).

Numerosi sono i meccanismi che sembrano giocare un ruolo importante per spiegare l'attività antitumorale dei monoterpeni. Il limonene e gli altri monoterpeni presentano effetti chemiopreventivi durante la fase di iniziazione del carcinoma mammario probabilmente dovuti all'induzione degli enzimi di Fase I e di Fase II metabolizzanti i cancerogeni e che portano ad una detossificazione del cancerogeno stesso. Il *d*-limonene di origine vegetale, infatti, quando viene somministrato a dosi tali da ottenere un'attività chemiopreventiva è in grado di indurre il citocromo P-450 totale (Ariyoshi, 1975; Austin, 1988; Maltzman, 1991). Gli isoenzimi specifici del citocromo P-450 indotti dal *d*-limonene includono il CYP-2B1 e il CYP-2C (Maltzman, 1991). Nella fase di post-iniziazione la soppressione del tumore può essere dovuta all'induzione di apoptosi e/o all'inibizione dell'isoprenilazione post-traslazionale delle proteine regolatrici della crescita cellulare. Trattando con monoterpeni tumori mammari chimicamente indotti si ottiene una ridifferenziazione, un concomitante aumento dell'espressione del recettore per il fattore di crescita Il mannosio-6-fosfato/insulino simile, e la trasformazione del fattore di crescita β -1 (Crowell, 1999).

Da sottolineare, inoltre che gli effetti antitumorali dei monoterpeni di origine alimentare si accompagnano ad una scarsa tossicità (Elson e Yu, 1994; Crowell e Gould, 1994; Crowell, 1994; Stark, 1995). Non c'è differenza, ad esempio, tra il peso corporeo di cavie con tumore trattate con perillil alcool ed i loro controlli senza tumore (Stark, 1995). I monoterpeni quindi, hanno una considerevole attività antitumorale a cui si associano una bassa tossicità ed un nuovo meccanismo d'azione, diverso da quello dei convenzionali farmaci anticancro (Crowell, 1996).

1.4 MORTE CELLULARE PROGRAMMATA: APOPTOSI

La morte cellulare programmata è un evento indispensabile nell'omeostasi tissutale, oltre che nel normale sviluppo embrionale ed è per tale motivo che ogni cellula contiene un programma genico altamente regolato in grado di controllare la propria morte (Samali, 1999; Adrain, 2001).

Le cellule muoiono in risposta a numerosi stimoli e durante l'apoptosi lo fanno in modo controllato. Questo distingue l'apoptosi dall'altro meccanismo di morte cellulare, chiamato necrosi, nel quale la morte non controllata porta a lisi cellulare e ad una risposta infiammatoria. L'apoptosi, invece, è un processo in cui le cellule giocano un ruolo attivo, per questo è anche chiamata suicidio cellulare (Dash).

Si conoscono due vie di morte apoptotica, quella intrinseca, mediata dal mitocondrio, e quella estrinseca mediata da recettori di membrana; in entrambi i casi le cellule coinvolte presentano caratteristiche morfologiche comuni, inclusi la riduzione del volume, il *blebbing* di membrana, l'addensamento della cromatina e la frammentazione del DNA (Samali, 1999; Adrain, 2001). Per entrambe le vie le caspasi e le proteine della famiglia di Bcl-2 giocano un ruolo chiave sia nella regolazione che nell'esecuzione dei fenomeni apoptotici (Paoletti, 2004).

1.4.1 I geni della famiglia Bcl-2

Questa famiglia comprende numerosi geni, i più importanti dei quali sono *bax* e *bcl-2*. Le proteine generate dalla trascrizione di questi geni (Bax e Bcl-2) sono coinvolte nella regolazione del processo di morte cellulare sia con effetto pro- che anti-apoptotico.

Bax ha attività pro-apoptotica, è infatti normalmente localizzato nel citoplasma ma, in seguito a stimoli apoptotici, è trasferito sulla membrana mitocondriale esterna dove forma degli omo-oligomeri che funzionano come dei pori (Simon, 2000). Le specie reattive dell'ossigeno, ROS, partecipano attivamente alla formazione di questi pori poiché, determinando modificazioni conformazionali nella struttura della proteina, permettono il processo di oligomerizzazione.

Bcl-2, per contro, svolge attività anti-apoptotica, inibendo sia l'attivazione del complesso proteico *apoptosoma* (attivatore della cascata delle caspasi) che il processo di oligomerizzazione di Bax (Adrain, 2001; Neuzil, 2006).

1.4.2 Le caspasi

Le caspasi sono cistein proteasi che tagliano i propri substrati in corrispondenza di un residuo d'acido aspartico. Esse costituiscono un gruppo di almeno 14 proteine che differiscono tra loro nella sequenza primaria e nella specificità per i substrati. Le caspasi sono sintetizzate come proenzimi inattivi e la loro attivazione avviene in seguito ad un taglio proteolitico, in

Introduzione

corrispondenza di un residuo di acido aspartico. Tale attivazione può avvenire anche ad opera di altre caspasi in un processo di trans-attivazione (Samali, 1999).

Le caspasi mediano due importanti funzioni: la maturazione delle citochine e l'apoptosi. Quelle coinvolte nel processo apoptotico possono, a loro volta, essere distinte in iniziatrici ed effettrici. In particolare, le caspasi iniziatrici (caspasi 8 e 9) attivano le effettrici (caspasi 3 e 7) che, agendo su diversi substrati, causano la morte cellulare (Paoletti, 2004).

La caspasi 3, sicuramente la più importante tra le effettrici, è responsabile della proteolisi di molte proteine importanti nel mantenimento del genoma e nella riparazione del DNA, come l'enzima nucleare Poli-(ADP-Ribosio)-Polimerasi (PARP), il fattore di frammentazione del DNA (DFF), la deossiribonucleasi (CAD) e varie proteine del citoscheletro (Samali, 1999).

Dal momento che la caspasi 3 viene attivata sia nella via intrinseca che in quella estrinseca, un aumento cellulare della sua forma attiva è un chiaro indice di apoptosi (Paoletti, 2004).

1.4.3 La via intrinseca

La via intrinseca di morte cellulare è indotta da molti e differenti stimoli, quali farmaci antineoplastici, radiazioni, ipossia e shock termico (Martinez-Ruiz, 2008).

I mitocondri giocano un ruolo decisivo nella regolazione di questa via. La più importante cascata biochimica mitocondriale è la fosforilazione ossidativa, una serie coordinata di reazioni *redox* catalizzate da cinque subunità multienzimatiche situate nella membrana mitocondriale interna e da due fattori solubili (il citocromo C e il coenzima Q). Il suo ruolo è di trasportare gli elettroni all'interno dello spazio intermembrana. La fosforilazione ossidativa genera un gradiente elettrochimico attraverso la membrana mitocondriale interna che viene dissipato dall'ATP-sintetasi per generare la maggior parte delle riserve intracellulari di ATP. In una cellula eucariotica sana circa duemila mitocondri producono più del 90% dell'ATP intracellulare (Galluzzi, 2010), molecola chiave nella regolazione e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e necessaria per portare avanti il processo di morte programmata (Comelli, 2003). L'apoptosi, infatti, è un processo metabolicamente attivo che coinvolge le singole cellule e, anche quando porta alla rimozione di numerose cellule, non è mai accompagnata da fenomeni infiammatori.

In condizione di stress, segnali vitali e di morte si oppongono l'un l'altro a livello delle membrane mitocondriali. Se predominano gli stimoli pro-apoptotici, la membrana mitocondriale subisce variazioni di permeabilità dovute alla formazione di pori di transizione (PTP) sulla sua parte esterna, la cui apertura è favorita dall'aumento della concentrazione mitocondriale di ioni calcio e/o di ROS (Paoletti, 2004).

Le specie reattive dell'ossigeno sono composti altamente reattivi contenenti ossigeno in forma radicalica o meno come ad esempio l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) ed il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Simon, 2000).

L'origine dei ROS è prevalentemente mitocondriale: nel complesso I e nel complesso III della catena respiratoria. Durante il normale trasferimento di elettroni dal donatore NADH all'ossigeno molecolare, una quantità compresa tra 1 e 5% di questi elettroni viene persa formando anione superossido (Lenaz, 2005).

A basse concentrazioni, i ROS possono essere considerati come messaggeri intracellulari coinvolti in numerose funzioni, tra cui la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi. Ad alte concentrazioni, invece, risultano tossici per la cellula determinandone la morte (Kim, 2005; Simon, 2000). Per tale motivo la produzione di ROS viene strettamente controllata dai sistemi enzimatici di difesa cellulare: l'anione superossido (O_2^-) viene ridotto a perossido di idrogeno dalla superossido dismutasi (SOD) mitocondriale, che viene quindi convertito in acqua dalla catalasi o dalla glutazione perossidasi (Nie, 2000; Lenaz, 2005).

Agenti che agiscono sui complessi della catena respiratoria o sulle proteine disaccoppianti la fosforilazione ossidativa inibiscono il trasporto di elettroni, determinando così un'aumentata produzione di ROS (Neuzil, 2006).

I mitocondri però, oltre ad essere fonte di ROS, ne sono anche il bersaglio. I ROS infatti aumentano la permeabilità della membrana mitocondriale favorendo:

- a) la dissipazione del potenziale che immediatamente porta al blocco della sintesi dell'ATP,
- b) la traslocazione dal mitocondrio al citosol di numerose proteine che normalmente sono confinate nello spazio intermembrana, ove esercitano funzioni vitali. Questi fattori possono essere suddivisi in tre categorie principali: attivatori diretti delle caspasi (citocromo C), attivatori indiretti delle caspasi (Smac/Diablo) ed effettori caspasi-indipendenti (AIF, endonucleasi G). Sono rilasciati in seguito alla formazione di pori sulla membrana e mediano la morte cellulare (Galluzzi, 2010).

AIF trasloca nel nucleo dove, attivando una DNAsi (ciclofilina A), determina la frammentazione del DNA (Nie, 2009), mentre Smac (o Diablo) neutralizza l'azione delle IAP (proteine inibenti l'apoptosi) o proteine inibitrici l'apoptosi impedendone il legame con le caspasi (Adrain, 2001).

Il citocromo C si lega alla proteina Apaf-1 causandone un cambiamento conformazionale ATP-dipendente che determina la frammentazione di Apaf-1 in diversi oligomeri, i quali si legano alla procaspasi 9 attivando così la caspasi 9. Il complesso citocromo C - Apaf-1 - caspasi 9 è detto *apoptosoma*.

La caspasi 9 proteolizza quindi la procaspasi 3 attivando la caspasi 3, mettendo così in moto il meccanismo di morte cellulare (Paoletti, 2004).

Introduzione

1.4.4 La via estrinseca

L'induzione di apoptosi attraverso questa via è mediata da numerosi recettori posti sulla membrana plasmatica (CD95, TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing receptor) e TNF-R) ma i meccanismi coinvolti sono del tutto sovrapponibili (Hinz, 2000). Si ha innanzitutto il reclutamento di proteine adattatrici che, insieme al recettore, formano il *death-inducing signal complex* (DISC) che attiva la procaspasi 8. Substrati della caspasi 8 attivata sono Bid e la procaspasi 3.

La forma attivata di Bid (tBid) induce l'omo-oligomerizzazione del promotore di morte Bax e la sua inserzione nella membrana mitocondriale esterna, con formazione di pori che permettono la fuoriuscita del citocromo C con ulteriore attivazione della caspasi 3 (Adrain, 2001; Hopkins-Donaldson, 2003). Quest'ultima rappresenta quindi il punto di incontro tra la via intrinseca e quella estrinseca di induzione di morte apoptotica.

1.5 CICLO CELLULARE

La mitosi, cioè la divisione delle cellule eucariotiche, è un complesso fenomeno che, al termine di una sequenza di eventi altamente organizzata (il ciclo cellulare), determina la scissione della cellula madre in due cellule figlie geneticamente identiche. Il ciclo, la cui durata varia a seconda del tipo cellulare, ma che è in media di 16 – 24 ore, viene diviso in quattro fasi che, in sequenza, sono denominate G₁, S, G₂ (che costituiscono l'interfase) ed M. Le fasi S ed M sono i periodi durante i quali avvengono rispettivamente la duplicazione del DNA e la mitosi; nella fase G₁ avviene la messa a punto dei meccanismi indispensabili per la corretta duplicazione del materiale genetico, mentre nella G₂ si approntano tutte le operazioni necessarie, nonché la sintesi delle molecole, che assicurano il successo della divisione cellulare. Lo stato di quiescenza, che può precedere il differenziamento e che si ha allorché la cellula esce dal ciclo replicativo, si indica come fase G₀ (Paoletti, 2004).

1.5.1 Cdk e cicline

Le Cdk (cyclin-dependent kinase) sono chinasi ciclina-dipendenti, cioè enzimi la cui attività è regolata dall'associazione con una serie di altre proteine (dette cicline) che sono sintetizzate in ordinata sequenza durante il ciclo.

Finora sono state individuate almeno 7 Cdk che presentano peso molecolare di 35 – 40 kDa ed omologia di sequenza superiore al 40%.

La famiglia delle cicline comprende un gruppo di proteine con omologia di sequenza del 16 – 33% ristretta ad un dominio centrale della molecola detto *cyclin box*, che risulta essenziale per associazione delle cicline con le Cdk e per la loro attivazione. La presenza delle cicline è però limitata a particolari fasi del ciclo cellulare, poiché tali proteine possiedono particolari

sequenze aminoacidiche, i cosiddetti *destruction box* o sequenze PEST (formate da prolina “P”, acido glutammico “E”, serina “S” e treonina “T”) che consentono la loro rapida degradazione principalmente attraverso la via dell’ubiquitina e dei proteasomi. Le cicline fino ad oggi individuate sono raggruppate in otto tipi, contrassegnate con lettere da A ad H; per la ciclina B e D sono poi state individuate rispettivamente 2 e 3 diverse isoforme.

All’inizio della fase G_1 , il primo complesso Cdk/ciclina che si forma, è quello tra cicline D e, a seconda del tipo cellulare, Cdk4 o Cdk6. Le cicline di tipo D sono assenti nelle cellule quiescenti ma vengono rapidamente sintetizzate all’inizio del ciclo cellulare e tale sintesi è stimolata dalla presenza di fattori di crescita nel mezzo.

Nella tarda fase G_1 compare la ciclina E che stimola l’attività della Cdk2; i livelli di ciclina E sono massimi durante la transizione G_1/S per poi declinare rapidamente durante la stessa fase S. L’attività della Cdk2 è critica anche per la replicazione del DNA ed in questa fase la sua attività è sostenuta dall’associazione con la ciclina A. Questa inizia ad essere sintetizzata nella tarda fase G_1 e la sua concentrazione aumenta progressivamente nella fase S fino a raggiungere un massimo all’inizio della mitosi (profase); essa viene poi degradata rapidamente nella metafase. Oltre alla Cdk2 la ciclina A può legare ed attivare la Cdk1, che inizia e porta a compimento la mitosi.

Si ritiene tuttavia che l’attivazione della Cdk1 avvenga fisiologicamente per associazione con le cicline B, la cui sintesi inizia nella tarda fase S e la cui rapida degradazione segue il completamento della mitosi (Paoletti, 2004).

1.5.2 Mitosi

La fase di mitosi può a sua volta suddividersi in 6 fasi distinte.

La prima o **profase** è il passaggio dal periodo G_2 al periodo M. La cromatina si condensa in cromosomi ben definiti, il cui numero esatto è caratteristico di ogni specie. Ogni cromosoma si è duplicato durante il periodo S ed è formato da due cromatidi figli uniti in un punto specifico da una regione detta centromero. Mentre i cromosomi si condensano il nucleolo inizia a disgregarsi e a scomparire. All’inizio della profase i numerosi microtubuli citoplasmatici del citoscheletro si disgregano costituendo una grossa riserva di molecole di tubulina. Queste saranno poi utilizzate per la costruzione del componente più importante dell’apparato mitotico, il fuso mitotico. Nella maggior parte delle cellule animali il centro per la formazione del fuso è indicato dai centrioli. La coppia originale di centrioli si duplica mediante un processo che inizia subito prima della fase S e dà origine a due coppie di centrioli. Ciascuna entra quindi a far parte di un centro mitotico che costituisce il centro di un’organizzazione a raggiera dei microtubuli, l’*aster* (= stella). A partire dalla tarda profase i fasci di microtubuli polari che interagiscono tra i

Introduzione

due aster si allungano e sembrano far allontanare l'uno dall'altro i due centri lungo la superficie esterna del nucleo.

La **prometafase** inizia improvvisamente con la disgregazione dell'involucro nucleare. Durante la mitosi i frammenti che si formano rimangono visibili attorno al fuso. Questo a sua volta può penetrare all'interno dello spazio nucleare. Strutture specializzate, dette cinetocori, si formano su entrambe le facce del centromero e si attaccano ad un gruppo di microtubuli detti microtubuli del cinetocore.

I cromosomi vanno incontro a movimenti dati da interazioni tra i loro cinetocori ed altri componenti del fuso, in seguito a questi movimenti i cromosomi assumono una disposizione tale che i loro centromeri si trovano tutti sullo stesso piano. Durante la **metafase** ciascun cromosoma è mantenuto in tensione a livello della piastra metafisica dalla sua coppia di cinetocori, le cui fibre si dirigono verso i poli opposti del fuso.

Spesso la metafase dura molto tempo mentre l'anafase dura solo pochi minuti. L'**anafase** inizia poi bruscamente quando i due cinetocori di ogni cromosoma si separano, per cui ogni cromatidio può essere trascinato verso un polo del fuso. Durante questi movimenti le fibre del cinetocore si accorciano man mano che i cromatidi si avvicinano ai poli; contemporaneamente le fibre del fuso si allungano e i due poli del fuso si allontanano reciprocamente.

La **telofase** ha inizio quando i cromatidi figli che si sono separati arrivano ai poli e le fibre del cinetocore scompaiono. Le fibre polari si allungano ulteriormente e si riforma un nuovo involucro nucleare attorno a ciascun gruppo di cromatidi figli. La cromatina condensata si espande, i nucleoli ricompaiono e la mitosi termina. Il citoplasma si divide con un processo (citodieresi) che di solito inizia alla fine dell'anafase o alla telofase (Alberts, 1989).

1.5.3 Microtubuli e fuso mitotico

I microtubuli sono formati da uno scheletro di dimeri di tubulina e da proteine accessorie ad essi legate. La tubulina è presente nelle cellule in 3 forme monometriche diverse (alfa, beta e gamma). I dimeri di tubulina sono formati dall'unione di un monomero alfa e di uno beta, e l'unione di più dimeri costituisce il microtubulo. Il monomero gamma è meno abbondante ed è soprattutto concentrato a livello del centromero. I microtubuli sono strutture molto dinamiche che si trovano in equilibrio con i dimeri di tubulina solubili nel citoplasma. Durante le normali funzioni cellulari si assiste ad un fenomeno di incorporazione di dimeri di tubulina ad una estremità del microtubulo e di rilascio all'estremità opposta. Questo evento può essere influenzato da molti fattori tra i quali la presenza di GTP, la forza ionica del citoplasma, e dalle proteine accessorie quali MAP2, MAP4, Mip-90, tau e STOP. Questo evento è utilizzato durante la divisione cellulare per favorire i movimenti dei cromosomi durante l'anafase. I microtubuli hanno però un ruolo importante anche nel trasporto intracellulare e nell'organizzazione del citocheletro (Paoletti, 2004).

Il fuso mitotico è formato da fibre costituite da microtubuli e da proteine ad essi associate. Queste fibre rientrano in due categorie definite in base al loro punto di attacco: le fibre polari, che in molti fusi sono le più numerose, collegano i due poli del fuso passando per l'equatore; e le fibre del centromero sono inserite sul centromero di ciascun cromatidio e si dirigono verso i poli del fuso. La funzione del fuso durante la mitosi dipende dall'equilibrio dinamico tra i suoi microtubuli e una riserva di tubulina solubile. Nelle cellule in divisione la formazione di raggruppamenti di microtubuli è organizzata da regioni specializzate chiamate centri mitotici che formano i poli del fuso, di solito collegati a centrioli (Alberts, 1989).

1.5.4 Farmaci che agiscono sui microtubuli

I farmaci che agiscono sulla tubulina comprendono una famiglia di composti che vengono utilizzati anche come erbicidi ed antiparassitari oltre che come antitumorali. Il primo farmaco di questa famiglia ad essere stato utilizzato come agente terapeutico sull'uomo è stato la colchicina, un alcaloide estratto dalla pianta *Colchicum autumnale*, che si è rivelato in passato molto utile nel trattamento della gotta. Oltre alla colchicina sono note altre due categorie di farmaci con funzioni analoghe: gli alcaloidi della vinca ed i tassani. Il meccanismo d'azione di questi farmaci si basa sulla capacità di legare la tubulina dei microtubuli ed impedirne le normali funzioni durante le fasi della divisione cellulare. Tra tutti i composti antitumorali, i farmaci che agiscono sulla tubulina sono unici nel loro meccanismo d'azione in quanto il loro bersaglio è l'apparato mitotico della cellula piuttosto che il DNA. Per quanto riguarda lo spettro d'azione questi composti costituiscono una classe di farmaci con un ampio spettro d'azione, sono infatti utili sia nel trattamento dei tumori solidi (in particolare del carcinoma mammario e di quello ovarico) che di quelli di origine ematologica (Paoletti, 2004).

Capitolo 2

SCOPO

Il ruolo dei prodotti naturali come “*fonte di rimedi*” era già stato riconosciuto nell’antichità (Farnsworth, 1985; Cragg, 1997). Nonostante i notevoli progressi in ambito scientifico e tecnologico nel campo della chimica combinatoriale, i composti ottenuti da prodotti naturali continuano tutt’oggi a dare un enorme contributo alla scoperta di nuovi farmaci. Infatti, molti principi attivi impiegati nella terapia antitumorale sono stati individuati mediante *screening* di derivati vegetali, animali, di organismi marini e di microrganismi (Farnsworth, 1990; Cragg e Newman, 1999). Mediante estrazione o idrodissillazione di piante medicinali si ottengono gli oli essenziali, utilizzati generalmente come correttivi dei caratteri organolettici di molte preparazioni, ma che possono essere impiegati anche come veri e propri farmaci per la loro attività antisettica e antiparassitaria, revulsiva, espettorante nonché per una modesta azione sedativa (Fassina e Ragazzi, 1995).

In letteratura è riportato che la composizione degli oli essenziali derivati dal genere *Pistacia* è caratterizzata principalmente da monoterpeni.

Numerosi studi condotti nei roditori hanno dimostrato che i monoterpeni hanno azione sia di tipo preventivo che chemioterapico verso diverse forme di tumore.

In particolare:

- il α -limonene ha azione preventiva verso i tumori della mammella, della pelle, del fegato, dei polmoni e dello stomaco;
- altri monoterpeni di origine alimentare, se somministrati nella dieta durante la fase iniziale dello sviluppo neoplastico, hanno azione preventiva verso i tumori della mammella, dei polmoni e dello stomaco;
- il peryllil alcol e il α -limonene hanno attività chemioterapica contro i tumori mammari e pancreatici (Crowell, 1999).

Da sottolineare inoltre come questi monoterpeni di origine alimentare siano caratterizzati, oltre che da una considerevole attività antitumorale, anche da un’ottima biodisponibilità orale e soprattutto da una bassa tossicità (Crowell, 1996).

Scopo

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare i meccanismi molecolari coinvolti nell'attività antiproliferativa di un olio essenziale ottenuto da ramoscelli e foglie di *Pistacia lentiscus* proveniente dal Portogallo.

La caratterizzazione chimica precedentemente condotta (Costantin, 2001) aveva permesso di isolare 23 componenti principali, riportati in tabella 3 secondo tempo di ritenzione (t_R), e di identificare quindi i composti presenti in maggiore quantità:

- (-)-bornyl acetato (29.06%);
- limonene (17.69%);
- α -pinene (12.39);
- myrcene (7.96%);
- *p*-cymene (7.26%).

t_R	COMPOSTO	% del totale
8.86	tricyclene	0.31
9.34	α -pinene	12.39
9.93	camphene	2.08
11.03	sabinene	0.71
11.13	β -pinene	3.76
11.83	myrcene	7.96
13.31	<i>p</i> -cymene	7.26
13.50	limonene	17.69
18.98	camphor	0.27
19.94	borneol	6.79
20.51	4-terpineol	2.74
21.18	α -terpineol	0.69
25.53	(-)-bornyl acetate	29.06
25.90	2-undecanone	0.45
31.24	trans- α -caryophyllene	1.65
32.65	4,7,10-cycloundecatriene	0.30
32.95	alloaromadendrene	0.29
33.61	naphthalene, 1,2,4,4a,5,6,8a-oct	0.45
34.57	α -muurolene	0.39
35.11	α -amorphene	1.21
35.48	naphthalene, 1,2,3,4-tetraidro-1	0.53
37.82	caryophyllene oxide	2.10
39.99	α -cadinol	0.95

Tabella 3: Composizione chimica dell'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* (foglie e ramoscelli) proveniente dal Portogallo.

Dal punto di vista biologico, l'olio essenziale si era dimostrato in grado di indurre un significativo effetto citotossico su cellule di adenocarcinoma mammario umano (MCF-7), attivando inoltre i meccanismi di morte cellulare programmata (Costantin, 2001).

Il lavoro di questi tre anni di dottorato ha quindi avuto lo scopo di:

1. estendere la valutazione dell'effetto antiproliferativo ad altre linee cellulari tumorali di derivazione umana: una linea di adenocarcinoma del colon (cellule LoVo) ed una linea di adenocarcinoma dell'ovaio (cellule 2008), compresa la sua variante *cis*-platino resistente (cellule C13*), considerando tempi d'esposizione diversi;
2. approfondire il suo effetto antiproliferativo considerando da un lato una linea non tumorale (fibroblasti umani) allo scopo di evidenziare differenze di sensibilità, dall'altro valutando sulle 3 linee cellulari tumorali già studiate un diverso marker di proliferazione quale l'espressione citoplasmatica delle protein chinasi fosforilate (p-ERK);
3. studiare l'influenza del trattamento sulla morfologia cellulare;
4. studiare l'influenza dell'olio sui meccanismi di morte cellulare programmata e valutare la variazione del potenziale della membrana mitocondriale;
5. studiare l'influenza del trattamento sulla permeabilità della membrana cellulare;
6. valutare la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno dopo trattamento;
7. indagare l'influenza del co-trattamento con un antiossidante, quale la N-acetilcisteina, sulla produzione di ROS, sull'attivazione del processo apoptotico e sull'effetto antiproliferativo;
8. valutare la variazione della concentrazione cellulare di ATPin seguito ad esposizione all'olio;
9. valutare l'eventuale attivazione della caspasi 3 e caspasi 8;
10. valutare l'influenza del co-trattamento dell'olio con *cis*-platino sulla linea di adenocarcinoma resistente (C13*);
11. studiare l'influenza del trattamento sulla progressione del ciclo cellulare;
12. approfondire i meccanismi di blocco della progressione del ciclo cellulare valutando la variazione della concentrazione di ciclina B1 e di tubulina acetilata;
13. studiare l'influenza dell'olio sui meccanismi mitotici.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 SOLUZIONI

PBS Tampone Fosfato:	NaCl	139.9 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.5 mM
	KH ₂ PO ₄	8.1 mM
Reagente A:	Na ₂ CO ₃	2%
	NaOH	0.1 N
Reagente B:	NaK tartrato	1%
	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.5%
Reagente C:	Reagente A : Reagente B 50:1	
Lysis buffer:	Tris-HCl pH 7.4	25 mM
	NaCl	150 mM
	Igepal	1%
	Sodio desossicolato	1%
	EDTA pH 8	1 mM
	H ₂ O	q. b.
Loading buffer 2X:	Blu di bromofenolo	0.004%
	SDS	4%
	Glicerolo	20%
	2-Mercaptoetanol	10%
	Tris-HCl pH 6.8	0.125M
Running buffer 1X:	Tris	25 mM
	Glicina	250 mM
	SDS	0.1%
	H ₂ O	q. b.
Transfer buffer 1X:	Tris	25 mM
	Glicina	192 mM
	H ₂ O	q. b.
TBS-T buffer 10X:	Tris	100 mM
	NaCl	1.5 M
	TWEEN	1%
	H ₂ O	q. b.

Materiali e Metodi

Running gel:	H ₂ O	q. b.
	Acilammide	10%
	Tris 1M pH 8.8	40%
	SDS	0.5%
	Temed	0.1%
	APS	1%
Stacking gel:	H ₂ O	q.b.
	Acilammide	4.5%
	Tris 1M pH 6.8	25%
	SDS	1%
	Temed	0.1%
	APS	1%

3.2 LINEE CELLULARI

Sono state utilizzate tre diverse linee cellulari tumorali:

Cellule LoVo - Linea ottenuta da Drewinco et al. (1976) da un linfonodo metastatico di adenocarcinoma del colon umano, fornita dal Dott. G. Toffoli del Centro di Riferimento Oncologico (C.R.O.) di Aviano.

Cellule 2008 - Linea ottenuta da Andrews et al., (1985) da adenocarcinoma dell'ovaio umano.

Cellule C13* - Variante della linea cellulare precedente, circa 10 volte più resistente al *cis*-platino, ottenuta per lunga esposizione a basse concentrazioni dell'antitumorale. È caratterizzata da una minore permeabilità di membrana ai processi di diffusione passiva (Marverti e Andrews, 1996) e da un'alterata funzionalità della membrana mitocondriale (Andrews e Albright, 1992).

Entrambe le linee cellulari sono state gentilmente fornite dal Prof. G. Marverti del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena.

Cellule HFFF2 - Linea di fibroblasti umani ricavata dal prepuzio di un feto di 14-18 settimane ottenuta dalla banca cellule ICLC di Genova.

3.3 TERRENI DI COLTURA

Cellule LoVo - Coltivate in terreno Ham's F12 (Seromed-Biochrom KG, Berlin) arricchito con 10% di siero fetale di vitello (Seromed-Biochrom KG, Berlin) inattivato a 56 °C per 30 minuti e 1% di soluzione penicillina/streptomina (10.000 U/10.000 µg/ml) (Seromed-Biochrom KG, Berlin).

Cellule 2008 e C13* - Coltivate in terreno RPMI 1640 (Seromed-Biochrom KG, Berlin) arricchito con 10% di siero fetale di vitello (Seromed-Biochrom KG, Berlin) inattivato a 56 °C per

30 minuti e 1% di soluzione penicillina/streptomicina (10.000 U/10.000 µg/ml) (Seromed-Biochrom KG, Berlin).

Cellule HFFF2 - Coltivate in terreno DMEM (Seromed-Biochrom KG, Berlino) arricchito con 20% di siero fetale di vitello (Seromed-Biochrom KG, Berlino) inattivato a 56 °C per 30 minuti e 1% di soluzione penicillina/streptomicina (10.000 U/10.000 µg/ml) (Seromed-Biochrom KG, Berlino).

3.4 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

La soluzione madre, preparata immediatamente prima di ogni prova, presentava questa composizione:

- 9% di olio essenziale (76.3 mg/ml)
- 1% di DMSO
- 90% di terreno di coltura

Le diluizioni scalari sono state eseguite con terreno di coltura completo.

3.5 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO

Le varie linee cellulari sono state staccate dal substrato di crescita mediante 0.25% di tripsina (Seromed-Biochrom KG, Berlino), neutralizzate con siero fetale di vitello, centrifugate per 10 minuti a 400 x g e seminate in piastre da 96 pozzetti (Falcon Plymouth, England) alla densità di 4×10^4 cellule/ml. Si sono poi seguiti protocolli diversi a seconda della linea cellulare.

Per le 3 linee di adenocarcinoma dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule LoVo, 2008 e C13* sono state esposte all'olio essenziale secondo due protocolli diversi:

1. trattate per 3 ore con concentrazioni comprese tra 120 e 200 µg/ml per tutte e tre le linee; le cellule sono state quindi lavate ed incubate con terreno completo per 21 ore;
2. trattate per 24 ore con concentrazioni comprese tra 40 e 100 µg/ml per le cellule LoVo, tra 30 e 70 µg/ml per le cellule 2008 e tra 100 e 160 µg/ml per le C13*.

L'effetto antiproliferativo è stato valutato mediante MTT test.

Le cellule HFFF2, dopo 7 giorni di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, sono state trattate con concentrazioni comprese tra 100 e 200 µg/ml di olio essenziale per 3 ore seguite da 21 ore di coltura in medium normale, oppure con concentrazioni comprese tra 10 e 100 µg/ml per 24, 48 e 72 ore di trattamento.

L'effetto antiproliferativo è stato valutato mediante MTT test.

3.5.1 Effetto antiproliferativo in presenza di N-acetilcisteina

Le tre linee tumorali sono state staccate dal substrato di crescita mediante 0.25% di tripsina (Seromed-Biochrom KG, Berlino), neutralizzate con siero fetale di vitello, centrifugate per 10 minuti a 400 x g e seminate in piastre da 96 pozzetti (Falcon Plymouth, England) alla densità di 4×10^4 cellule/ml.

Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 1 ora con N-acetilcisteina (NAC, Sigma-Aldrich, St. Louis USA) alla concentrazione di 10 mM, a cui sono seguite 3 ore di co-trattamento con l'olio a concentrazioni comprese tra 120 e 200 µg/ml; le cellule sono state quindi lavate ed incubate per 21 ore in terreno completo addizionato di NAC. L'effetto antiproliferativo è stato valutato mediante MTT test.

3.5.2 Effetto antiproliferativo in co-trattamento con *cis*-platino

Le cellule C13* sono state staccate dal substrato di crescita mediante 0.25% di tripsina (Seromed-Biochrom KG, Berlino), neutralizzate con siero fetale di vitello, centrifugate per 10 minuti a 400 x g e seminate in piastre da 96 pozzetti (Falcon Plymouth, England) alla densità di 4×10^4 cellule/ml.

Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 3 ore con l'olio a concentrazioni comprese tra 100 e 180 µg/ml in co-trattamento con *cis*-platino (Teva Pharma B. V., Holland) a concentrazioni comprese tra 10⁻⁷ e 10⁻⁴ M; le cellule sono state quindi lavate ed incubate per 21 ore in terreno completo addizionato di *cis*-platino alle medesime concentrazioni. L'effetto antiproliferativo è stato valutato mediante MTT test.

3.5.3 MTT TEST

Quale indice di tossicità è stato scelto l'MTT test (Mossmann, 1983), saggio che si basa sulla riduzione di sali di tetrazolio a sali di formazano da parte di un enzima respiratorio mitocondriale, la succinato-tetrazolio reduttasi; questa riduzione avverrà quindi solo nelle cellule vive.

Ad ogni pozzetto contenente le cellule vengono aggiunti 20 µl di una soluzione (5 mg/ml in tampone fosfato) di MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-1)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Dopo 4 ore di incubazione ciascun pozzetto è trattato con 150 µl di DMSO per solubilizzare i sali di formazano, l'assorbanza viene quindi valutata mediante un lettore ELISA (Ttertek Multiskan) a 570 nm, utilizzando DMSO come bianco; come lunghezza d'onda di riferimento è stata assunta quella di 630 nm alla quale si rilevano i sali che non hanno reagito e sono ancora allo stato ossidato od eventuali prodotti del metabolismo.

3.6 MORFOLOGIA

I microscopi ottici trovano numerose applicazioni che sfruttano fonti luminose diverse e metodi differenti di formazione dell'immagine. L'applicazione più comune è la *microscopia in campo chiaro*, in cui un raggio di luce attraversa direttamente il campione e lo sfondo appare chiaro. Altre applicazioni sono la *microscopia in campo oscuro*, *in contrasto di fase*, *in luce polarizzata*, e *in fluorescenza*.

Le cellule sono state centrifugate per 10 minuti a 400 x g, seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 120 e 160 µg/ml indipendentemente dalla linea considerata, lavate ed incubate con terreno completo. Dopo 21 ore, le cellule sono state lavate tre volte con PBS, fissate con *p*-formaldeide al 4% a temperatura ambiente per 15 minuti, ulteriormente lavate e infine mantenute in PBS. L'analisi della morfologia cellulare è stata effettuata al microscopio ottico a fondo chiaro (Leica DMI 4000 B con ingrandimento 40X).

3.7 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

L'indagine è stata eseguita secondo la metodica di van Engeland et al. (1996).

Le tre linee cellulari tumorali sono state staccate dal substrato di crescita mediante 0.25% di tripsina (Seromed-Biochrom KG, Berlino), neutralizzate con siero fetale di vitello, centrifugate per 10 minuti a 400 x g e seminate in fiasche da 25 cm² (Falcon Plymouth, England) alla densità di 1×10^5 cellule/ml, incubate per 24 ore e quindi trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 120 e 160 µg/ml, successivamente lavate ed incubate con terreno completo per 21 ore. Sono state quindi staccate dal substrato di crescita, lavate due volte con PBS e risospese in tampone HEPES con 2.5 µl di annexina V (Invitrogen Molecular Probes, Oregon USA) e 3.5 µl di ioduro di propidio (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Dopo un'incubazione di 15 minuti al buio sono stati aggiunti 400 µl di tampone Hepes ed è stata eseguita l'analisi al citofluorimetro (Epics XL, Beckmann Coulter).

3.7.1 Meccanismi di morte cellulare in presenza di N-acetilcisteina

L'indagine è stata eseguita secondo la metodica di van Engeland et al (1996).

Le tre linee cellulari tumorali sono state staccate dal substrato di crescita come precedentemente descritto, seminate in fiasche da 25 cm², incubate per 24 ore, pre-trattate per 1 ora con NAC (10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis USA), co-trattate per 3 ore con NAC e l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 80 e 160 µg/ml, lavate ed incubate con terreno completo in presenza di NAC per 21 ore. Sono state quindi staccate dal substrato di crescita, lavate due volte con PBS e risospese in tampone Hepes con 2.5 µl di annexina V (Invitrogen

Materiali e Metodi

Molecular Probes, Oregon, USA) e 3.5 µl di ioduro di propidio (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Dopo un'incubazione di 15 minuti al buio sono stati aggiunti 400 µl di tampone HEPES ed è stata eseguita l'analisi al citofluorimetro (Epics XL, Beckmann Coulter).

3.11 PERMEABILITA' DI MEMBRANA CELLULARE

Le cellule tumorali sono state centrifugate per 10 minuti a 400 x g, seminate ad una densità di 1×10^5 cellule/ml su vetrini posti in piastre da 12 pozzetti (Falcon Plymouth, England). Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 120 e 160 µg/ml, lavate ed incubate in terreno completo. Dopo 21 ore, le cellule sono state lavate tre volte con PBS, fissate con *p*-formaldeide al 4% a temperatura ambiente per 15 minuti, ulteriormente lavate con PBS ed infine con acqua bi-distillata. I vetrini con le cellule sono quindi fissati ad un vetrino porta-oggetti mediante Mowiol che contiene il fluoroforo ioduro di propidio. La fluorescenza viene rilevata al microscopio confocale (Nikon Eclipse-1 risoluzione 40X).

3.9 VARIAZIONE DEL POTENZIALE DELLA MEMBRANA MITOCONDRIALE

Le cellule delle tre linee tumorali utilizzate (LoVo, 2008 e C13*) sono state centrifugate per 10 minuti a 400 x g e seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 80 e 160 µg/ml, successivamente lavate ed incubate con medium normale per 3, 6 e 21 ore. Le cellule sono state quindi staccate, centrifugate, lavate e trattate con Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) alla concentrazione finale di 10 µM. Dopo 15 minuti di incubazione al buio a temperatura ambiente, è stata effettuata l'analisi mediante citofluorimetro a flusso (Epics XL-BC).

La Rodamina 123 è una sonda cationica lipofila la cui incorporazione dipende principalmente dal potenziale di membrana; poiché il potenziale interno del mitocondrio è 2/3 volte più elevato di quello della membrana plasmatica, il suo accumulo è principalmente mitocondriale.

3.10 PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS

Le cellule delle tre linee tumorali utilizzate, centrifugate e seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml, sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 80 e 160 $\mu\text{g/ml}$. Sono state quindi lavate ed incubate in terreno completo per 3, 6 e 21 ore a 37°C in presenza del 5% di CO_2 .

Per ciascun protocollo, durante gli ultimi 30 minuti di incubazione, viene aggiunta la sonda diclorofluorescina diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Sigma-Aldrich, St. Louis USA) sciolta in DMSO alla concentrazione finale di 10 μM . Questa sonda, nella forma acetilata, entra liberamente nelle cellule ove viene deacetilata ad opera di esterasi citoplasmatiche diventando impermeabile alla membrana plasmatica. In presenza di sostanze ossidanti, quali i ROS ed in particolare il perossido di idrogeno, la diclorofluorescina dà un prodotto fluorescente rilevabile nel verde.

Dopo i diversi tempi di incubazione (3, 6 e 21 ore), le cellule sono state staccate, centrifugate e risospese in una soluzione di PBS con 2% di siero e 0.02% di NaN_3 (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). I campioni, tenuti in ghiaccio, sono stati immediatamente analizzati al citofluorimetro a flusso (Epics XL-BC).

3.10.1 Produzione intracellulare di ROS in presenza di N-acetilcisteina

Le cellule delle tre linee tumorali, centrifugate e seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml, sono state pre-trattate per 1 ora NAC (10 mM, Sigma-Aldrich, St. Louis USA), a cui sono seguite 3 ore di co-trattamento con l'olio a concentrazioni comprese tra 80 e 160 $\mu\text{g/ml}$ e da ulteriori 21 ore di incubazione in terreno completo in presenza di NAC (Nie, 2009).

Durante gli ultimi 30 minuti di incubazione alle cellule è stata aggiunta la sonda diclorofluorescina diacetato ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$, Sigma-Aldrich, St. Louis USA) sciolta in DMSO alla concentrazione finale di 10 μM . Dopo il tempo di incubazione previsto, le cellule sono state staccate, centrifugate e risospese in una soluzione di PBS con 2% di siero e 0.02% di NaN_3 (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). I campioni, tenuti in ghiaccio, sono stati immediatamente analizzati al citofluorimetro a flusso (Epics XL-BC).

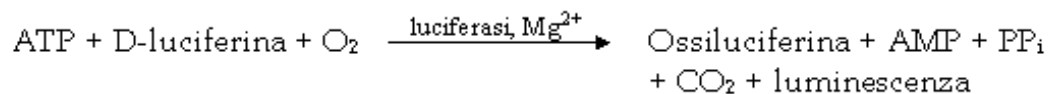
3.11 VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE DI ATP

Le cellule LoVo, 2008 e C13* sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon Plymouth, England) alla densità di 1×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in presenza del 5% di CO_2 , sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 80 e 160 $\mu\text{g/ml}$, lavate ed incubate con medium normale per 21 ore.

Le concentrazioni intracellulari di ATP sono state valutate utilizzando un kit in luminescenza: ATPlite (Perkin Elmer, USA) contenente: *Mammalian cell lysis solution*, che

Materiali e Metodi

inattiva le ATPasi endogene, *Substrate solution*, che contiene luciferasi e D-luciferina e abbassa il pH ad un livello tale da rendere possibile la seguente reazione:



Le cellule sono state quindi lavate 2 volte con PBS, in ogni pozzetto è stato aggiunto 1 ml di PBS e sono state "scrapate", centrifugate e risospese in 300 µl di PBS. Ad ogni campione sono stati aggiunti 150 µl di *Mammalian cell lysis solution*. Successivamente 150 µl di ciascuna soluzione cellulare sono stati trasferiti, in doppio, in piastre bianche da 96 pozzetti (Perkin Elmer, USA) e aggiunti 50 µl di *Substrate solution*. Dopo 5 minuti di agitazione e 10 di incubazione al buio ed a temperatura ambiente, la luminescenza è stata rilevata mediante un lettore di piastre (Victor²-Wallac). Come standard è stata utilizzata una soluzione di ATP (contenuta nel kit) a concentrazioni comprese tra 10 nM e 1 mM.

3.11.1 Quantificazione delle proteine mediante kit BCA

Parte della soluzione cellulare è stata utilizzata per la quantificazione mediante il kit QuantiPro BCA (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), costituito da tre reagenti da riunire in proporzione 25:25:1. Questi reagenti sono:

- Buffer QA, contenente: Na₂CO₃, Na tartrato, NaHCO₃ in NaOH 0.2 M, pH 11.25;
- BCA QB, contenente: acido bicinconinico 4%, pH 8.5;
- Reagent QC, contenente: CuSO₄· 5H₂O 4%.

In una piastra da 96 pozzetti (Falcon Plymouth, England) sono stati posti (in doppio) 51 µl della soluzione cellulare contenente *Mammalian cell lysis solution* ed addizionati di ugual volume del mix dei tre reagenti. Dopo 2 ore di incubazione al buio a 37 °C la piastra è stata letta mediante un lettore ELISA (Ttertek Multiskan) a 570 nm.

Per la retta di taratura è stata utilizzata albumina bovina (fornita con il kit) a concentrazioni comprese tra 0.125 e 1 mg/ml.

3.12 ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 3 E DELLA CASPASI 8

Le tre linee tumorali sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 5 x 10⁴ cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C le cellule sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 80 e 160 µg/ml ed incubate per 21 ore in terreno completo. Dopo l'incubazione in medium normale le cellule sono state staccate mediante tripsina e centrifugate. Una parte della soluzione cellulare è stata utilizzata per la quantificazione mediante conta con tripan blue in cameretta di bürker ed una parte è stata trasferita (50 µl in doppio) in piastre bianche da 96 pozzetti (Perkin Elmer, USA).

L'attivazione della caspasi 3 è stata valutata utilizzando il kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, USA) contenente un substrato per le caspasi 3/7 (Z-DEVD-aminoluciferina), un tampone e la luciferasi. Il reagente è stato aggiunto a ciascun pozzetto in volume uguale alla soluzione cellulare. Le piastre sono state messe agitazione per 60 secondi e quindi incubate per 1 ora a temperatura ambiente al riparo dalla luce. La luminescenza è stata rilevata mediante un lettore di piastre (Victor²-Wallac).

La caspasi 3 attiva taglia il substrato Z-DEVD-aminoluciferina liberando aminoluciferina che, in presenza di luciferasi, genera un segnale luminescente direttamente proporzionale alla quantità di caspasi presente.

L'attivazione della caspasi 8 è stata valutata utilizzando il kit Caspase-Glo 8 Assay (Promega, USA) contenente un substrato per la caspasi 8 (Z-LETD-aminoluciferina), un tampone e la luciferasi. Il reagente, addizionato di un inibitore di proteasi (MG-132), fornito con il kit, alla concentrazione finale di 60 µM per ridurre il background, è stato aggiunto a ciascun pozzetto in volume uguale alla soluzione cellulare. Le piastre sono state messe agitazione per 60 secondi e quindi incubate per 1 ora a temperatura ambiente al riparo dalla luce. La luminescenza è stata rilevata mediante un lettore di piastre (Victor²-Wallac).

La caspasi 8 attiva taglia il substrato Z-LETD-aminoluciferina liberando aminoluciferina che, in presenza di luciferasi, genera un segnale luminescente direttamente proporzionale alla quantità di caspasi presente.

3.13 ESPRESSIONE CITOPLOSMATICA DI PROTEINE DELLA PROLIFERAZIONE

Le tre linee cellulari utilizzate (LoVo, 2008 e C13*) sono state centrifugate e seminate in fiaschette da 25 cm² (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale utilizzando concentrazioni comprese tra 80 e 160 µg/ml e mantenute quindi in medium normale per ulteriori 21 ore.

3.13.1 Preparazione dei lisati

Al termine dei trattamenti le fiaschette sono state lavate 3 volte con PBS a temperatura ambiente, poste in ghiaccio ed addizionate di 100 µl di *Lysis buffer* a cui sono stati estemporaneamente aggiunti inibitori delle proteasi (Protease inhibitor cocktail, Roche Diagnostics, Germany). Dopo 1 minuto le cellule sono state staccate dal substrato di crescita e centrifugate a 4 °C per 15 minuti a 14000 x g. I lisati ottenuti sono stati conservati a -80 °C. L'espressione delle proteine è stata valutata mediante il saggio di Western blotting.

3.13.2 Quantificazione delle proteine mediante Lowry modificato

A 30 µl di ciascun lisato è stata aggiunta H₂O bidistillata fino ad ottenere un volume di 2 ml. Le soluzioni sono state addizionate di 25 µl di DOC 10% in NaOH 0.01% e, dopo agitazione al vortex, incubate per 10 minuti a 25 °C, addizionate di 1 ml di acido tricloroacetico (ATCA) al 24% e quindi centrifugate a 16000 x g per 15 minuti a 4 °C. Ad ogni campione, risospeso in una soluzione contenente 300 µl di SDS 10% e 200 µl di H₂O, sono stati aggiunti 3 ml di Reagente C e 250 µl di Folin-Ciocalteu 50% (Merck, Germany). Dopo agitazione, le soluzioni sono state poste a 25 °C per 30 minuti e quindi analizzate allo spettrofotometro (Beckman Coulter DU 800) alla λ di 750 nm.

Per la retta di taratura è stata utilizzata albumina bovina (Bio Labs, New England USA) a concentrazioni comprese tra 5 e 60 µg/ml.

3.13.3 Western blotting

I lisati sono stati addizionati con loading buffer 2X nel rapporto 1:1 e bolliti a 95 °C per 5 minuti. Sono stati quindi caricati su gel di acrilamide al 10% dello spessore 1 mm, in modo da caricare 30 µg di proteine per ciascun campione. L'ampereaggio della corsa elettroforetica è stato mantenuto a 10 mA finché i campioni sono rimasti nello stacking gel, ed aumentato fino a 30 mA quando le proteine sono entrate nel running gel.

Terminata la corsa elettroforetica, dopo circa 2 ore, le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di PVDF (Amersham Biosciences, GE Healthcare UK) mantenendo per 1 ora e 45 minuti un amperaggio di 250 mA. La membrana è stata quindi immersa in una soluzione di latte al 10% in TBS-T 1X per 30 minuti per saturare tutti i siti aspecifici. Dopo alcuni lavaggi con TBS-T 1X è stato aggiunto l'anticorpo monoclonale anti p-ERK da mouse (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluito 1:1000 in latte al 2% ed i campioni sono stati lasciati ad incubare in agitazione a 4 °C *overnight*. Dopo almeno 3 lavaggi in TBS-T 1X la membrana è stata immersa in una soluzione di anticorpo secondario anti mouse IgG (Dako, Denmark), diluito 1:10000 in TBS-T 1X, coniugato alla perossidasi di rafano e lasciata ad incubare per 1 ora in agitazione. Dopo ulteriori lavaggi la membrana è stata sviluppata utilizzando un kit, ECL PLUS (Amersham Biosciences, GE Healthcare, UK), contenente luminolo ed acqua ossigenata che, in presenza di perossidasi di rafano, generano una fluorescenza che può impressionare una lastra fotografica (Amersham Biosciences, GE Healthcare, UK). Per normalizzare i risultati ottenuti è stata valutata anche l'espressione delle ERK totali. In questo caso la membrana è stata marcata con anticorpo primario anti ERK1/2 da rabbit (Santa Cruz Biotechnology, USA,) diluito 1:1000 in latte al 2% e quindi anticorpo secondario anti rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Danvers USA), diluito 1:2000 in TBS-T 1X coniugato alla perossidasi di rafano.

La membrana è stata anche marcata con un anticorpo primario monoclonale anti ciclina B1 da rabbit (Cell Signaling Technology, Danvers USA), diluito 1:1000 in latte al 5% e con un anticorpo primario anti tubulina acetilata da mouse (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) diluito 1:2000 in latte al 2% ed incubata in agitazione a 4 °C overnight. Dopo 3 lavaggi in TBS-T 1X la membrana è stata immersa in una soluzione di anticorpo secondario, rispettivamente anti rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Danvers USA), diluito 1:2000 in TBS-T 1X e anti mouse IgG (Dako, Denmark) diluito 1:10000 in TBS-T 1X, entrambi coniugati alla perossidasi di rafano, e lasciata ad incubare per 1 ora in agitazione.

Per normalizzare i risultati ottenuti è stata valutata, sempre mediante Western blotting, anche l'espressione della β actina. In questo caso la membrana è stata marcata con anticorpo primario monoclonale anti β actina da rabbit (Cell Signaling Technology, Danvers USA,) diluito 1:1000 in latte al 5% e quindi anticorpo secondario anti rabbit IgG (Cell Signaling Technology, Danvers USA), diluito 1:2000 in TBS-T 1X coniugato alla perossidasi di rafano. I dati sono stati quindi analizzati mediante il programma ImageJ (versione 1.42q, NIH USA).

3.14 PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE

Le cellule tumorali sono state centrifugate per 10 minuti a 400 x g, seminate in piastre da 6 pozzetti (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le tre linee cellulari tumorali sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a concentrazioni comprese tra 100 e 140 μ g/ml, successivamente lavate ed incubate in terreno completo per 21 ore. Le cellule sono state centrifugate, permeabilizzate con etanolo 70% e trattate con RNAasi (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) alla concentrazione finale di 30 μ g/ml.

La valutazione della progressione del ciclo cellulare è stata eseguita mediante esposizione allo ioduro di propidio (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Dopo 20 minuti di incubazione al buio ed a temperatura ambiente la quantità di ioduro di propidio incorporato dalle singole cellule è stata valutata mediante citometro a flusso (Epics XL-BC). Poiché lo ioduro di propidio intercala il DNA legandosi in modo stechiometrico, il contenuto del fluoroforo nelle cellule è direttamente proporzionale al contenuto in DNA, pertanto è possibile stabilire, in base all'intensità di fluorescenza, in che fase del ciclo vitale si trovino le cellule esaminate.

3.15 MECCANISMI MITOTICI

Le cellule LoVo, 2008 e C13* sono state seminate su vetrini posti in piastre da 24 pozzetti (Falcon Plymouth, England) ad una densità di 1×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 3 ore con l'olio essenziale a

Materiali e Metodi

concentrazioni comprese tra 60 e 140 µg/ml, quindi lavate ed incubate con terreno completo per 21 ore. Quali sostanze di riferimento sono stati utilizzati Taxolo e Vincristina (Teva Pharma B. V., Holland) alle concentrazioni di 0.01 e 0.02 µg/ml; in questo caso le cellule sono state esposte per 24 ore al trattamento. Le cellule sono state lavate con PBS, fissate con metanolo freddo per 15 minuti e quindi lavate per 3 volte con PBS. Ogni pozzetto è stato trattato per 5 minuti con una soluzione di Triton (0.1% in PBS) per permeabilizzare le cellule e quindi per 20 minuti con una soluzione di PBS contenente il 7% di siero per togliere l'aspecificità dell'anticorpo. I vetrini sono stati lavati ed esposti all'anticorpo primario anti tubulina acetilata da mouse (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) diluito 1:400 in PBS contenente il 7% di siero. Dopo 1 ora di incubazione a 37 °C e 3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati trattati con anticorpo secondario anti mouse IgG *green* (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) diluito 1:1000 in PBS con il 7% di siero. Dopo 1 ora di incubazione, è stata aggiunta una soluzione di RNAsi (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) alla concentrazione finale di 100 µg/ml. Dopo 5 minuti i vetrini sono stati lavati con PBS e con acqua bidistillata, per eliminare tutti i sali, quindi fissati a vetrini porta-oggetto mediante Mowiol contenente ioduro di propidio (1 µg/ml), fluoroforo intercalante che permette di evidenziare i nuclei. La fluorescenza è stata rilevata al microscopio confocale (Nikon Eclipse-1 risoluzione 60X).

3.16 ASPETTI STRUMENTALI

Citometria di flusso - Nell'analisi citofluorimetrica la sospensione cellulare monodispersa viene convogliata da un sistema fluidico di trasporto fino al punto di misura. Qui incontra un fascio luminoso focalizzato di alcune decine di micron, tramite l'ausilio di una lente proveniente da una sorgente di eccitazione. Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare vengono generati segnali dall'incontro di ogni singola cellula. Questi segnali sono legati alle caratteristiche fisiche della particella (diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità interna, rugosità di membrana), e alla presenza di molecole fluorescenti localizzate in diversi siti. Una volta emessi, i segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori che ne misurano l'intensità. Questi segnali elettrici (analogici), provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, associati tra loro, sono inviati a un analizzatore/elaboratore di dati che provvede alla loro presentazione e definizione statistica (Valtriani e Hurle, 1997).

Microscopio confocale - Il microscopio confocale è formato da diversi elementi: un microscopio ottico tradizionale con obiettivo invertito, caratteristica che agevola l'intervento sul campione che si sta osservando; un modulo di scansione che permette la scansione del fascio luminoso sul campione; un modulo di eccitazione composto da tre linee laser di diversa lunghezza d'onda (blu: 488 nm, verde: 543 nm, rosso: 633 nm) che vengono utilizzate per

eccitare le molecole fluorescenti. Tale microscopio permette di effettuare il cosiddetto "sezionamento ottico" cioè di ricavare in successione immagini dei piani del campione (piani xy, così come xz o yz). Il campione viene illuminato con un fascio di luce laser focalizzato su di un punto molto piccolo, la cui emissione di luce è vista da un sistema di collettori che analizzano solo il segnale emesso da questo punto. La caratteristica del confocale è proprio quella di visualizzare ogni singolo strato eliminando le componenti di luce emessa al di sopra e al di sotto del piano focale in analisi. E' possibile variare il piano focale muovendosi lungo l'asse ottico e quindi ricostruire dall'unione di tutte le sezioni la struttura tridimensionale del campione.

3.17 ANALISI STATISTICA

Tutti gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplo ed i risultati sono stati valutati statisticamente mediante il test "t" di Student (Tallarida e Murray, 1987). La IC₅₀ è stata calcolata mediante il software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad software, Inc., San Diego CA).

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO

Il primo obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto antiproliferativo dell'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* sulle linee di adenocarcinoma del colon, LoVo ed adenocarcinoma ovarico 2008 e C13*.

Cellule LoVo - Sono state utilizzate concentrazioni di olio comprese in un *range* di 40 - 200 µg/ml, per esposizioni di 3 o di 24 ore. Nel protocollo che prevedeva 3 ore di trattamento, la valutazione dell'effetto antiproliferativo mediante MTT test è stata eseguita dopo ulteriori 21 ore di coltura in medium normale, al fine di permettere il pieno manifestarsi del danno indotto.

I risultati ottenuti indicano innanzitutto che l'effetto antiproliferativo è significativamente influenzato dal protocollo d'esposizione considerato. Per esposizioni di 3 ore si ottiene una significativa riduzione della crescita cellulare (33%) con 140 µg/ml di olio (Figura 1); mentre per 24 ore di esposizione analogo risultato si ottiene con 40 µg/ml (Figura 2 a), cioè con una dose circa 3.5 volte inferiore. In generale, prolungando il tempo di esposizione si ottiene una marcata riduzione della IC₅₀, che risulta pari a 151.0 µg/ml (146.7 - 158.8 µg/ml) per 3 ore di esposizione e di 45.0 µg/ml (41.0 - 50.1 µg/ml) per 24 ore.

Cellule 2008 - Sono state utilizzate concentrazioni di olio comprese in un *range* di 30 - 200 µg/ml per esposizioni di 3 o di 24 ore. Nel protocollo che prevedeva 3 ore di trattamento, la valutazione dell'effetto antiproliferativo mediante MTT test, è stata eseguita dopo 21 ore di coltura in medium normale, al fine di permettere il pieno manifestarsi del danno indotto.

Anche su questa linea cellulare il tempo di esposizione gioca un ruolo fondamentale. Infatti, se per ottenere una riduzione significativa della crescita cellulare (40%) per 3 ore di esposizione sono necessari almeno 160 µg/ml di olio (Figura 1), dopo 24 ore di trattamento sono sufficienti circa 45 µg/ml (Figura 2 b), cioè una dose circa 4 volte inferiore.

Anche in questo caso prolungando il tempo di esposizione si ottiene una marcata riduzione della IC₅₀, che risulta pari a 166.0 µg/ml (162.2 - 170.4 µg/ml) per 3 ore di esposizione e di 51.4 µg/ml (42.0 - 62.8 µg/ml) per 24 ore.

Cellule C13* - Sono state utilizzate concentrazioni di olio comprese in un *range* di 120 - 200 µg/ml per esposizione di 3 o di 24 ore. Nel protocollo che prevedeva 3 ore di trattamento, la

Risultati

valutazione dell'effetto antiproliferativo mediante MTT test, è stata eseguita dopo 21 ore di coltura in medium normale, al fine di permettere il pieno manifestarsi del danno indotto.

A differenza di quanto ottenuto con LoVo e 2008, la crescita delle cellule C13* non risulta significativamente influenzata dal tempo di esposizione all'olio. Infatti, se per ottenere una riduzione significativa della crescita cellulare (36%) per 3 ore di esposizione sono necessari almeno 140 µg/ml di olio (Figura 1), per ottenere analogo risultato dopo 24 ore di trattamento sono necessari 120 µg/ml (Figura 2 c). Ovviamente anche le due IC₅₀ calcolate per i due tempi di esposizione non differiscono in maniera sostanziale: 158.4 µg/ml (150.5 - 166.6 µg/ml) e 133.2 µg/ml (128.2 - 138.5 µg/ml) rispettivamente per 3 e 24 ore di trattamento.

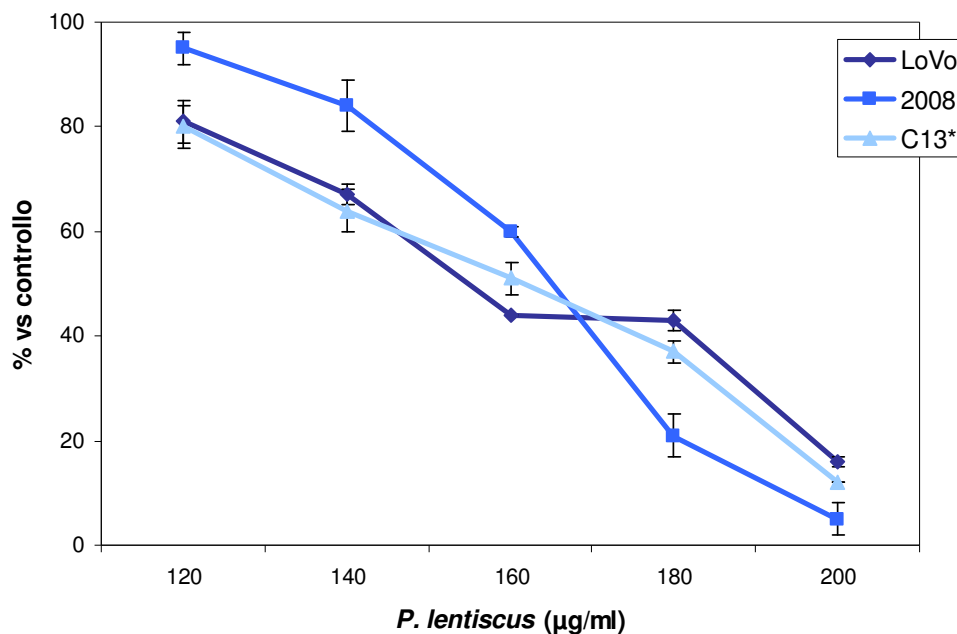


Figura 1: Variazione % rispetto al controllo della riduzione di sali di tetrazolio (MTT) in seguito a 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale nelle 3 linee tumorali.

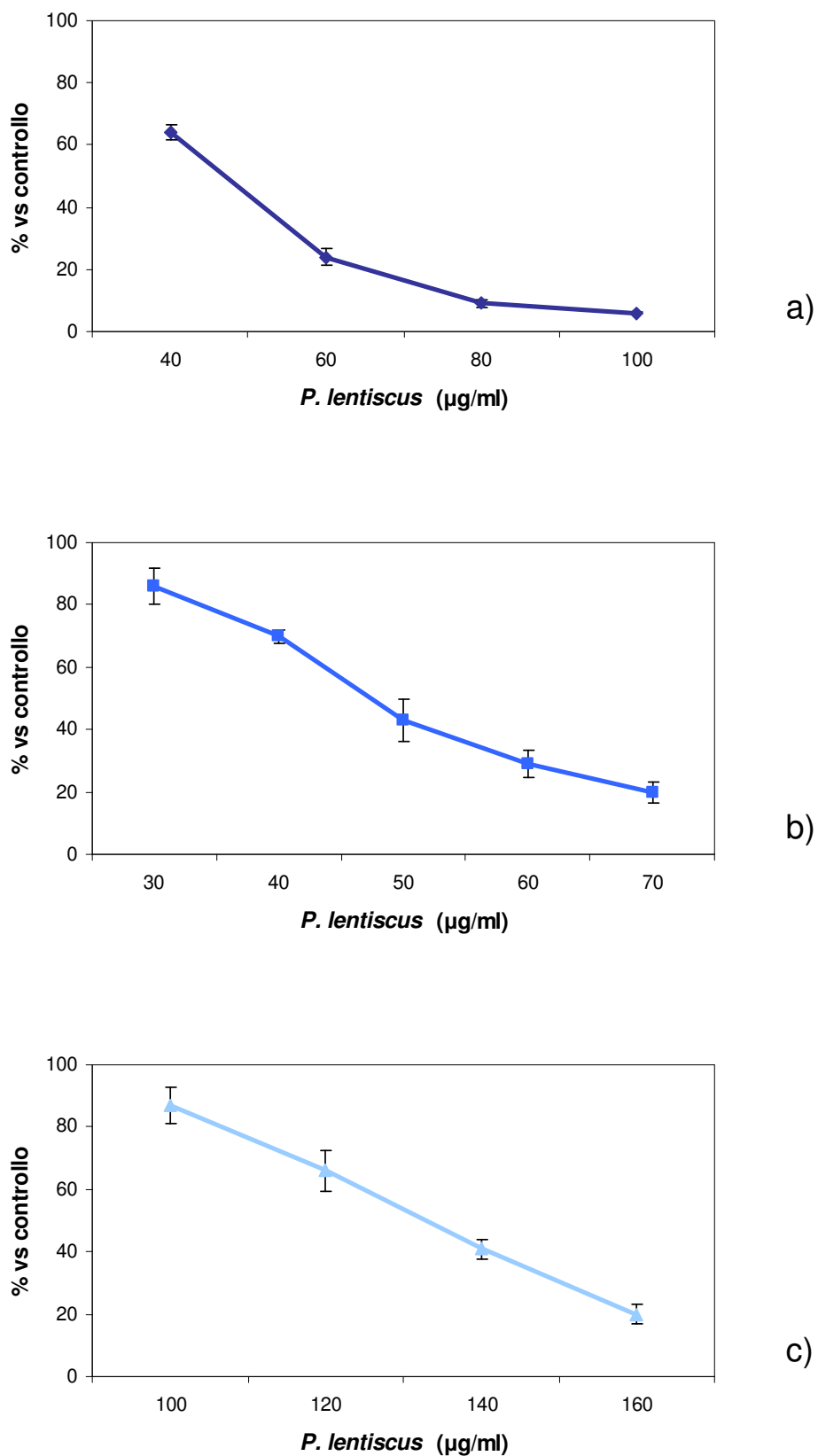


Figura 2: Variazione % rispetto al controllo della riduzione di sali di tetrazolio (MTT) in seguito a 24 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* in cellule LoVo **a)**, 2008 **b)** e C13* **c)**.

Risultati

4.2 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO SU FIBROBLASTI UMANI

L'attività antiproliferativa dell'olio di *Pistacia lentiscus* è stata valutata anche su una linea non tumorale di fibroblasti umani (cellule HFFF2), in modo da evidenziare differenze di sensibilità tra cellule normali e cellule tumorali.

I risultati indicano che, per ottenere una riduzione dose dipendente della crescita delle cellule HFFF2, sono necessarie almeno 72 ore di esposizione all'olio di *Pistacia lentiscus* (Figura 3 e 4), in queste condizioni si ottiene un'IC₅₀ pari a 77.4 µg/ml (50.5 - 100.5 µg/ml).

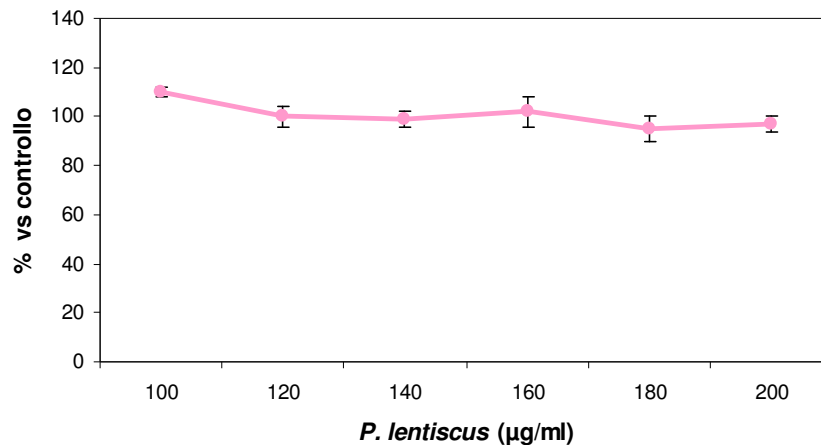


Figura 3: Variazione % rispetto al controllo della riduzione di sali di tetrazolio (MTT) in seguito a 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale in fibroblasti umani, cellule HFFF2.

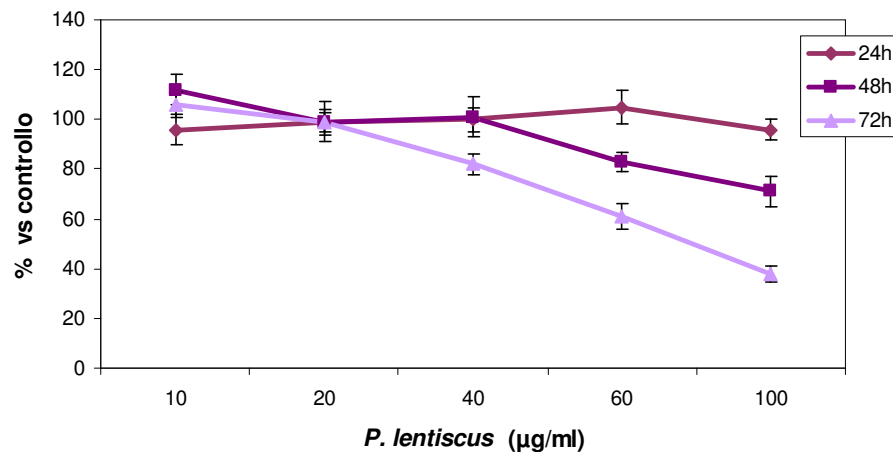


Figura 4: Variazione % rispetto al controllo della riduzione di sali di tetrazolio (MTT) in seguito a 24, 48 e 72 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* in fibroblasti umani, cellule HFFF2.

4.3 ESPRESSIONE CITOPLOSMATICA DELLE ERK FOSFORILATE

L'effetto antiproliferativo dell'olio di *Pistacia lentiscus* è stato valutato studiando anche un altro *marker* quale l'espressione citoplasmatica delle p-ERK, valutata dopo 3 ore di trattamento seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

ERK1 ed ERK2 (Extracellular-signal Regulated Kinases) sono enzimi ad attività fosforilativa appartenenti alla famiglia delle MAP Chinasi (Mitogen-Activated Protein Kinases). Mentre la forma defosforilata è costitutivamente presente anche nella cellula a riposo, la forma fosforilata (p-ERK), cioè la forma attiva dell'enzima, si trova a livelli apprezzabili solamente nelle cellule in attiva proliferazione (Paoletti, 2004).

Cellule LoVo - Come riportato in figura 5 e 6, l'olio è in grado di ridurre in modo dose dipendente la concentrazione citoplasmatica di p-ERK. In particolare, questo effetto risulta statisticamente significativo alle dosi di 140 e 160 µg/ml, le quali inducono una riduzione dell'espressione delle proteine fosforilate dell'ordine del 50%.

Cellule 2008 - I risultati riportati in figura 5 e 6 indicano che l'olio è in grado di ridurre in modo dose dipendente la concentrazione citoplasmatica di p-ERK. In particolare, questo effetto risulta statisticamente significativo alle dosi di 140 e 160 µg/ml, le quali inducono una riduzione dell'espressione delle proteine fosforilate dell'ordine del 40-50%.

Cellule C13* - I risultati indicano una riduzione della concentrazione citoplasmatica di p-ERK dose dipendente che, in questo caso, inizia ad essere statisticamente significativa già alla dose di 100 µg/ml, con una riduzione dell'espressione delle proteine fosforilate dell'ordine del 40%. Con la dose maggiore utilizzata, questa riduzione è di circa il 70% (Figura 5 e 6).

Risultati

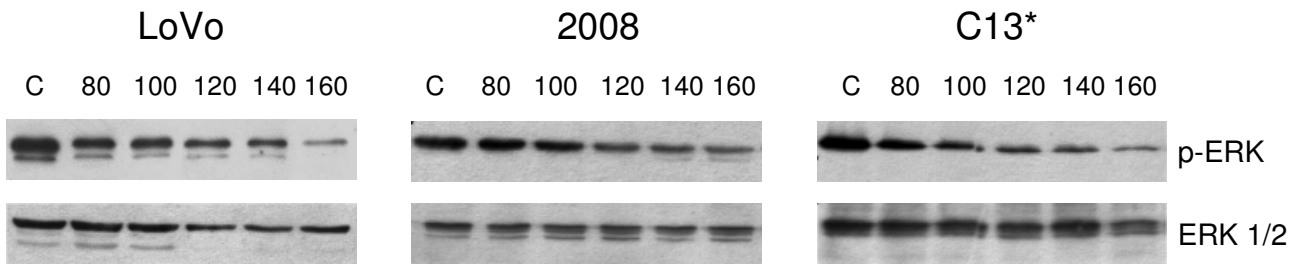


Figura 5: Western blotting della variazione rispetto al controllo della concentrazione citoplasmatica di p-ERK in cellule LoVo, 2008 e C13* dopo 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus*, seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

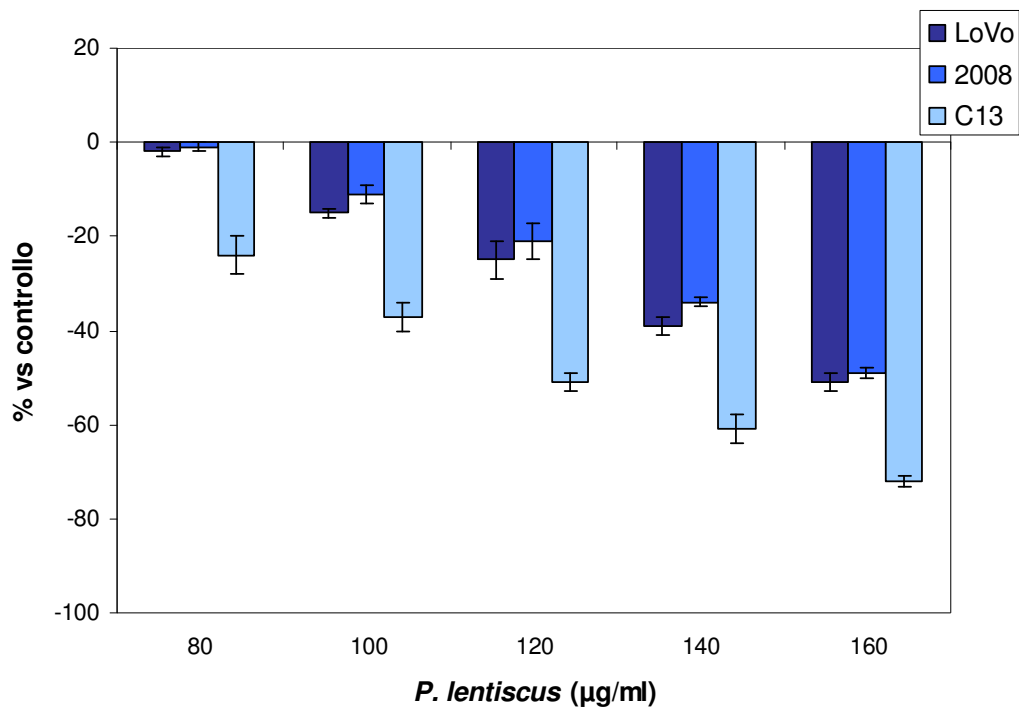


Figura 6: Variazione % rispetto al controllo dei livelli di p-ERK in cellule LoVo, 2008 e C13* trattate per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale.

4.4 MORFOLOGIA

Le modificazioni morfologiche a carico delle cellule in seguito a trattamento con l'olio essenziale sono state analizzate mediante microscopio ottico a sfondo chiaro con ingrandimento 40X dopo 3 ore di esposizione all'olio e 21 ore di incubazione in medium normale, utilizzando concentrazioni comprese tra 120 – 160 $\mu\text{g/ml}$ per tutte e tre le linee studiate.

Cellule LoVo - Come evidenziato in figura 7, il trattamento provoca una evidente e dose dipendente alterazione della normale morfologia di queste cellule, che risultano più rotondeggianti, rispetto al controllo non trattato e mostrano una netta diminuzione della "luminosità", indice di ridotta vitalità.

Cellule 2008 - L'alterazione della normale morfologia indotta dal trattamento risulta in questa linea cellulare ancor più evidente di quanto ottenuto con le LoVo. Infatti particolarmente rotondeggianti e poco "luminescenti" risultano già le cellule esposte alla dose di 140 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7).

Cellule C13* - Evidente danno morfologico dose dipendente è mostrato in figura 7, ove le cellule risultano decisamente più rotondeggianti, rispetto al controllo non trattato e mostrano una netta diminuzione della "luminosità", indice di ridotta vitalità.

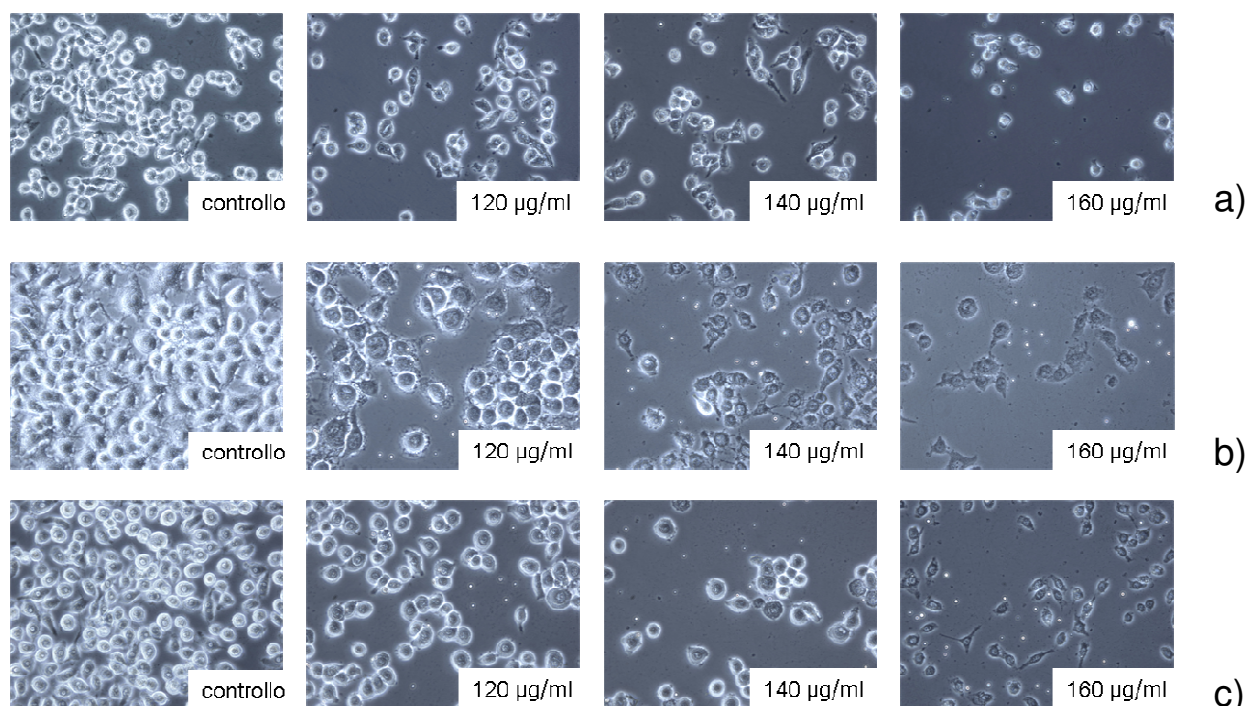


Figura 7: Valutazione rispetto al controllo dell'alterazione della morfologia cellulare in cellule LoVo a), 2008 b) e C13* c) trattate per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus*.

4.5 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

Il processo di apoptosi è caratterizzato da determinati eventi morfologici, tra i quali la rottura della membrana plasmatica, la condensazione del citoplasma e del nucleo e la frammentazione del DNA. Mediante analisi citofluorimetrica è stato possibile valutare lo stadio iniziale del processo apoptotico, sfruttando la caratteristica delle cellule in apoptosi di esporre il fosfolipide fosfatidilserina (PS) sul lato esterno della membrana plasmatica cellulare. Per rilevare la presenza di questo componente fosfolipidico, viene utilizzata una proteina di legame Ca^{2+} -dipendente, l'annexina V, che presenta un'elevata affinità per PS. Nella citofluorimetria questa proprietà dell'annexina V viene sfruttata assieme a quella dello ioduro di propidio, fluoroforo che si lega al DNA cellulare solamente nel caso in cui la cellula presenti una rottura parziale o totale della membrana.

Con questa tecnica è possibile, rilevando la fluorescenza emessa dalle due sostanze, distinguere le cellule vive (negative ad entrambe i reattivi), da quelle in fase apoptotica precoce (positive all'annexina V e negative allo ioduro di propidio) e da quelle in apoptosi avanzata (positive ad entrambe le sostanze) (Vermes, 1995). Per determinare la percentuale di cellule in fase apoptotica precoce o tardiva viene utilizzato come sistema di riferimento una popolazione cellulare di controllo non trattata. Sottraendo la percentuale di cellule apoptotiche nel campione di riferimento da quella nei campioni trattati, si ottiene la percentuale definitiva di cellule in apoptosi precoce ed in apoptosi tardiva.

Cellule LoVo - I risultati ottenuti con il solo olio indicano la sua capacità di indurre, in modo dose dipendente, l'attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata e, per tutte le dosi saggiate, i meccanismi coinvolti sono essenzialmente quelli riconducibili ad apoptosi tardiva (67% per la dose di 160 $\mu\text{g/ml}$).

Il co-trattamento con un antiossidante quale la N-acetilcisteina riduce significativamente la percentuale di cellule in fase apoptotica, soprattutto quella tardiva (Figura 8 a). In particolare, per dosi fino a 140 $\mu\text{g/ml}$, il co-trattamento con NAC riporta i valori di apoptosi tardiva indotta dall'olio a livelli del tutto sovrapponibili a quelli del controllo. Questo effetto rimane statisticamente significativo anche per la dose maggiore saggiata (160 $\mu\text{g/ml}$) ove in presenza dell'antiossidante le cellule in apoptosi tardiva risultano un terzo rispetto a quelle trattate con il solo olio.

Cellule 2008 - Anche nella linea ovarica l'olio di *P. lentiscus* è risultato in grado di indurre, in modo dose dipendente, l'attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata, con meccanismi che, indipendentemente dalla dose utilizzata, sono sostanzialmente riconducibili a quelli dell'apoptosi tardiva.

Anche in questo caso il co-trattamento con NAC riduce la percentuale di cellule in apoptosi riportandola ai livelli ottenuti nel controllo alle dosi più basse di olio, mentre riduce in modo

significativo, di ben 5 volte, la % di cellule in fase di apoptosi tardiva ottenuta con 160 µg/ml di olio (33% vs 6%; Figura 8 b).

Cellule C13* - Anche in questo caso i risultati ottenuti indicano che l'olio in esame è in grado di indurre, in modo dose dipendente, l'attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata, essenzialmente riconducibili ad apoptosi tardiva.

Analogamente a quanto osservato sulle altre due linee, il co-trattamento con NAC contrasta ancora una volta l'attivazione di questi meccanismi. Questo effetto risulta particolarmente evidente con la dose maggiore di olio (160 µg/ml; Figura 8 c), alla quale si ha una riduzione dell'apoptosi tardiva di circa 6 volte (42% vs 7%)

Risultati

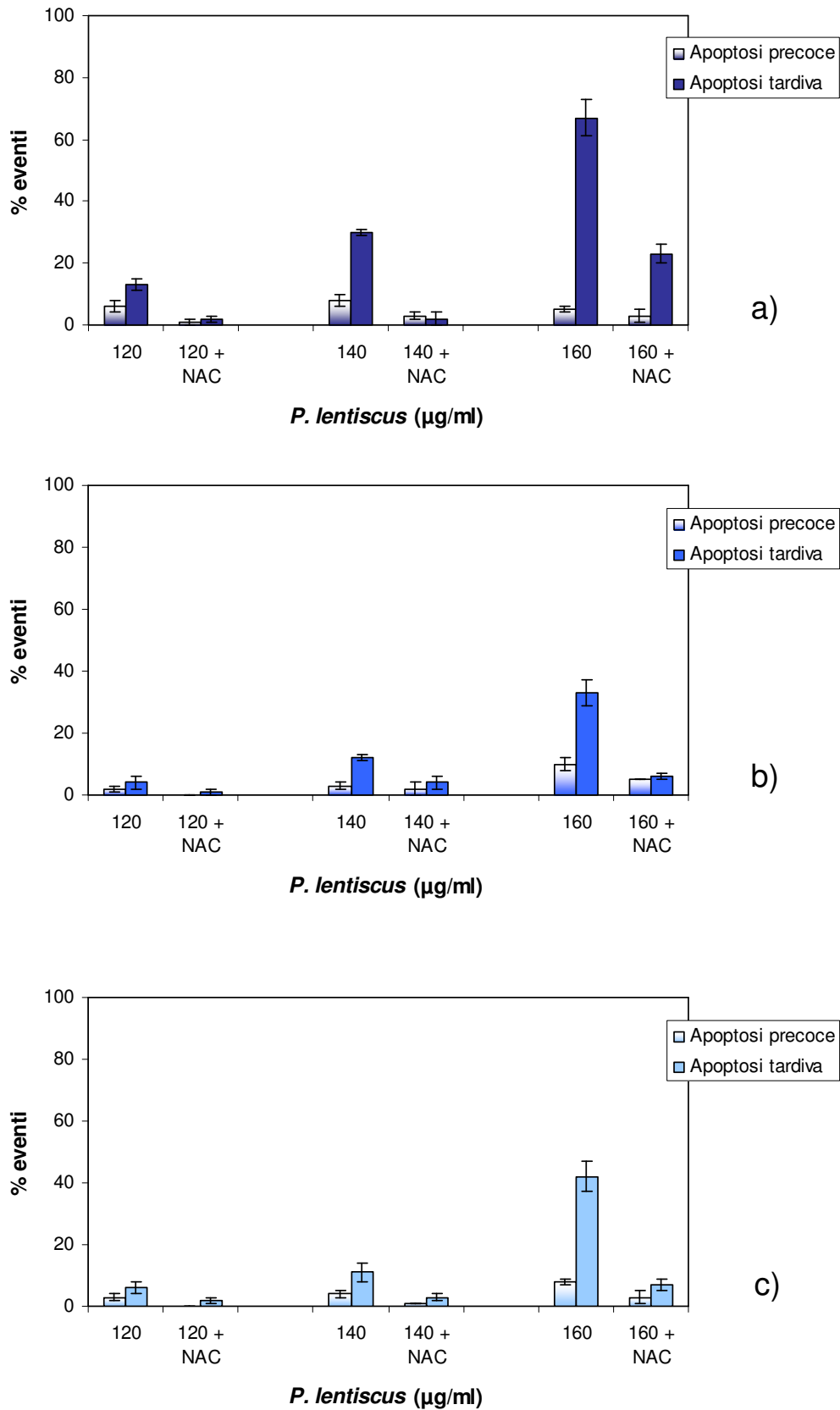


Figura 8: Variazione % rispetto al controllo dell'induzione di apoptosi precoce e tardiva dopo 3 ore di trattamento con olio di *P. lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale ed in seguito a co-trattamento con NAC 10 mM in cellule LoVo a), 2008 b) e C13* c).

4.6 PERMEABILITÀ DI MEMBRANA CELLULARE

Per chiarire i risultati ottenuti in precedenza che evidenziavano come l'olio inducesse preferenzialmente fenomeni di apoptosi tardiva, è stata eseguita un'analisi al microscopio confocale (ingrandimento 40X) per evidenziare eventuali variazioni della permeabilità della membrana plasmatica. L'indagine è stata eseguita dopo un trattamento di 3 ore nelle tre linee cellulari seguite da 21 ore di coltura in medium normale.

Cellule LoVo - Come evidenziato in figura 9 a), l'intensità della fluorescenza, dovuta all'aumento dell'incorporazione del fluoroforo ioduro di propidio, è proporzionale alla dose utilizzata, indice di un aumento della permeabilità di membrana.

Cellule 2008 - Anche per la linea ovarica l'incorporazione del fluoroforo aumenta significativamente in maniera dose dipendente, indicando come l'olio sia in grado di alterare la permeabilità della membrana cellulare (Figura 9 b).

Cellule C13* - La figura 9 c) evidenzia come, anche in questa linea cellulare, vi sia un aumento della fluorescenza data dall'aumentata incorporazione dello ioduro di propidio. L'aumento risulta proporzionale alla dose utilizzata.

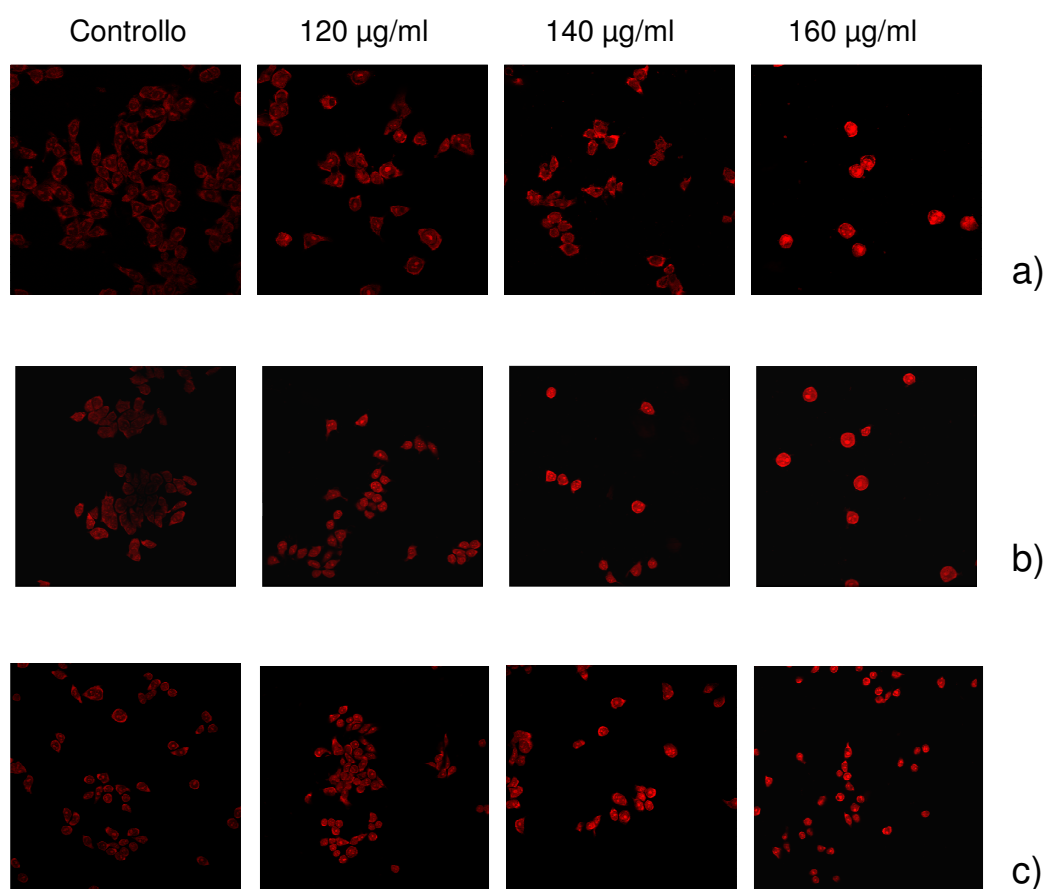


Figura 9: Valutazione rispetto al controllo dell'alterazione della permeabilità di membrana cellulare in cellule LoVo **a)**, 2008 **b)** e C13* **c)** trattate per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus*.

4.7 VARIAZIONE DEL POTENZIALE DELLA MEMBRANA MITOCONDRIALE

Il potenziale della membrana mitocondriale è stato valutato mediante l'utilizzo di Rodamina 123 (Rh123), sonda cationica lipofila che risulta selettiva per il potenziale mitocondriale, poiché questo è dalle 2 alle 3 volte più elevato rispetto a quello plasmatico. La Rodamina quindi è in grado di evidenziarne un'eventuale variazione.

La capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di influenzare il potenziale della membrana mitocondriale è stata studiata considerando 3 diversi protocolli che prevedevano 3 ore di esposizione seguite da 3, 6 e 21 ore di incubazione in medium normale.

Cellule LoVo - Come riportato in figura 10 a), dopo 3 e soprattutto dopo 6 ore dal termine del trattamento si ottiene un leggero aumento dell'intensità di fluorescenza, indice di un blando incremento del potenziale di membrana. Dopo 21 ore, si ottiene invece una notevole diminuzione dell'intensità di fluorescenza indice di una riduzione del potenziale della membrana mitocondriale. Questa riduzione non è strettamente dose dipendente, poiché risulta pari al 40% con la dose di 80 µg/ml e raggiunge il 60% raddoppiando la concentrazione (Figura 10 a).

Cellule 2008 - Come riportato in figura 10 b), dopo 3 ore dal termine del trattamento non si ottiene un'apprezzabile variazione dell'intensità di fluorescenza rispetto al controllo; per contro, dopo 6 ore di coltura in medium normale si osserva un aumento di fluorescenza che risulta rispettivamente del 30 e del 69% alle dosi di 140 e 160 µg/ml, indice quindi di un significativo aumento del potenziale della membrana mitocondriale. Dopo 21 ore, si ottiene una diminuzione dell'intensità di fluorescenza dose dipendente, diminuzione che risulta del 20% con 80 µg/ml e raggiunge il 75% alla dose di 160 µg/ml, indicando quindi una significativa riduzione del potenziale di membrana.

Cellule C13* - L'intensità di fluorescenza rilevata dopo 3 ore di trattamento seguite da 3 ore di coltura in medium normale, aumenta significativamente alla concentrazione maggiore di 160 µg/ml (Figura 10 c) con un incremento del 40% rispetto al controllo. Se al trattamento seguono 6 ore di incubazione, un apprezzabile aumento di fluorescenza (34%) si ottiene già alla concentrazione di 140 µg/ml per arrivare a circa il 50% per la dose di 160 µg/ml.

Dopo 21 ore, l'intensità di fluorescenza diminuisce in modo proporzionale alla dose, riduzione dell'ordine del 20% con 80 - 100 µg/ml e del 70 - 85% con 140 e 160 µg/ml rispettivamente.

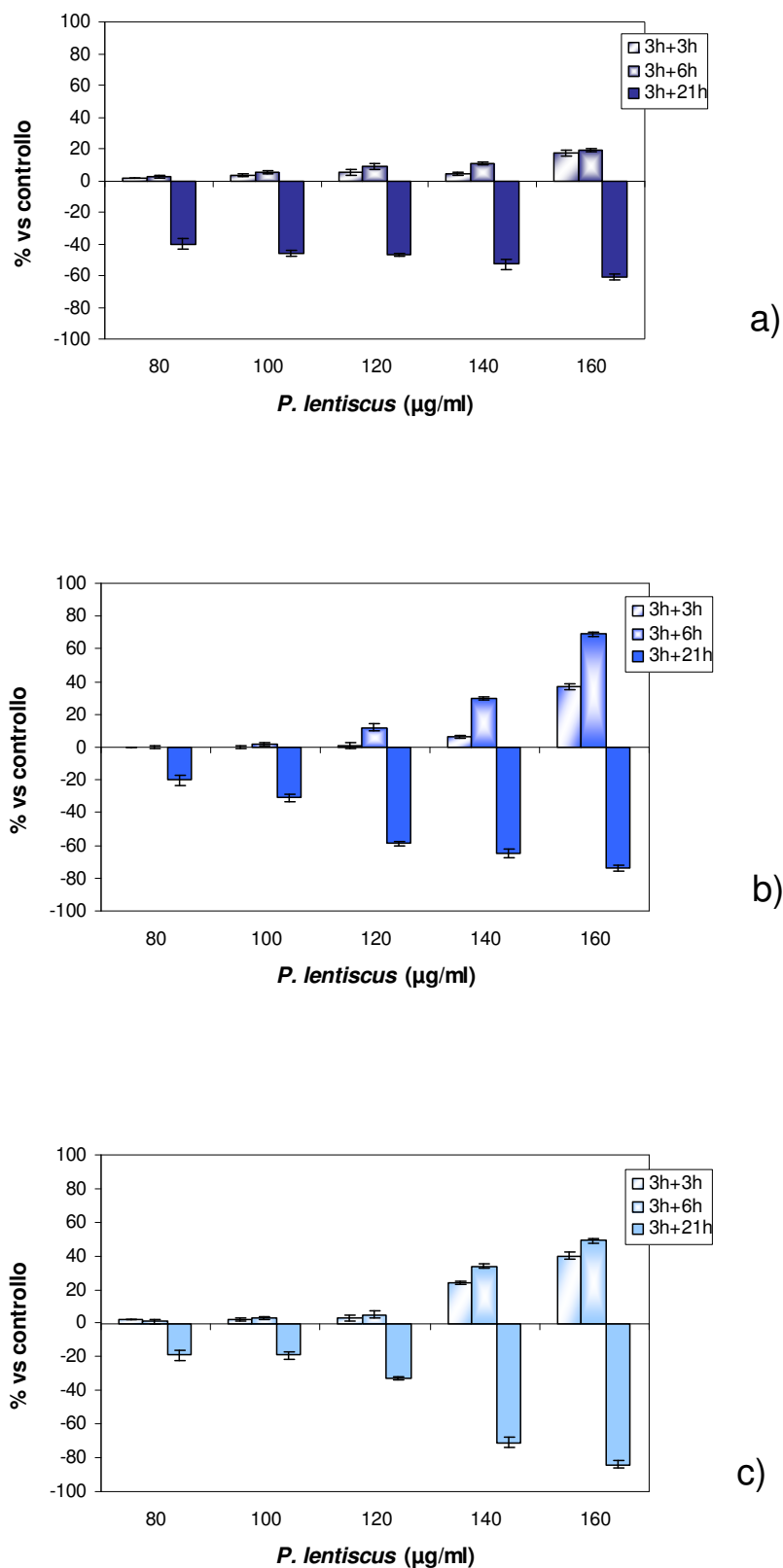


Figura 10: Variazione % dell'intensità di fluorescenza di Rh123 rispetto al controllo in seguito a trattamento per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus* e 3, 6 e 21 ore di coltura in medium normale in cellule LoVo **a)**, 2008 **b)** e C13* **c)**.

4.8 PRODUZIONE INTRACELLULARE DI ROS

La produzione cellulare di ROS è stata valutata utilizzando la sonda 2,7-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), sonda che diffonde liberamente attraverso la membrana plasmatica e viene idrolizzata dalle esterasi presenti nel citoplasma in diclorofluorescina (DCFH) non fluorescente ed impermeabile alla membrana. In presenza di specie reattive dell'ossigeno e soprattutto del radicale idrossile e del perossido di idrogeno, la DCFH viene rapidamente ossidata a diclorofluoresceina (DCF), composto altamente fluorescente (Nie, 2009). L'intensità di fluorescenza risulterà direttamente proporzionale ai livelli intracellulari di ROS.

La capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di indurre produzione di ROS è stata studiata sulle tre linee cellulari tumorali considerando diversi protocolli di esposizione che prevedevano 3 ore di trattamento seguite da 3, 6 e 21 ore di incubazione in medium normale.

È stata inoltre valutata l'influenza sulla produzione di ROS della co-esposizione delle cellule ad un antiossidante (NAC 10 mM). In questo caso è stato utilizzato solo il protocollo che prevedeva 3 ore di esposizione all'olio e successive 21 ore di incubazione in medium normale.

Cellule LoVo - Come riportato in figura 11 a) dopo 3 e 6 ore dal trattamento con l'olio si ottiene un incremento della fluorescenza, indice di produzione di ROS, compreso tra il 10 ed il 37%, evidenziando un effetto sovrapponibile per i due tempi e per le varie concentrazioni adottate. Un significativo aumento dell'intensità di fluorescenza, dell'ordine del 70 - 80% rispettivamente per 140 e 160 µg/ml di olio si ottiene invece dopo 21 ore dal termine del trattamento.

Il co-trattamento con NAC riduce significativamente la produzione di ROS già alla concentrazione più bassa dell'olio e raggiunge l'80% per esposizione alla dose maggiore (160 µg/ml) (Figura 11 a).

Cellule 2008 - Per tutti e tre i protocolli adottati il trattamento con l'olio determina un aumento dose dipendente dell'intensità di fluorescenza, indice di aumentata produzione di ROS (Figura 11 b). In particolare, dopo 3 ore dal termine dell'esposizione si ottiene solo un lieve incremento della fluorescenza che raggiunge il 13% per la dose più alta; allungando il tempo di incubazione in medium normale l'intensità di fluorescenza aumenta progressivamente in relazione alla dose. In particolare, dopo 21 ore dal termine dell'esposizione l'aumento di fluorescenza risulta del 24 e del 56%, rispettivamente per 140 e 160 µg/ml di olio.

La presenza dell'antiossidante determina riduzione della produzione di ROS e quindi diminuzione della fluorescenza. Questo effetto risulta particolarmente evidente (Figura 11 b) alle dosi di 140 e 160 µg/ml ove l'intensità di fluorescenza risulta ridotta rispettivamente dell'87 e del 93% rispetto a quella ottenuta con il solo olio.

Cellule C13* - I risultati riportati in figura 11 c) indicano che l'olio di *P. lentiscus* è in grado di indurre una significativa produzione di ROS dose dipendente per tutti i protocolli adottati. Già dopo 3 ore dall'esposizione alla dose maggiore (160 µg/ml) si ottiene un aumento dell'intensità

di fluorescenza del 60%, aumento che raggiunge l'84% dopo 21 ore dal termine dell'esposizione.

Anche in questa linea cellulare il NAC provoca una drastica riduzione della produzione delle specie radicaliche dell'ossigeno (Figura 11 c). Infatti, l'incremento dell'84% di intensità di fluorescenza indotta dalla dose maggiore di olio viene ridotta di oltre 10 volte (7%) in presenza dell'antiossidante.

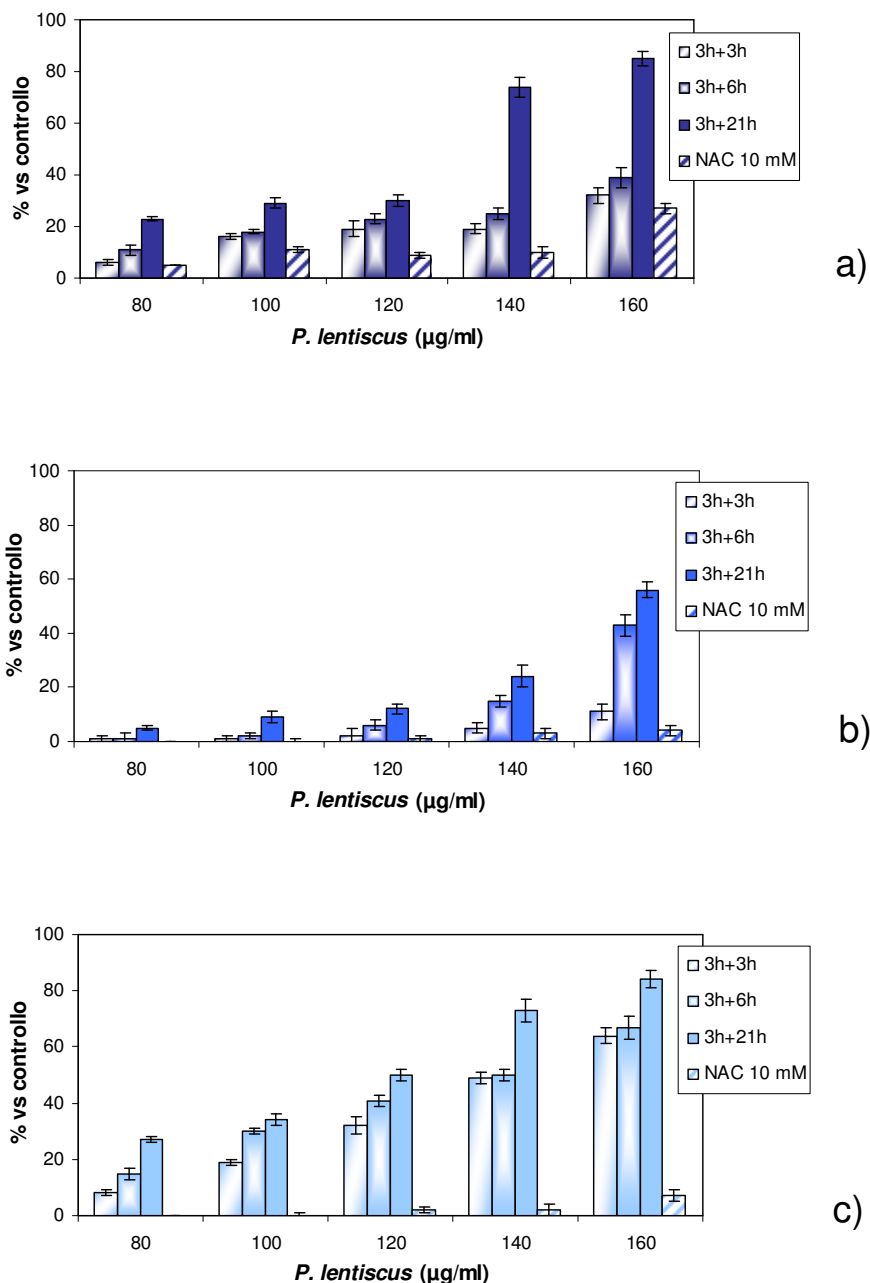


Figura 11: Variazione % dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo in seguito a trattamento per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus* e 3, 6 e 21 ore di coltura in medium normale ed in seguito a co-trattamento con NAC 10 mM, in cellule LoVo **a)**, 2008 **b)** e C13* **c)**.

4.9 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO IN PRESENZA DI N-ACETILCISTEINA

L'influenza della co-esposizione all'antiossidante è stata studiata considerando anche la capacità dell'olio di ridurre la crescita delle tre linee cellulari tumorali studiate.

Anche in questo caso le condizioni sperimentali prevedevano 1 ora di pre-trattamento con NAC, 3 ore di co-trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* (120 - 200 µg/ml) e 21 ore di incubazione in medium normale in presenza di NAC (10 mM).

I risultati riportati in tabella 4 evidenziano come la contemporanea esposizione all'antiossidante aumenti significativamente l'IC₅₀ dell'olio di *Pistacia lentiscus* in tutte e tre le linee cellulari.

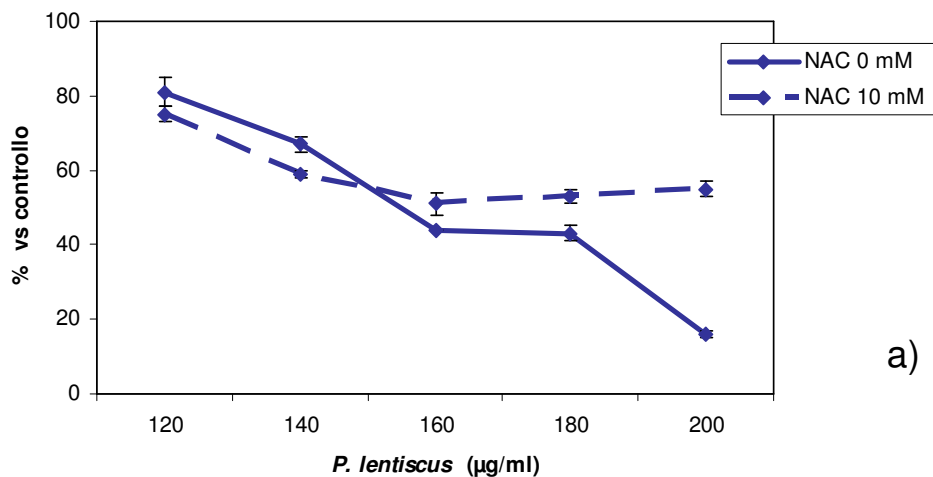
Cellule LoVo – Il grafico riportato in figura 12 a) evidenzia l'influenza di NAC sull'attività antiproliferativa delle varie dosi di olio. L'antiossidante influenza soprattutto l'effetto indotto dalla dose maggiore. Infatti, la percentuale di cellule vive passa dal 16%, per il solo trattamento con l'olio, al 55% nel caso del co-trattamento con NAC.

Cellule 2008 – Il grafico riportato in figura 12 b) evidenzia un maggiore effetto dell'antiossidante soprattutto sulle dosi maggiori di olio. Infatti, la notevole riduzione della crescita cellulare indotta dall'olio alle dosi di 180 e 200 µg/ml viene significativamente contrastata dal co-trattamento con NAC. In particolare, la percentuale di cellule vive per esposizione a 200 µg/ml di olio passa dal 5% al 60%.

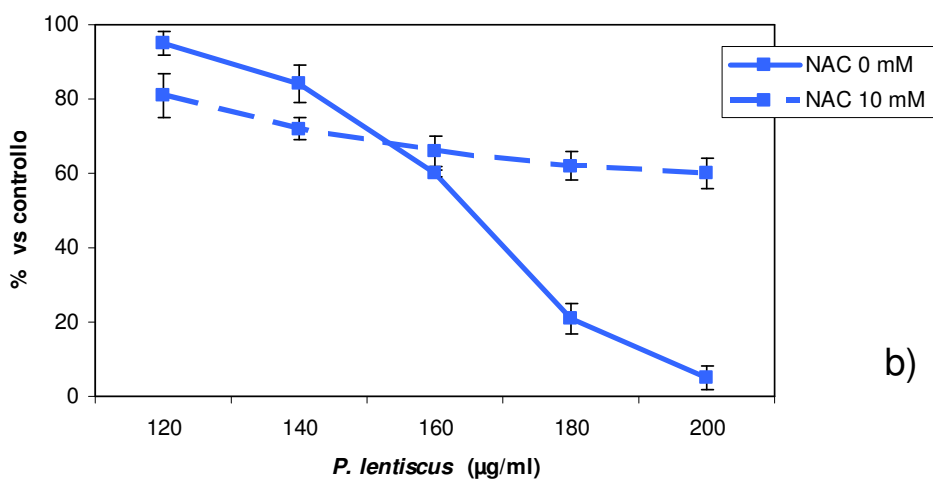
Cellule C13* – Diminuzione dell'effetto antiproliferativo dell'olio in presenza di NAC risulta ancora particolarmente evidente alle concentrazioni maggiori (Figura 12 c). Riduzione significativa si ottiene considerando la percentuale di cellule vive dopo trattamento con 200 µg/ml di olio (12%) rispetto a quella valutata dopo co-trattamento con l'antiossidante (60%).

Linea Cellulare	<i>P. lentiscus</i> IC ₅₀ (µg/ml)	
	NAC 0 mM	NAC 10 mM
LoVo	151.0 (146.7-158.8)	203.0 (124.7-330.4)
2008	166.0 (162.2-170.4)	251.5 (193.5-327.0)
C13*	156.4 (150.5-166.6)	239.7 (117.8-487.7)

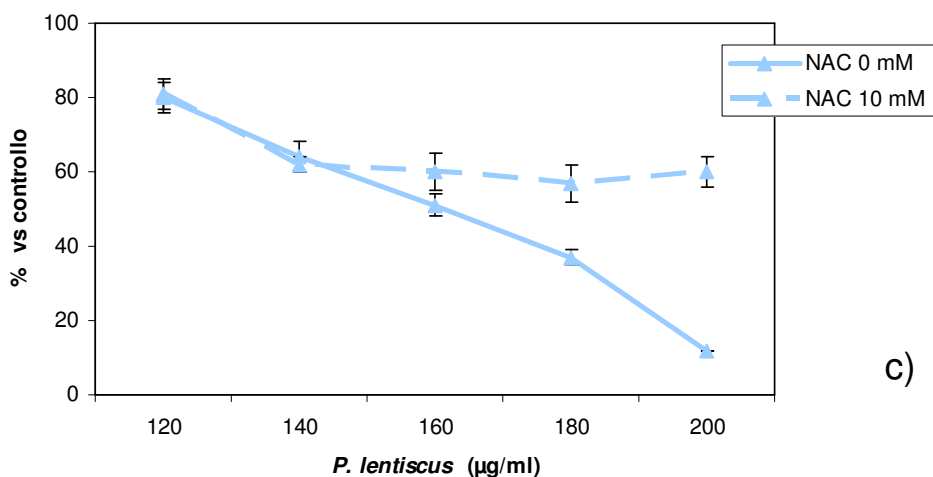
Tabella 4: Valori di IC₅₀ per le tre linee cellulari in seguito a trattamento con solo olio di *Pistacia lentiscus* e co-trattamento con NAC 10 mM.



a)



b)



c)

Figura 12: Variazione % rispetto al controllo della riduzione di sali di tetrazolio (MTT) in seguito a pre-trattamento per 1 ora con NAC, seguito da 3 ore di co-trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale addizionato di NAC 10 mM in cellule LoVo **a)**, 2008 **b)** e C13* **c)**.

4.10 VARIAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE INTRACELLULARE DI ATP

L'ATP è un marker di vitalità cellulare, in quanto è presente in tutte le cellule metabolicamente attive e la sua concentrazione decresce molto rapidamente quando le cellule vanno incontro a morte.

La variazione della concentrazione intracellulare di ATP è stata valutata dopo 3 ore di trattamento con varie concentrazioni di olio (80 – 160 µg/ml) e 21 ore di incubazione in medium normale, utilizzando il classico test luciferasi - D-luciferina. La luminescenza misurata è direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente.

In figura 13 sono riportati i risultati ottenuti su tutte e tre le linee cellulari utilizzate.

Cellule LoVo – In questa linea il trattamento induce una diminuzione dose dipendente della concentrazione cellulare di ATP, riduzione che risulta particolarmente evidente già alla concentrazione di 120 µg/ml e raggiunge il 60% alle due concentrazioni maggiori.

Cellule 2008 – L'influenza del trattamento con l'olio di *Pistacia* sulla concentrazione cellulare di ATP è meno marcata rispetto a quanto ottenuto con le LoVo. Infatti, un significativo calo dell'intensità di luminescenza rispetto al controllo, di oltre il 70%, si ottiene soprattutto con la concentrazione maggiore.

Cellule C13* - Questa linea cellulare risulta particolarmente sensibile al trattamento, che provoca una netta e dose dipendente diminuzione della concentrazione intracellulare di ATP. In particolare, questa riduzione è già significativa (48%) dopo esposizione a 100 µg/ml di olio, ed aumenta progressivamente fino a raggiungere l'86% alla dose maggiore (160 µg/ml).

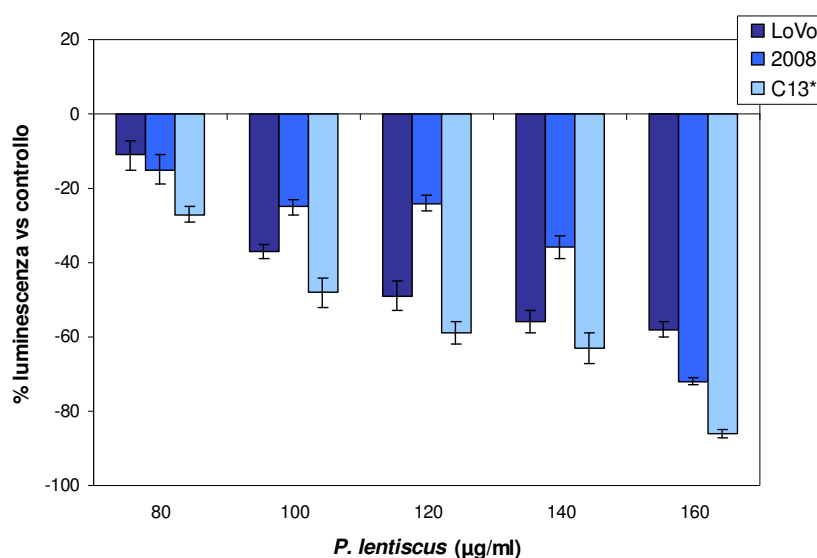


Figura 13: Variazione % rispetto al controllo dell'intensità di luminescenza in cellule LoVo, 2008 e C13* in seguito a 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale.

4.11 ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 3

La valutazione dell'attività della caspasi 3 indotta dall'olio di *Pistacia lentiscus* è stata studiata sulle tre linee cellulari dopo 3 ore di esposizione (80 - 160 µg/ml) seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

E' stato utilizzato un kit commerciale contenente un substrato per le caspasi 3/7 (Z-DEVD-aminoluciferina) e luciferasi. Il segnale luminescente prodotto è direttamente proporzionale alla quantità di caspasi 3 attiva. I risultati ottenuti sono riportati in figura 14.

Cellule LoVo - Il trattamento è in grado di indurre un incremento dose dipendente della quantità di caspasi 3 attiva, come dimostrato dal progressivo aumento dell'intensità di luminescenza misurato, aumento che risulta decisamente significativo (153%) alla dose di 160 µg/ml.

Cellule 2008 - Anche su questa linea cellulare l'olio di *P. lentiscus* è in grado di aumentare significativamente la quantità di caspasi 3 attiva, aumento che, almeno per le 3 dosi maggiori, risulta anche dose dipendente. Infatti, a fronte di un aumento dell'intensità di luminescenza di circa il 30% per concentrazioni inferiori a 120 µg/ml, per concentrazioni superiori si ottiene un aumento dell'80% e del 190% rispettivamente per esposizione a 140 e 160 µg/ml di olio.

Cellule C13* - Su questa linea l'olio di *P. lentiscus* è in grado di aumentare significativamente la quantità di caspasi 3 attiva (150%) solo quando utilizzato alla concentrazione maggiore.

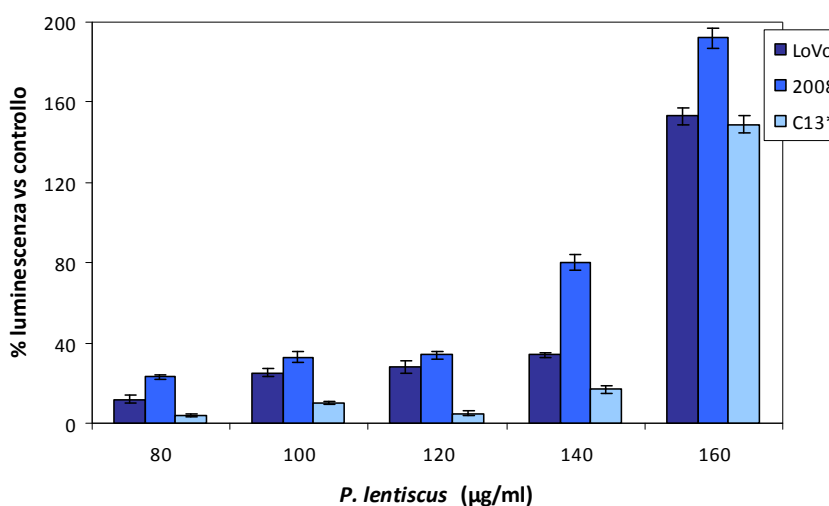


Figura 14: Variazione % rispetto al controllo dell'intensità di luminescenza in cellule LoVo, 2008 e C13* in seguito a 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale.

Risultati

4.12 ATTIVAZIONE DELLA CASPASI 8

L'attivazione della caspasi 8, marker importante per la valutazione del coinvolgimento della via apoptotica estrinseca, è stata valutata sulle tre linee cellulari dopo 3 ore di esposizione all'olio di *Pistacia lentiscus* (80 - 160 µg/ml) seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

E' stato utilizzato un kit commerciale contenente un substrato per la caspasi 8 (Z-LETD-aminoluciferina) e luciferasi. Il segnale luminescente prodotto è direttamente proporzionale alla quantità di caspasi 8 attiva.

I risultati ottenuti con tutte e tre le linee studiate non evidenziano alcuna attivazione dell'enzima (Figura 15). Infatti, indipendentemente dalle dosi utilizzate, i valori di luminescenza ottenuti sono del tutto sovrapponibili a quelli del controllo. In queste condizioni sperimentali, l'olio di *P. lentiscus* non è quindi in grado di attivare i meccanismi di morte cellulare programmata attraverso la via estrinseca

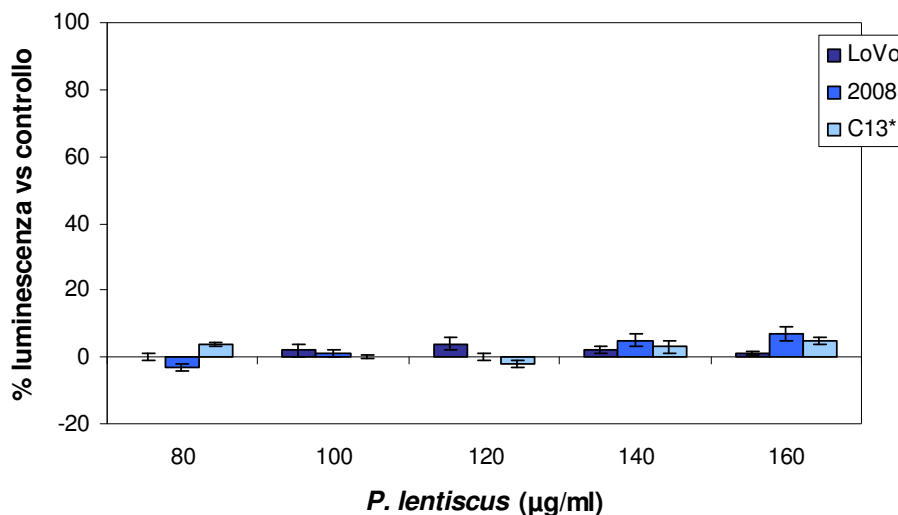


Figura 15: Variazione % rispetto al controllo dell'intensità di luminescenza in cellule LoVo, 2008 e C13* in seguito a 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale.

4.13 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO IN CO-TRATTAMENTO CON CIS-PLATINO

La linea cellulare *cis*-platino resistente (C13*) è quella che meglio risponde al trattamento con l'olio di *Pistacia lentiscus*. Su questa linea è stata quindi studiata la possibile influenza del co-trattamento *cis*-platino/olio di *P. lentiscus* sull'effetto antiproliferativo del chemioterapico.

Le cellule C13* sono state co-esposte per 3 ore all'olio (concentrazioni comprese tra 100 e 180 µg/ml) ed al *cis*-platino (*range* di concentrazioni 10^{-7} – 10^{-4} M), seguite da 21 ore di incubazione in medium completo in presenza di *cis*-platino.

I risultati ottenuti dimostrano che l'olio di *P. lentiscus* è in grado di aumentare significativamente ed in modo dose dipendente l'effetto antiproliferativo del *cis*-platino. Come riportato in figura 16 una significativa riduzione della crescita cellulare si ottiene già per co-esposizione alla dose minore di olio (100 µg/ml). Il potenziamento dell'effetto antiproliferativo del *cis*-platino si evidenzia soprattutto confrontando le IC₅₀ ottenute nelle diverse condizioni di trattamento: l'IC₅₀ di 387.2 µM ottenuta per esposizione delle cellule C13* al solo *cis*-platino, viene ridotta a 20.5 µM nel caso di co-esposizione a 100 µg/ml di olio, e si riduce poi progressivamente fino risultare pari a 3.7 µM per co-esposizione a 160 µg/ml di olio (Tabella 5).

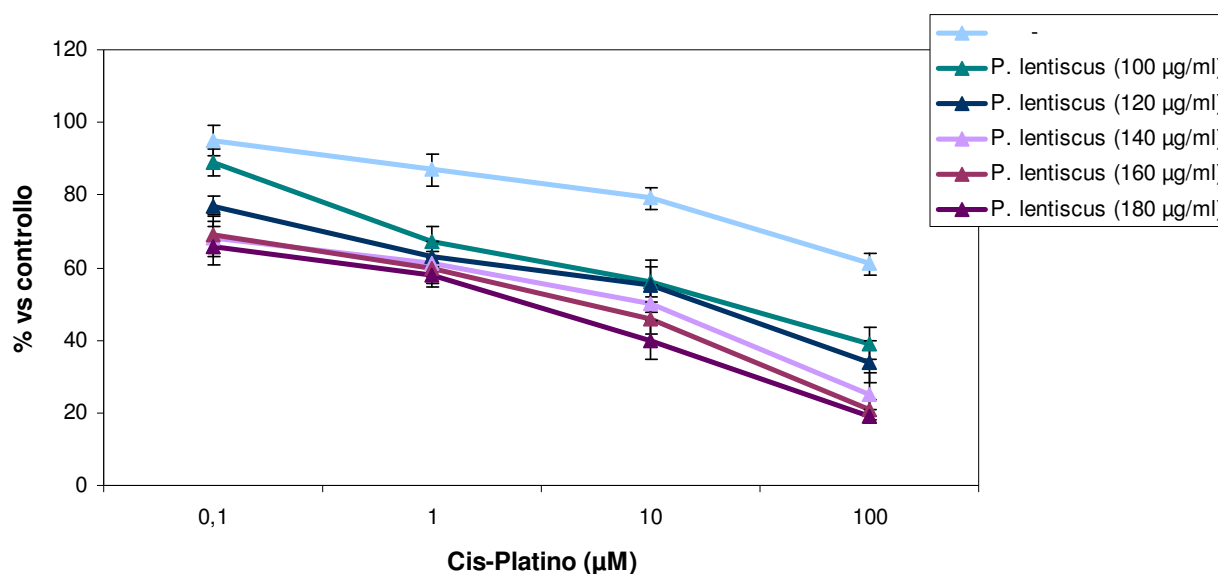


Figura 16: Variazione % rispetto al controllo della riduzione di sali di tetrazolio (MTT) in seguito a co-trattamento per 3 ore con *cis*-platino e olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale addizionato di *cis*-platino in cellule C13*.

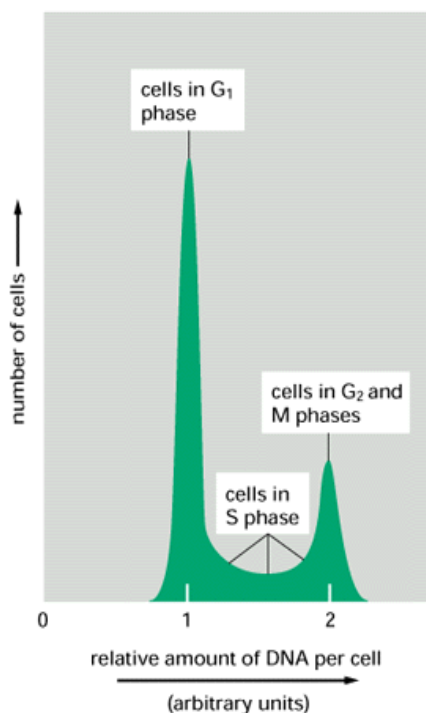
<i>P. lentiscus</i> (µg/ml)	<i>Cis-Platino</i> IC ₅₀ (µM)
-	387.0 (432.7-321.9)
100	20.5 (25.8-16.3)
120	10.6 (17.2-4.4)
140	4.8 (6.2-3.3)
160	3.7 (5.8-2.7)
180	2.1 (3.3-0.9)

Tabella 5: Valori di IC₅₀ per la linea cellulare C13* in seguito a co-trattamento di *cis*-platino con olio di *Pistacia lentiscus*.

4.14 PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE

La valutazione della progressione del ciclo cellulare è stata eseguita mediante esposizione allo ioduro di propidio ed analisi al citofluorimetro a flusso. Dopo 20 minuti di incubazione con il fluoroforo, al buio ed a temperatura ambiente, è stata misurata la quantità di ioduro di propidio incorporato dalle singole cellule. Poiché questo fluoroforo si intercala al DNA in modo stechiometrico, il suo contenuto è direttamente proporzionale al contenuto in DNA ed è quindi possibile utilizzare lo ioduro di propidio per valutare la progressione del ciclo cellulare.

Gli spettri ottenuti dall'analisi citofluorimetrica riportano sull'asse delle ascisse l'intensità di



fluorescenza e su quello delle ordinate il numero di eventi, cioè di cellule. Un campione di una normale popolazione cellulare è caratterizzato da un primo picco, piuttosto elevato, posizionato appena a sinistra della metà dell'asse delle ascisse, il quale rappresenta le cellule in fase G₀/G₁; segue verso destra una zona detta di plateau rappresentante le cellule in fase S e che si conclude con un ultimo picco molto basso, posizionato ad un valore di fluorescenza circa doppio rispetto al primo picco, che rappresenta le cellule in fase G₂/M. I picchi posizionati sull'estrema sinistra del grafico indicano le cellule morte.

La capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di influenzare la normale progressione del ciclo cellulare è stata studiata sulle tre linee cellulari tumorali considerando il protocollo di esposizione che prevedeva 3 ore di trattamento (100, 120 e

140 µg/ml) seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

Cellule LoVo - I risultati riportati in figura 17 a) indicano una lieve diminuzione (10% rispetto al controllo), in relazione alla dose, della percentuale di cellule in fase G₀/G₁, a fronte di un progressivo aumento della percentuale di quelle in fase G₂/M (52% con 140 µg/ml di olio).

Cellule 2008 - I risultati riportati in figura 17 b), mostrano come l'olio sia in grado di influenzare la normale progressione del ciclo cellulare aumentando la percentuale delle cellule in fase G₂/M che passa da un 28% nel controllo di cellule non trattate ad un 45% per la dose maggiore di olio essenziale utilizzata.

Cellule C13* - In questa linea cellulare l'esposizione all'olio provoca una progressiva e dose dipendente diminuzione della percentuale di cellule in fase G₀/G₁ (dal 46 al 26%), a fronte di un netto aumento della percentuale di quelle in fase G₂/M, percentuale che arriva al 45% per esposizione alla dose maggiore considerata (140 µg/ml; Figura 17 c).

Risultati

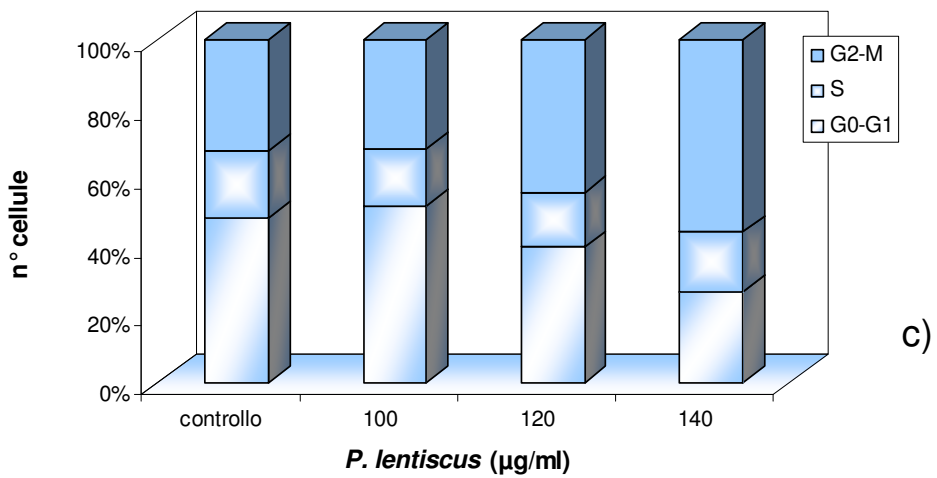
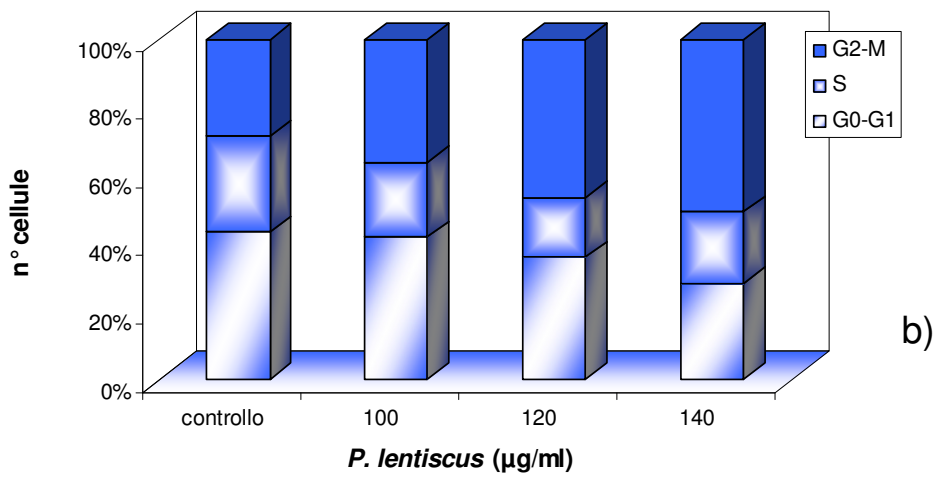
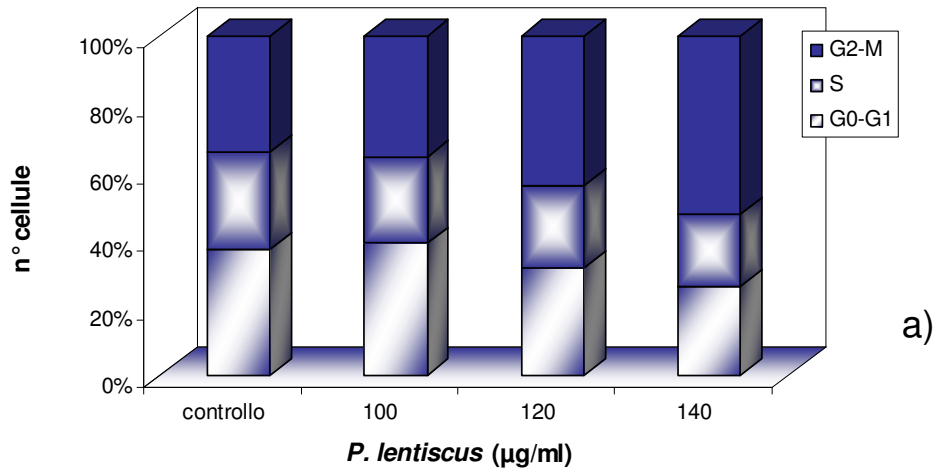


Figura 17: Valutazione % di eventi nelle singole fasi del ciclo cellulare in cellule LoVo a), 2008 b) e C13* c) trattate per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus*.

4.15 ESPRESSIONE CITOPLASMATICA DELLA CICLINA B1

I risultati ottenuti valutando mediante Western blotting l'effetto dell'olio sulla produzione di ciclina B1 confermano, per tutte e tre le linee tumorali, il blocco in fase G₂/M della progressione del ciclo cellulare.

Cellule LoVo - I dati riportati in figura 18 e 19 indicano una diminuzione dose dipendente dell'espressione della ciclina B1. In particolare, questa riduzione passa da un 14%, ottenuto con la dose minore, ad un 56% con la dose maggiore.

Cellule 2008 - Anche su questa linea l'olio in esame è in grado di indurre una netta riduzione dose dipendente dei livelli della proteina. Tale diminuzione è compresa tra il 16%, ottenuto con 80 µg/ml, e l'84% ottenuto con 160 µg/ml (Figura 18 e 19).

Cellule C13* - Risultati particolarmente interessanti si sono ottenuti con questa linea cellulare (Figura 18 e 19), ove la dose maggiore di olio riduce l'espressione di ciclina B1 di ben il 97% rispetto al controllo.

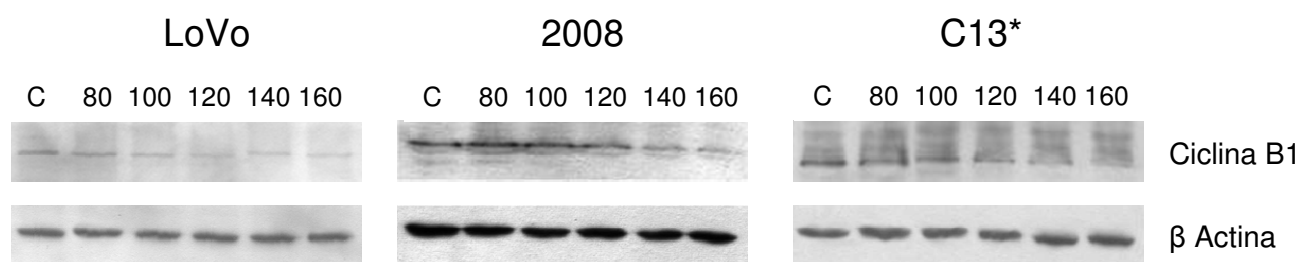


Figura 18: Western blotting della variazione rispetto al controllo della concentrazione citoplasmatica di ciclina B1 in cellule LoVo, 2008 e C13* dopo 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus*, seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

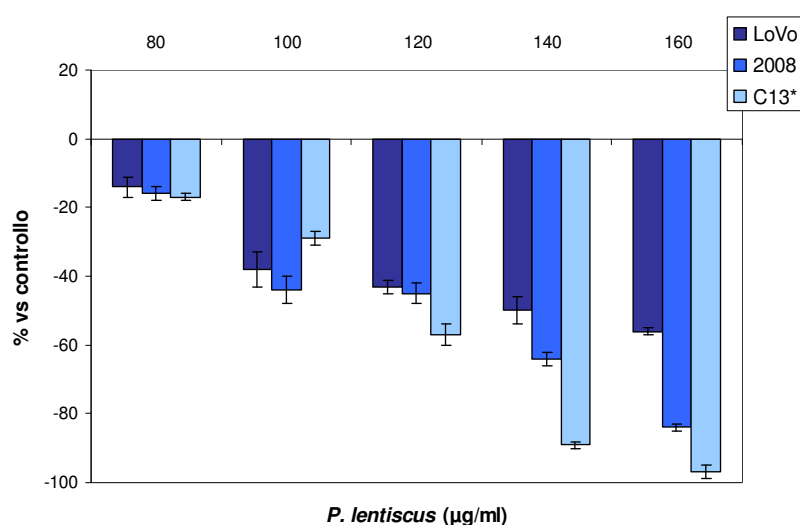


Figura 19: Variazione % rispetto al controllo dei livelli di ciclina B1 in cellule LoVo, 2008 e C13* trattate per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale.

4.16 INFLUENZA SUI MECCANISMI MITOTICI

Durante la divisione cellulare i microtubuli concorrono a formare il fuso mitotico, la cui funzione è quella di permettere la migrazione ordinata dei cromosomi omologhi, generati dalla duplicazione del materiale genetico nella fase S del ciclo cellulare, ai due poli opposti della cellula. In seguito alla disorganizzazione del fuso si ha la divisione cellulare completa; per contro, la sua mancata formazione, la sua eccessiva disgregazione o stabilizzazione impediscono la divisione cellulare bloccando il ciclo in fase G₂/M.

L'unità fondamentale dei microtubuli è la tubulina, proteina globulare che nel citoplasma è presente sottoforma di dimero α/β (Pasqualino e Panattoni, 2002). La forma acetilata della tubulina α è il risultato di una modifica post-trasduzionale che permette il mantenimento della struttura dei microtubuli durante il processo mitotico.

La capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di influenzare il ciclo mitotico è stata studiata sulle tre linee cellulari tumorali considerando il protocollo che prevedeva 3 ore di trattamento (dosi tra 80 e 160 $\mu\text{g/ml}$ per l'analisi con Western blotting) seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

Cellule LoVo - L'espressione citoplasmatica della tubulina acetilata (Figura 20), si riduce lievemente ed in maniera non dose dipendente, risultando particolarmente significativa (-36% rispetto al controllo) solo alla dose di 160 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 21).

Cellule 2008 - La figura 20 evidenzia una diminuzione significativa solo alle due concentrazioni maggiori di olio. In particolare, con 140 $\mu\text{g/ml}$ l'espressione della proteina è del 38% rispetto al controllo, con riduzione pari al 62%, mentre con la dose di 160 $\mu\text{g/ml}$ la riduzione risulta dell'83% (Figura 21).

Cellule C13* - L'espressione della tubulina acetilata si riduce di circa il 40% già alla concentrazione di 80 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 21); ulteriore diminuzione si evidenzia all'aumentare della dose di olio fino ad ottenere un calo del 90% alla concentrazione maggiore.

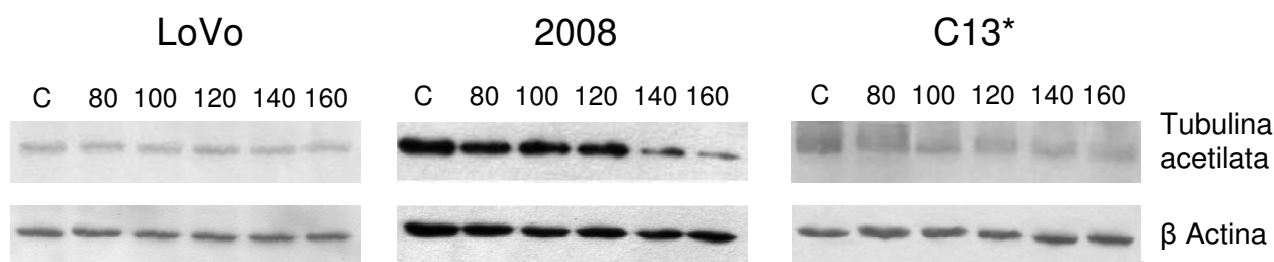


Figura 20: Western blotting della variazione rispetto al controllo della concentrazione citoplasmatica di tubulina acetilata in cellule LoVo, 2008 e C13* dopo 3 ore di trattamento con olio di *Pistacia lentiscus*, seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

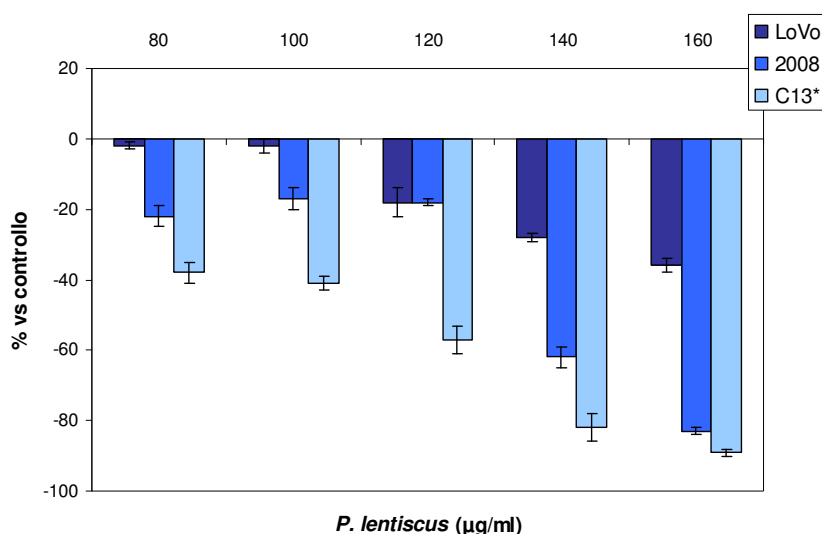


Figura 21: Variazione % rispetto al controllo dei livelli di tubulina acetilata in cellule LoVo, 2008 e C13* trattate per 3 ore con olio di *Pistacia lentiscus* e 21 ore di incubazione in medium normale.

La capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di influenzare il ciclo mitotico è stata inoltre studiata utilizzando la microscopia confocale, considerando sempre le tre linee cellulari tumorali ed il protocollo di esposizione che prevedeva 3 ore di trattamento (60 e 140 µg/ml) seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

Quali composti di riferimento sono stati utilizzati il Taxolo, stabilizzatore dei microtubuli, e la Vincristina, che inibisce la polimerizzazione della tubulina ed induce la depolimerizzazione dei microtubuli con formazione di filamenti a spirale.

Cellule LoVo - Le cellule trattate con Taxolo sono caratterizzate da un addensamento di tubulina acetilata decisamente maggiore rispetto al controllo, indice di mancata disaggregazione dei microtubuli indotta dal chemioterapico (Figura 22 a); le cellule trattate con Vincristina presentano invece citoscheletro frammentato per depolimerizzazione dei microtubuli, si osservano tuttavia filamenti a spirale; le cellule trattate con l'olio di *Pistacia lentiscus*

Risultati

presentano una sostanziale diminuzione di tubulina acetilata rispetto al controllo non trattato e la formazione di numerosi filamenti a spirale (Figura 22 a). I risultati ottenuti indicano quindi un effetto dell'olio riconducibile più a quello della Vincristina che a quello del Taxolo.

Cellule 2008 - Le cellule trattate con Taxolo sono caratterizzate da un addensamento di tubulina acetilata maggiore rispetto al controllo, indice di mancata disaggregazione dei microtubuli indotta dal chemioterapico (Figura 22 b); le cellule trattate con Vincristina presentano livelli inferiori di tubulina per depolimerizzazione dei microtubuli; le cellule trattate con l'olio di *Pistacia lentiscus* presentano una sostanziale diminuzione di tubulina acetilata rispetto al controllo non trattato (Figura 22 b). I risultati ottenuti indicano quindi un effetto dell'olio riconducibile più a quello della Vincristina che a quello del Taxolo.

Cellule C13* - Le cellule trattate con Taxolo sono caratterizzate da un addensamento di tubulina acetilata maggiore rispetto al controllo, indice di mancata disaggregazione dei microtubuli per azione del chemioterapico (Figura 22 c); quelle trattate con Vincristina presentano invece un citoscheletro frammentato per depolimerizzazione dei microtubuli; le cellule trattate con l'olio presentano una sostanziale diminuzione di tubulina acetilata rispetto al controllo non trattato (Figura 22 c). Anche in questo caso quindi si osserva un comportamento simile a quello della Vincristina.

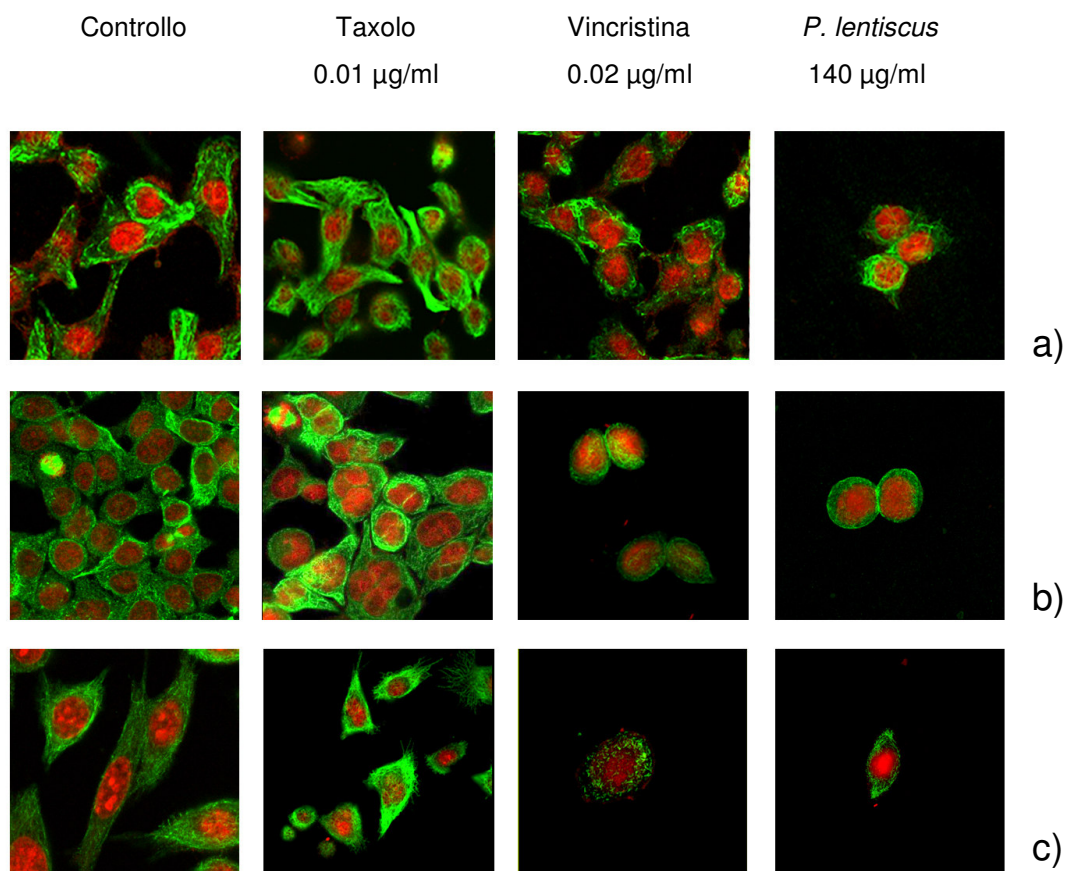


Figura 22: Valutazione della variazione di tubulina acetilata in cellule LoVo a), 2008 b) e C13* c).

Capitolo 5

DISCUSSIONE

L'analisi dei fitocomplessi è stata finora condotta dalla ricerca utilizzando procedure basate sul principio che la conoscenza dettagliata dei comportamenti di tutti i singoli componenti dei fitocomplessi possa portare alla conoscenza delle proprietà del fitocomplesso stesso. I frequenti insuccessi ottenuti attraverso questa metodologia d'indagine hanno portato alla necessità di sviluppare modelli di indagine più adeguati alla risoluzione dei problemi posti dalla complessità dall'analisi dei fitocomplessi (Corns, 2003; Ernst, 2004).

Certamente le procedure analitiche seguite finora dalla ricerca hanno permesso di ottenere importanti risultati, ma l'applicazione di tali procedure dipende da almeno due condizioni. La prima è che le *interazioni* tra i singoli componenti non esistano, o siano talmente deboli da poter essere trascurate; solo a questa condizione infatti i componenti possono essere logicamente e matematicamente considerati come "*un insieme*". La seconda condizione è che le relazioni che descrivono il comportamento dei singoli componenti siano lineari, solo in questo caso è possibile la condizione di sommatoria, vale a dire la condizione per cui un'equazione che descrive il comportamento dei fitocomplessi ha la stessa forma delle equazioni che descrivono il comportamento dei componenti che lo costituiscono. È noto tuttavia come l'analisi dei fitocomplessi abbia spesso dimostrato che tali condizioni non sono quasi mai soddisfatte, mostrando come i fitocomplessi siano costituiti da miscele complesse di componenti quasi sempre "*in interazione*" tra loro. Questo porta a considerare come non sia sufficiente studiare il comportamento proprio dei singoli componenti, ma anche le *interazioni dinamiche* che si stabiliscono tra loro. I nuovi approcci analitici cercano quindi di affrontare la "*totalità*" e cioè le *interazioni dinamiche*, responsabili del differente comportamento dei componenti quando sono isolati e quando sono entro i fitocomplessi (Corns, 2003).

È in tale prospettiva che in questo lavoro è stata affrontata l'analisi dei fitocomplessi considerandoli non solo come somma di singoli elementi ma anche come *sistemi* aventi proprietà diverse e non univocamente riconducibili a quelle dei singoli componenti.

Questa impostazione concettuale ricalca appieno l'espressione di Aristotele secondo cui "*il tutto è maggiore della somma delle sue parti*" che spesso viene citata a proposito dei

Discussione

fitocomplessi ad indicare l'impossibilità di analizzarli dal momento che le caratteristiche del "tutto" non sono spiegabili a partire dalle caratteristiche dei singoli componenti.

Il lavoro qui riportato è frutto di una collaborazione con Data Medica Padova nell'ambito di un progetto di ricerca molto più ampio che si propone di caratterizzare e studiare oli essenziali ottenuti da altre specie di *Pistacia* anche autoctone (Filippi, 2002).

In particolare, è stata studiata l'attività antiproliferativa di un olio essenziale ottenuto da ramoscelli e foglie di *Pistacia lentiscus* proveniente dal Portogallo. Studi precedenti hanno permesso la caratterizzazione chimica dell'olio, isolando 23 componenti principali ed identificando quelli presenti in maggiore quantità, dimostrando inoltre un significativo effetto citotossico su cellule di adenocarcinoma mammario umano (MCF-7) (Costantin, 2000) non riconducibile all'azione dei principali componenti (Dal Cortivo, 2002).

Il primo obiettivo di questo lavoro è stato quello di estendere la valutazione dell'effetto antiproliferativo dell'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* ad altre linee cellulari tumorali di derivazione umana: una linea di adenocarcinoma del colon (cellule LoVo) ed una linea di adenocarcinoma dell'ovaio (cellule 2008), compresa la sua variante *cis*-platino resistente (cellule C13*), considerando tempi d'esposizione diversi.

Sono state utilizzate concentrazioni di olio comprese in un *range* di 30 - 200 µg/ml, per un'esposizione di 3 o di 24 ore. Nel primo caso la valutazione dell'effetto antiproliferativo, mediante MTT test, è stata eseguita dopo ulteriori 21 ore di coltura, al fine di permettere il pieno manifestarsi del danno indotto. Questo protocollo sperimentale deriva dai risultati di studi precedenti (Costantin, 2000; Dal Cortivo, 2002) condotti su cellule MCF-7 con lo stesso olio essenziale di *Pistacia lentiscus* proveniente dal Portogallo.

E' innanzitutto da sottolineare come il tempo di esposizione giochi un ruolo importante sull'effetto antiproliferativo dell'olio in esame soprattutto sulle cellule LoVo e 2008. Infatti, aumentando da 3 a 24 ore il tempo di trattamento si ottiene una riduzione dell'IC₅₀ di oltre 3 volte, passando da 151.0 a 45.0 µg/ml per le LoVo e da 166.0 a 51.4 µg/ml per le 2008. Risultato diverso si ottiene invece con le C13*, ove il prolungamento del tempo di esposizione non influenza in maniera significativa l'IC₅₀, che risulta rispettivamente di 158.4 µg/ml e di 133.2 µg/ml.

L'effetto antiproliferativo del fitocomplesso è stato valutato anche su una linea non tumorale di fibroblasti umani per evidenziarne eventuali differenze di sensibilità. Per ottenere attività antiproliferativa dose dipendente dell'olio di *Pistacia lentiscus* su fibroblasti umani (cellule HFFF2) è stato necessario esporre le cellule per almeno 72 ore consecutive al trattamento. Poiché l'inibizione della crescita delle cellule tumorali si ottiene già dopo 3 ore di esposizione seguite da 21 ore di incubazione in medium normale, risulta evidente che cellule in rapida duplicazione, quali le cellule tumorali, sono più sensibili all'insulto tossico indotto dall'olio.

Lo studio dell'effetto antiproliferativo dell'olio sulle tre linee tumorali è stato quindi approfondito considerando un altro marker di proliferazione quale l'espressione citoplasmatica delle protein chinasi fosforilate.

Le protein chinasi ERK1 ed ERK2 sono enzimi ad attività fosforilativa appartenenti alla famiglia delle MAP Chinasi. Le due isoforme dell'enzima sono ampiamente espresse in tutte le cellule eucariote e sono coinvolte nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. In condizioni di riposo sono localizzate nel citoplasma ancorate alla membrana plasmatica ma, in seguito ad attivazione, vengono fosforilate e possono quindi traslocare nel nucleo dove regolano l'espressione genica.

Mentre la forma defosforilata è costitutivamente presente nella cellula anche a riposo, la forma fosforilata (p-ERK), cioè la forma attiva dell'enzima, si trova a livelli apprezzabili solamente nelle cellule in attiva crescita ed è quindi un buon indice per la valutazione dell'attività proliferativa cellulare (Paoletti, 2004).

Dopo 3 ore di trattamento seguite da 21 ore di incubazione in medium normale l'olio è in grado di ridurre, in modo dose dipendente, la concentrazione citoplasmatica di p-ERK in tutte e tre le linee cellulari considerate. In particolare, sia sulle LoVo che sulle 2008, questo effetto risulta statisticamente significativo alle dosi di 140 e 160 µg/ml con riduzione dell'espressione delle proteine fosforilate dell'ordine del 40 - 50%, mentre con le C13* analoga inibizione si ottiene già alla dose di 100 µg/ml. Questi risultati confermano nel loro insieme quanto già ottenuto con il classico test dell'MTT che valuta la vitalità cellulare in base alla funzionalità enzimatica mitocondriale.

I processi di necrosi ed apoptosi cellulare si differenziano tra loro in modo significativo, in quanto la necrosi è una conseguenza passiva di un danno cellulare, mentre l'apoptosi, o morte programmata, è parte integrante dei normali processi fisiologici cellulari. L'apoptosi poi assicura un equilibrio tra proliferazione e morte cellulare e gioca un ruolo regolatorio nel controllo delle dimensioni delle popolazioni cellulari (Kerr, 1972).

Lo studio del processo apoptotico, e la sua distinzione da quello necrotico, risultano interessanti in quanto correlati a numerose patologie. Questo fenomeno riveste una particolare importanza in oncologia; è stato infatti osservato che numerosi farmaci antitumorali, come pure le radiazioni e l'ipertermia, sono in grado di scatenare i meccanismi che conducono a questo tipo di morte. In quest'ottica si inserisce il secondo obiettivo di questo lavoro: valutare cioè l'influenza del trattamento sui meccanismi di morte cellulare programmata.

Il processo di apoptosi è caratterizzato da determinati eventi morfologici, tra i quali la rottura della membrana plasmatica, la condensazione del citoplasma e del nucleo, la frammentazione del DNA. Mediante analisi citofluorimetrica è possibile valutare lo stadio iniziale del processo apoptotico, sfruttando la caratteristica delle cellule in apoptosi di esporre il fosfolipide fosfatidilserina sul lato esterno della membrana plasmatica cellulare. Per rilevare la

Discussione

presenza del fosfolipide viene utilizzata una proteina di legame Ca^{2+} -dipendente l'annexina V, che presenta un'elevata affinità per PS, marcata con un fluoroforo. Nella citofluorimetria questa proprietà dell'annexina V viene sfruttata assieme a quella dello ioduro di propidio, fluoroforo che si lega al DNA cellulare solamente nel caso in cui la cellula presenti una rottura parziale o totale della membrana.

Con questa tecnica è quindi possibile, rilevando la fluorescenza emessa dalle due sostanze, distinguere le cellule vive (negative ad entrambe i reattivi), da quelle in fase apoptotica precoce (positive all'annexina V e negative allo ioduro di propidio) e da quelle in apoptosi avanzata (positive ad entrambe le sostanze) (Vermes, 1995).

Le cellule sono state trattate con concentrazioni progressive di olio, partendo da una non in grado di influenzarne la crescita, secondo il protocollo che prevedeva 3 ore di esposizione.

In generale, i risultati ottenuti sia con l'adenocarcinoma ovarico, che del colon, correlano abbastanza bene con quanto ottenuto con gli studi di citotossicità precedentemente riportati, infatti l'olio in esame è in grado di attivare in modo dose dipendente i meccanismi di morte cellulare programmata. Il risultato è particolarmente evidente sulle cellule LoVo e C13*.

Nello specifico, sia la concentrazione di cellule che legano solo l'annexina V, e quindi da considerare in apoptosi precoce, che la percentuale di cellule che legano anche lo ioduro, e quindi da considerare in apoptosi tardiva, aumenta in maniera dose dipendente. Da sottolineare inoltre che in tutte le linee cellulari testate l'olio induce preferenzialmente fenomeni di apoptosi tardiva.

I risultati ottenuti quindi suggeriscono che l'olio di *Pistacia* sia in grado di modificare la permeabilità della membrana cellulare, permettendo così, anche a concentrazioni non ancora in grado di influenzare la proliferazione cellulare, l'ingresso allo ioduro di propidio.

Per verificare questa ipotesi, lo studio è proseguito utilizzando la microscopia confocale che permette di evidenziare l'entrata attraverso la membrana plasmatica di un agente fluoroforo, quale lo ioduro di propidio.

I risultati ottenuti confermano che, in tutte e tre le linee cellulari utilizzate, l'olio modifica in maniera dose dipendente la permeabilità della membrana cellulare. E' quindi possibile concludere che l'olio in esame è sì in grado di attivare i meccanismi di apoptosi, ma d'altro canto induce anche un certo grado di danno di membrana.

Ulteriore conferma è stata ottenuta con l'indagine morfologica mediante microscopia ottica a fondo chiaro, dalla quale si evidenzia come il trattamento sia in grado di provocare una significativa alterazione strutturale. Le cellule trattate, indipendentemente dalla loro origine, risultano decisamente più arrotondate e, in maniera dose dipendente, mostrano una netta diminuzione della "luminosità", indice di ridotta vitalità.

I mitocondri sono considerati bersaglio specifico per l'azione di vari agenti antitumorali che agiscono destabilizzando questi organelli e attivando i meccanismi di apoptosi. Quest'ultima in alcuni casi, viene indotta selettivamente in cellule tumorali (Ralph and Neuzil, 2009). Oltre al ben noto ruolo dei mitocondri nel metabolismo energetico, si prospetta quindi per questi organelli una seconda importante funzione, quella cioè di regolatori di morte cellulare (Orrenius, 2007).

E' noto inoltre che i mitocondri rappresentano anche la maggiore fonte intracellulare di specie reattive dell'ossigeno, prevalentemente prodotte nel complesso I e nel complesso III della catena respiratoria (Lenaz, 2005). A basse concentrazioni i ROS possono essere considerati come messaggeri intracellulari coinvolti in numerose funzioni, tra cui la proliferazione, la differenziazione e l'apoptosi. Ad alte concentrazioni, invece, risultano tossici per la cellula (Kim, 2005; Simon, 2000).

A livello mitocondriale l'aumento della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno si ottiene per blocco del trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria, blocco che impedisce la fuoriuscita di protoni nello spazio intermembrana, causando in tal modo aumento del potenziale della membrana mitocondriale stessa (Lenaz, 2005).

I mitocondri però, oltre ad essere fonte di specie radicaliche dell'ossigeno ne sono anche bersaglio. Infatti, i ROS, insieme ad altri numerosi agenti quali ad esempio Bax e Bid, possono agire a livello della membrana mitocondriale determinando tra l'altro l'apertura di un complesso poliproteico chiamato poro di transizione mitocondriale (Permeability Transition Pore Complex, PTPC) localizzato in alcuni punti di contatto tra le due membrane mitocondriali. Questo evento fa cadere la differenza di potenziale per uscita di fattori proteici pro-apoptici come AIF (Apoptosis Inducing Factor), in grado di attivare una via indipendente dalle caspasi, ed il citocromo C che si lega alla proteina Apaf-1 (apoptotic protease activating factor), alla caspasi 9 e ad una molecola di ATP, formando un complesso definito *apoptosoma*. La caspasi 9 diviene così in grado di attivare la caspasi 3, che darà il via ad una cascata molecolare che si conclude con la degradazione del DNA ad opera di fattori nucleari (Paoletti, 2004).

Per verificare se il mitocondrio fosse o meno un target coinvolto nei fenomeni apoptotici indotti dall'olio, lo studio è proseguito analizzando innanzitutto le variazioni a carico del potenziale della membrana mitocondriale.

La variazione del potenziale mitocondriale, indice di attivazione dei processi apoptotici, è stata valutata mediante Rodamina 123 (Rh123), sonda cationica lipofila che risulta selettiva per il potenziale mitocondriale, poiché questo è dalle 2 alle 3 volte più elevato rispetto a quello che si trova a livello plasmatico. La Rodamina quindi è in grado di evidenziarne un'eventuale variazione.

Si è valutato l'andamento del potenziale di membrana mitocondriale utilizzando tre protocolli sperimentali diversi: il protocollo standard che prevedeva 3 ore di trattamento e 21 di

Discussione

incubazione in medium normale e due protocolli che prevedevano periodi di incubazione decisamente più brevi: 3 e 6 ore.

Dopo 3 ore di esposizione seguite da 21 di coltura in medium normale, l'olio di *Pistacia* induce una riduzione del potenziale della membrana mitocondriale in tutte e tre le linee studiate, effetto che tuttavia evidenzia alcune differenze tra le tre linee cellulari. In particolare, mentre sulle cellule di origine ovarica, 2008 e C13*, la diminuzione del potenziale della membrana mitocondriale è dose dipendente e raggiunge valori dell'ordine del 70 - 80% alle dosi maggiori (140 - 160 µg/ml), sulla linea di adenocarcinoma del colon (cellule LoVo), l'effetto, pur significativo, non risulta correlato alla dose utilizzata.

Anche la valutazione dell'andamento del potenziale di membrana in tempi più vicini all'esposizione all'olio, cioè dopo 3 e 6 ore dal termine del trattamento, evidenzia ancora un diverso comportamento delle cellule ottenute da adenocarcinoma del colon da quelle ottenute dall'ovaio. In particolare, mentre per le LoVo sia dopo 3 che dopo 6 ore dal termine del trattamento si ottiene solo un leggero aumento dell'intensità di fluorescenza (circa il 20% alla dose maggiore), indice di un blando incremento del potenziale di membrana, per le 2008 e le C13* questo aumento risulta sia dose che tempo dipendente. In particolare, per le 2008 dopo 3 ore dal trattamento si ottiene un significativo incremento del potenziale solo alla dose maggiore (37% con 160 µg/ml), mentre dopo 6 ore si ottiene un aumento del 30% già alla dose di 140 µg/ml, che raggiunge il 70% con la dose maggiore. Utilizzando invece le C13* si ottiene un significativo aumento dell'intensità di fluorescenza dell'ordine del 25 e 35% alle due dosi maggiori.

Poiché i ROS sono tra i fattori in grado di indurre la caduta del potenziale della membrana mitocondriale, il passaggio successivo è stato quello di valutarne parallelamente la produzione intracellulare, utilizzando sempre le stesse condizioni sperimentali.

La capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di indurre produzione di ROS è stata studiata sulle tre linee cellulari tumorali utilizzando la sonda 2,7-diclorofluorescina acetato (DCFH-DA), sonda che diffonde liberamente attraverso la membrana plasmatica e viene idrolizzata da esterasi presenti nel citoplasma in diclorofluorescina (DCFH), non fluorescente ed impermeabile alla membrana. In presenza di specie reattive dell'ossigeno, soprattutto del radicale idrossile e del perossido di idrogeno, la DCFH viene rapidamente ossidata a diclorofluoresceina (DCF), composto altamente fluorescente (Nie, 2009). L'intensità di fluorescenza risulterà quindi direttamente proporzionale ai livelli intracellulari di ROS.

Gli esperimenti, eseguiti con il protocollo standard (3 ore di trattamento seguite da 21 ore di incubazione in medium normale), hanno evidenziato, per entrambe le linee ovariche, un aumento dell'intensità di fluorescenza dose dipendente, anche se decisamente più significativo per le C13* (fino all'84%) rispetto alle 2008, risultato che può trovare giustificazione nel fatto che le cellule C13* sono caratterizzate da un'alterata funzionalità della membrana mitocondriale.

(Andrews e Albright, 1992). Per quanto riguarda le LoVo, invece, una notevole produzione di ROS, dell'ordine dell'80%, si ottiene solo con le due dosi maggiori.

L'influenza del trattamento sulla produzione di ROS da parte delle cellule LoVo risulta maggiormente correlata all'incremento della dose piuttosto che al tempo trascorso dal trattamento. Infatti, la concentrazione più bassa induce una produzione di radicali compresa tra 6 e 11% rispettivamente dopo 3 e 6 ore dal trattamento, con la concentrazione maggiore l'incremento risulta rispettivamente del 32 e 39%.

Il tempo trascorso dalla fine del trattamento gioca invece un ruolo importante sulla produzione di ROS nelle cellule 2008. Infatti, se la valutazione viene condotta dopo 3 ore non si osserva un rilevante aumento della fluorescenza, che invece risulta significativo e dose dipendente dopo 6 ore (43% alla concentrazione maggiore).

Particolarmente importante è poi l'aumento della produzione di radicali liberi indotto dall'olio sulle cellule C13*. Questo aumento risulta molto più correlato all'incremento di dose che non al tempo trascorso dal trattamento. Infatti, l'aumento di fluorescenza ottenuto dopo 3 e 6 ore è rispettivamente del 49 e 50% alla dose di 140 µg/ml e del 64 e 67% alla dose di 160 µg/ml.

Considerati nel loro insieme, e ricordando che oltre il 90% dei ROS cellulari vengono prodotti dai mitocondri, i risultati ottenuti indicano che questi organelli rappresentano effettivamente un target importante nell'attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata indotti dall'olio di *Pistacia lentiscus* che, come già riportato per altri derivati di origine naturale (Ralph and Neuzil, 2009), si attuano attraverso l'aumento della produzione di ROS e la diminuzione del potenziale della membrana mitocondriale.

Poiché l'olio di *Pistacia lentiscus* è in grado di stimolare nettamente la produzione cellulare di ROS, il passo successivo è stato quello di studiare come questo incremento fosse influenzato dalla contemporanea esposizione ad un antiossidante quale la N-acetilcisteina (NAC).

È noto infatti che NAC, una volta entrato nella cellula, viene rapidamente deacetilato a L-cisteina, aminoacido essenziale per la sintesi di glutatione ridotto (GSH), tripeptide che gioca un ruolo fisiologico centrale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare e nella protezione dall'insulto indotto da sostanze pro-ossidanti e tossiche (De Flora, 2001).

In tutte e tre le linee cellulari studiate il co-trattamento con l'antiossidante ha portato ad una drastica diminuzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno, che risulta dell'ordine del 60% per le LoVo e del 50 e 75% rispettivamente per le 2008 e le C13*.

Poiché l'aumentata produzione di ROS a livello della catena respiratoria è uno dei fattori che promuovono l'apoptosi, ulteriore analisi è stata quella di valutare l'influenza dell'N-acetilcisteina anche sull'attivazione dei meccanismi di morte cellulare indotti dall'olio.

I risultati ottenuti evidenziano come in tutte e tre le linee cellulari il concomitante trattamento con l'antiossidante riduca significativamente i fenomeni apoptotici indotti dal solo trattamento con

Discussione

l'olio. Infatti, sia per la linea del colon che per quelle ovariche, si ha una netta diminuzione della percentuale delle cellule in apoptosi, specie in fase tardiva, per tutte le concentrazioni di olio di *Pistacia* testate. Questo si traduce, per la dose maggiore (160 µg/ml), in una riduzione di circa il 40% per le cellule LoVo e C13* e del 30% per le 2008.

Indipendentemente dalla linea cellulare utilizzata, l'antiossidante è risultato anche in grado di ridurre significativamente l'effetto antiproliferativo dell'olio di *P. lentiscus* soprattutto per dosi molto elevate del fitocomplesso, ben oltre l'IC₅₀ (180 - 200 µg/ml).

Considerati nel loro insieme questi risultati indicano che l'olio di *Pistacia lentiscus* è in grado di attivare i meccanismi di morte cellulare programmata attraverso la via intrinseca, come dimostrato dall'alterazione del potenziale della membrana mitocondriale e dall'aumento della produzione di ROS. Questi fenomeni si verificano in seguito al blocco del trasporto degli elettroni lungo la catena respiratoria. Poiché lo *step* finale di questa catena è l'ATP-sintetasi si è ipotizzata una possibile influenza dell'olio anche a questo livello.

La concentrazione di ATP sono un parametro cruciale per l'omeostasi cellulare. Probabilmente le cellule sono dotate di un "sistema di monitoraggio" della concentrazione di ATP, che ne regola richiesta e consumo. Inoltre, se la cellula non è in grado di mantenere l'ATP al di sopra di livelli critici per un certo periodo di tempo, si attivano i meccanismi di morte cellulare (Izyumov, 2004).

Una moderata diminuzione dell'ATP intracellulare determina l'attivazione di processi apoptotici, mentre la sua deplezione blocca gli *steps* che inducono morte cellulare programmata, tra i quali anche la formazione dell'*apoptosoma*, inducendo preferenzialmente morte per necrosi (Izyumov, 2004).

La variazione della concentrazione cellulare di ATP è stata studiata mediante la classica metodica luciferina-luciferasi.

Anche in questo caso l'effetto indotto dall'olio di *Pistacia lentiscus* è indipendente dalla linea cellulare utilizzata. Infatti, un significativo calo dose dipendente dell'ATP intracellulare si osserva sia con le cellule LoVo che con le C13*. In particolare, in quest'ultima linea si evidenzia una drastica diminuzione della luminescenza che raggiunge il 63 e l'85% alle due dosi maggiori saggiate. Meno rilevante è la diminuzione di ATP indotta dall'olio sulle cellule 2008, ove l'effetto non è dose dipendente e risulta particolarmente evidente (70%) solo alla concentrazione più alta.

In seguito all'apertura dei pori di transizione sulla membrana mitocondriale si ha liberazione di proteine pro-apoptotiche, come ad esempio il citocromo C, che attivano la cascata delle caspasi.

Le caspasi sono cistein proteasi che differiscono tra loro nella sequenza primaria e nella specificità per i substrati. Sono sintetizzate come proenzimi inattivi e la loro attivazione avviene in seguito ad un taglio proteolitico in corrispondenza di un residuo di acido aspartico. Tale

attivazione può avvenire anche ad opera di altre caspasi in un processo di trans-attivazione (Samali, 1999). Le caspasi mediano due importanti funzioni: la maturazione delle citochine e l'apoptosi. Quelle coinvolte nel processo apoptotico possono, a loro volta, essere distinte in iniziatrici ed effettrici.

La caspasi 3, sicuramente la più importante tra le effettrici, è responsabile della proteolisi di molte proteine cruciali nel mantenimento del genoma e nella riparazione del DNA, come pure della proteolisi di varie proteine del citoscheletro (Samali, 1999). Dal momento che la caspasi 3 viene attivata sia nella via intrinseca mitocondriale che in quella estrinseca, un aumento cellulare della sua forma attiva è un chiaro indice di apoptosi.

La valutazione dell'attività della caspasi 3 indotta dall'olio di *Pistacia lentiscus* è stata quindi studiata sulle tre linee cellulari considerando il protocollo standard: 3 ore di esposizione seguite da 21 ore di incubazione in medium normale.

La valutazione dell'attività della caspasi 3 è stata effettuata utilizzando un substrato per le caspasi 3/7 (Z-DEVD-aminoluciferina) ed un buffer contenente luciferasi. La caspasi attiva, se presente, è in grado di tagliare il substrato liberando aminoluciferina che, per azione della luciferasi, genera un segnale luminescente direttamente proporzionale alla quantità di caspasi 3 attiva.

Dopo 21 ore dal termine del trattamento, per le LoVo e le C13* i valori di luminescenza rilevati non si discostano sostanzialmente dal controllo fino alla dose di 140 µg/ml, mentre alla dose di 160 µg/ml si ottiene un notevole aumento di intensità di luminescenza, che raggiunge circa il 150%. Per le 2008 la luminescenza sale, rispetto al controllo, dell'80% già a 140 µg/ml e del 190% alla concentrazione più alta.

Data la complessità della composizione dell'olio ed i diversi meccanismi coinvolti nella sua azione, è stato necessario indagare se nell'attivazione dei processi apoptotici, oltre al coinvolgimento della via intrinseca mitocondriale, fosse coinvolta anche quella estrinseca o recettoriale.

Questa via è mediata da numerosi recettori posti sulla membrana plasmatica (CD95, TRAIL-R e TNF-R) i quali, dopo legame con proteine adattatrici, inducono attivazione della procaspasi 8. Substrati dell'enzima attivato sono Bid e la procaspasi 3 (Hinz, 2000).

La forma attivata di Bid (tBid) media, attraverso l'attivazione di Bax, la formazione di pori di transizione mitocondriale che permettono la fuoriuscita del citocromo C con ulteriore attivazione della caspasi 3 (Adrain, 2001; Hopkins-Donaldson, 2003). Quest'ultima rappresenta così il punto di incontro tra la via intrinseca e quella estrinseca di induzione di morte apoptotica.

L'attività della caspasi 8 è quindi un marker importante per la valutazione del coinvolgimento della via apoptotica estrinseca.

I risultati ottenuti indicano che l'olio non induce l'attivazione dell'enzima caspasi 8 in nessuna delle tre linee cellulari studiate, indipendentemente delle dosi saggate, dimostrando in

Discussione

tal modo che la via estrinseca di attivazione dei meccanismi di morte cellulare programmata non è coinvolta nell'attività dell'olio di *P. lentiscus*.

Considerati nel loro insieme tutti questi risultati dimostrano che l'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* è in grado di attivare i meccanismi di morte cellulare programmata attraverso la via intrinseca, o mitocondriale, mediante aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, alterazione del potenziale della membrana mitocondriale ed attivazione della caspasi 3.

Poiché la linea ovarica *cis*-platino resistente (C13*) è quella che mostra maggiore sensibilità all'effetto dell'olio, probabilmente a causa di un'alterata funzionalità della membrana mitocondriale (Andrews e Albright, 1992), è stata studiata la possibile influenza del co-trattamento *cis*-platino/olio di *P. lentiscus* sull'effetto antiproliferativo del chemioterapico.

Un significativo potenziamento della riduzione della crescita cellulare si ottiene già per co-esposizione alla dose minore di olio, come dimostrato dalla drastica diminuzione dell'IC₅₀ che passa da 387.2 µM a 20.5 µM; l'effetto aumenta poi in modo dose dipendente, con riduzione dell'IC₅₀ del *cis*-platino di ben 2 ordini di grandezza (3.7 µM) per co-esposizione a concentrazioni di olio prossime alla sua IC₅₀ (160 µg/ml)

Nella prima fase di questa tesi è stato dimostrato l'effetto antiproliferativo indotto dall'olio di *Pistacia lentiscus*, per meglio caratterizzare questo effetto lo studio è quindi proseguito analizzando l'influenza del trattamento sulla progressione del ciclo cellulare. Questa analisi è stata eseguita mediante citofluorimetria a flusso per esposizione delle tre linee cellulari tumorali a ioduro di propidio, fluoroforo che si intercala al DNA in modo stechiometrico. La fluorescenza rilevata sarà quindi direttamente proporzionale al contenuto in DNA, permettendo in tal modo di valutare il numero di cellule presenti nelle varie fasi del ciclo.

L'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* è risultato in grado di influenzare in maniera dose dipendente la quantità di cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare. In particolare, i risultati ottenuti trattando le cellule C13* indicano una progressiva diminuzione della percentuale di cellule in fase G₀/G₁, a fronte di un aumento della percentuale di quelle in fase G₂/M. Risultato analogo si ottiene con le cellule LoVo e, anche se in maniera meno evidente, con le cellule 2008. Quindi l'effetto antiproliferativo osservato può essere ascritto anche alla capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di interferire sulla normale progressione del ciclo cellulare.

Lo studio è quindi proseguito valutando l'espressione di una delle proteine che giocano un ruolo fondamentale nella transizione di fase G₂/M, la ciclina B1.

In generale, il ruolo delle cicline è quello di formare un complesso con le chinasi ciclina dipendenti (Cdk) attivandole, permettendo così la fosforilazione di gruppi di proteine essenziali per la transizione tra le varie fasi del ciclo, consentendo alla cellula di attraversare i cosiddetti "checkpoints", o punti di controllo principali: G₀/G₁, S, G₂/M. (Paoletti, 2004).

Le cicline fino ad oggi individuate vengono raggruppate in otto tipi, contrassegnati con lettere da A ad H; per la ciclina B e la ciclina D sono state individuate rispettivamente due e tre diverse forme (B1 e B2; D1, D2, D3). Le cicline B sono sintetizzate nella tarda fase S del ciclo cellulare e inducono l'attivazione della Cdk1, chinasi in grado di iniziare e portare a compimento la mitosi, al termine della quale le cicline B vengono degradate (Paoletti, 2004).

I risultati ottenuti mediante Western blotting indicano come i livelli citoplasmatici di ciclina B1 diminuiscano per tutte e tre le linee cellulari in maniera dose dipendente.

Ancora una volta i risultati più interessanti sono quelli ottenuti con le cellule di origine ovarica, ed in particolare con le C13*. Su questa linea infatti le due dosi maggiori di olio provocano una drastica riduzione dell'espressione di ciclina B1, rispettivamente dell'89 e del 97%. Risultati analoghi, ma meno significativi, si ottengono anche con le cellule LoVo.

Ulteriore approfondimento è stato quello di valutare se l'effetto antiproliferativo poteva essere ascritto anche alla capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di interferire sui normali meccanismi mitotici.

Durante la divisione cellulare i microtubuli concorrono a formare il fuso mitotico, la cui funzione è quella di permettere la migrazione ordinata dei cromosomi omologhi, generati dalla duplicazione del materiale genetico nella fase S del ciclo cellulare, ai due poli opposti della cellula. In seguito alla disorganizzazione del fuso si ha la divisione cellulare completa; per contro, la sua mancata formazione, la sua eccessiva disgregazione o stabilizzazione impediscono la divisione cellulare bloccando il ciclo in fase G₂/M.

L'unità fondamentale dei microtubuli è la tubulina, proteina globulare che nel citoplasma è presente sottoforma di dimeri α/β . Entrambe le isoforme sono in grado di legare il GTP, questo legame aumenta l'affinità per altre tubuline permettendo la polimerizzazione, fenomeno alla base della formazione dei microtubuli. Per contro, quando la subunità β idrolizza il GTP in GDP, si ha depolimerizzazione dei microtubuli. I processi di polimerizzazione e depolimerizzazione avvengono continuamente all'interno della cellula e sono coinvolti in diversi processi come il rimodellamento cellulare e la mitosi (Pasqualino e Panattoni, 2002).

La forma acetilata della tubulina α è il risultato di una modifica post-trasduzionale che permette il mantenimento della struttura dei microtubuli durante il processo mitotico. Per chiarire ulteriormente i meccanismi molecolari coinvolti nella capacità dell'olio di *Pistacia lentiscus* di influenzare il ciclo mitotico è stata quindi studiata la sua espressione citoplasmatica.

I risultati ottenuti mediante Western blotting indicano come l'olio sia in grado di ridurre, rispetto al controllo, l'espressione di tubulina acetilata. In particolare, per le LoVo e le 2008 la diminuzione non risulta dose dipendente, seppur più marcata per le cellule ovariche, ove raggiunge il 60 ed 80% con le due concentrazioni maggiori. Per contro, l'espressione della tubulina acetilata è invece significativamente ridotta nelle cellule C13*; tale effetto, dose dipendente, raggiunge il 90% per la dose maggiore (160 $\mu\text{g/ml}$).

Discussione

Questi ultimi risultati sono ulteriormente confermati dall'analisi mediante tecniche di microscopia confocale.

Gli agenti che interferiscono con la formazione e con la disgregazione del fuso mitotico sono definiti *agenti antimitotici* e tra essi i più importanti sono i Taxani e gli alcaloidi della Vinca. Il Taxolo, ottenuto dalla corteccia del Tasso del Pacifico o *Taxus brevifolia*, si lega alla β -tubulina trasformandola allostericamente in una forma più affine per l' α -tubulina. Si formano quindi microtubuli molto più stabili che non possono essere depolimerizzati durante la telofase stabilizzando così il ciclo in fase G_2/M . La Vincristina, ottenuta originariamente dal fiore di Pervinca (*Vinca Rosea*), legandosi direttamente alla β -tubulina ed impedendone il legame con l'isoforma α , determina la depolimerizzazione dei microtubuli con possibile formazione di filamenti a spirale (Williams e Lemke, 2005).

Indipendentemente dalla linea cellulare utilizzata, il trattamento con Taxolo determina un addensamento di tubulina acetilata decisamente maggiore rispetto al controllo, indice di mancata disagggregazione dei microtubuli indotta dal chemioterapico. Le cellule trattate con Vincristina presentano invece citoscheletro frammentato per depolimerizzazione dei microtubuli e si osservano inoltre filamenti a spirale sulla linea di adenocarcinoma del colon.

Anche in seguito a trattamento con l'olio di *Pistacia lentiscus* in tutte e tre le linee si evidenzia una sostanziale diminuzione di tubulina acetilata rispetto alle cellule di controllo, che presentano una struttura ordinata e organizzata in filamenti tipica dei microtubuli in anafase e, nelle cellule LoVo, la formazione di numerosi filamenti a spirale. I risultati ottenuti indicano quindi che il blocco del ciclo cellulare in fase G_2/M osservato con l'olio di *P. lentiscus* è effettivamente dovuto alla sua interazione con la formazione del fuso mitotico, interazione che avviene con un meccanismo riconducibile più a quello della Vincristina che a quello del Taxolo.

In conclusione, i risultati ottenuti in questi tre anni di dottorato hanno dimostrato che l'olio essenziale di *Pistacia lentiscus* proveniente dal Portogallo è in grado di inibire la crescita sia delle cellule di adenocarcinoma del colon (LoVo) che dell'ovaio (2008 e C13*). Considerati nel loro insieme i risultati ottenuti indicano che i meccanismi coinvolti nel suo effetto antiproliferativo sono da imputare sia alla capacità di attivare la cascata dei meccanismi di morte cellulare programmata, che alla capacità di modificare la permeabilità della membrana cellulare. È stato inoltre dimostrato che l'olio attiva la morte cellulare programmata attraverso la sola via intrinseca, o mitocondriale, mediante blocco della catena respiratoria con aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, alterazione del potenziale della membrana mitocondriale, riduzione della produzione di ATP ed attivazione della caspasi 3.

Inoltre, l'effetto antiproliferativo dell'olio è da ascrivere anche a riduzione dei livelli di ERK fosforilate e blocco della progressione del ciclo cellulare in fase G₂/M da imputare a riduzione citoplasmatica della ciclina B1, a riduzione dell'espressione della tubulina acetilata e a depolimerizzazione del fuso mitotico.

BIBLIOGRAFIA

- Adrain C., Cregg E.M., Martin S.J., Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO Journal*, 20 (23): 6627-6636, 2001.
- Ahn K.J., Lee C.K., Choi E.K., Griffin R., Song C.W., Park H.J., Cytotoxicity of perillyl alcohol cancer cells in potentiated by hyperthermia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 57 (3): 813-819, 2003.
- Alberton F., Bellavite P., *Le medicine complementari. Definizioni, applicazioni, evidenze scientifiche disponibili*. UTET Periodici, 2000.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli editore, 1989.
- Andrews P.A. and Albright K.D., Mitochondrial defects in cis-Diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.*, 52: 1895-1901, 1992.
- Ansari S.H. and Ali M., Analgesic and anti-inflammatory activity of tetracyclic triterpenoids isolated from *Pistacia integerrima* galls. *Fitoterapia*, 68: 103-105, 1996.
- Ariazi E.A., Satomi Y., Ellis M.J., Haag J.D., Shi W., Sattler C.A., Gould M.N., Activation of the transforming growth factor β signaling pathway and induction of cytostasis and apoptosis in mammary carcinomas treated with the anticancer agent perillyl alcohol. *Cancer Res.*, 59: 1917-1928, 1999.
- Ariyoshi T., Arakaki M., Ideguchi K., Kshizuka Y., Noda K. and Ide H., Studies on the metabolism of *d*-limonene (*p*-mentha-1,8-diene). III. Effects of *d*-limonene on the lipids and drug-metabolizing enzyme in rat livers. *Xenobiotica*, 5: 33-38, 1975.
- Austin C.A., Shephard E.A., Pike S.F., Rabin B.R. & Phillips I.R., The effect of terpenoid compound on cytochrome P-450 levels in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2223-2229, 1988.
- Azzoli C.G., Miller V.A., Ng K.K., Krug L.M., Spriggs D.R., Tong W.P., Riedel E.R., Kris M.G., A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 51 (6): 493-498, 2003.
- Bailey H.H., Levy D., Harris L.S., Schink J.C., Foss F., Beatty P., Wadler S. A phase II trial of daily perillyl alcohol in patients with advanced ovarian cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96. *Gynecol. Oncol.*, 85 (3): 464-468, 2002.
- Boelens M.H. e Jemenez R., Chemical composition of the essential oil from the gum and various parts of *Pistacia lentiscus* L. (Mastic Gum Tree). *Flav. Fragr. J.*, 6: 271-275, 1991.
- Buil P., Garnerio J., Guichard G., Contribution à la connaissance de la composition chimique de l'essence de lentisque de Provence. *Riv. Ital. EPPOS Cosmet. Aerosol.*, 56: 245-252, 1975.
- Burke Y.D., Ayoubi A.S., Werner S.R., McFarland B.C., Heilman D.K., Ruggeri B.A., Crowell P.L., Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer Res.*, 22 (6A): 3127-3134, 2002.
- Calabro G. e Curro P., Costituenti degli oli essenziali Nota IV. Essenza di lentisco. *Essence Deriv. Agrum.*, 44: 82-92, 1974.
- Caputo R., Mangoni L., Monaco P. and Palumbo G., Triterpens of galls of *Pistacia terebinthus*: galls produced by *Pemphigus utricularis*. *Phytochemistry*, 14, pp.809-811, 1975.
- Castola V., Bighelli A., Casanova J., Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochem. System. Ecol.*, 28: 79-88, 2000.

Clark S.S., Zhong L., Filiault D., Perman S., Ren Z., Gould M., Yang X., Antileukemia effect of perillyl alcohol in Bcr/Abl-transformed cells indirectly inhibits signalling through Mek in a Ras- and Raf-independent fashion. *Clin. Cancer Res.*, 9 (12): 4494-4504, 2003.

Comelli M., Di Pancrazio F., Mavelli I., Apoptosis is induced by decline of mitochondrial ATP synthesis in erythroleukemia cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 34: 1190-1199, 2003

Conner D. E. and Beuchat L. R., Sensitivity of heat stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 229-233, 1984.

Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi C., *An annotated checklist of the Italian vascular flora*, Palombi Editori, 2005.

Corns C.M., Herbal remedies and clinical biochemistry. *Ann. Clin. Biochem.*, 40 (5) :489-507, 2003.

Costantin C., Tesi di laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche: *Analisi chimica ed effetto citotossico di un olio essenziale di Pistacia lentiscus*, Università degli Studi di Padova, A.A. 2000-2001

Croteau R., Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chem. Rev.*, 87: 929-954, 1987.

Cragg G.M., Newman D.J., Snader K.M., Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, 60: 52-60, 1997.

Cragg G.M. and Newman D.J., Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.*, 17: 153-163, 1999.

Crowell P.L., Elson C.E., Bailey H.H., Elegbede A, Haag J.D., Gould M.N., Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent *d*-limonene. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 35: 31-37, 1994.

Crowell P.L. and Gould M.N., Chemoprevention and therapy of cancer by *d*-limonene. *CRC Crit. Rev. Oncogenesis*, 5: 1-22, 1994.

Crowell P.L., Siar Ayoubi A, Burke Y.D., Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401:131-6, 1996. Review.

Crowell P.L., Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. *J. Nutr.*, 129(3):775S-778S, 1999.

Dal Cortivo S., Tesi di laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche: *Studio dell'attività antiproliferativa di un olio essenziale di Pistacia lentiscus e dei suoi principali componenti su cellule tumorali di derivazione umana*. Università degli Studi di Padova, A.A. 2001-2002.

Dash P., Basic Medical Sciences, St.George's, University of London.
(www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash)

De Flora S., Mechanism of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points. *Carcinogenesis*, 22(7):999-1013, 2001.

De Pooter H.L., Schamp N.M., Aboutabl E.A., Tohamy S.F., Doss S.L., Essential oil of the leaves of three *Pistacia* species grown in Egypt. *Flav. Fragr. J.*, 6: 229-232, 1991.

Direttiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 31 marzo 2004 pubblicata su L126/85 del 30 aprile 2004 concernente la modifica, per quanto riguarda i medicinali tradizionali, della Direttiva 2001/83/CE recante un codice comunitario relative ai medicinali per uso umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* L136/85, 30aprile 2004.

Drewinco B., Romsdhal M.N., Yang L.Y., Ahearn M.J., Trujillo J.M., Establishment of a human CEA producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.*, 36: 467-475, 1976.

- Elegbede J.A., Flores R., Wang R.C., Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in Bro To and A549 cells cultured in vitro. *Life Sci.*, 73 (22): 2831-2840, 2003.
- Elson C.E. and Yu S.G. The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. *J. Nutr.*, 124: 607-614, 1994.
- Ernst E., La Fitoterapia basata sull'evidenza. *Piante Medicinali*, 3 (1): 28-37, 2004.
- Farnsworth N.R., Akerele O, Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z., Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.*, 63: 965-981, 1985.
- Farnsworth N.R., The role of ethnopharmacology in drug development. *Ciba Found Symp.*, 154: 2-11, 1990.
- Fassina G., Ragazzi E., *Lezioni di farmacognosia droghe vegetali*. Casa editrice dott. A. Milani, 1995.
- Filippi M., Tesi di laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche: *Studio dell'attività antiproliferativa di oli essenziali ottenuti dal genere Pistacia*. Università degli Studi di Padova, A.A. 2001-2002.
- Firenzuoli F. and Gori L., Fitoterapia basata sull'evidenza. *Ree. Progr. Med.*, 90 (11): 628, 1999a.
- Firenzuoli F., I rischi delle erbe medicinali. In :*Proceedings of International Conference Safety Evaluation of Complementary and Alternative Medicine*. Empoli, 24-25 ottobre; p. 7-10, 2003b.
- Galluzzi L., Morselli E., Kepp O., Vitale I., Rigoni A., Vacchelli E., Michaud M., Zischka H., Castedo M., Kroemer G., Mitochondrial gateways to cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 31 1–20, 2010.
- Giner-Larza E.M., Máñez S., Giner-Pons R.M., Carmen Recio M., Ríos J.L., On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A₂ activity of extract from lanostane-rich species. *J. Ethnopharmacol.*, 73: 61-69, 2000.
- Haag J.D. and Gould M.N., Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34: 477-483, 1994.
- Gola G., Negri G., Cappelletti C., *Trattato di botanica*. UTET, 1946.
- Hickman J.A., Apoptosis induced by anticancer drugs, *Cancer Metastasis Rev.*, 11: 121-139, 1992.
- Hinz S., Trauzold A., Boenicke L., Sandberg C., Beckmann S., Bayer E., Walczak H., Kalthoff H., Ungefroren H., Bcl X_L protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, 19: 5477-5486, 2000.
- Hopkins-Donaldson S., Cathomas R., Simões-Wüst A.P., Kurtz S., Belyanskya L., Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U., Induction of apoptosis and chemosensitization of mesothelioma cells by Bcl-2 and Bcl xL antisense treatment. *Int. J. Cancer*, 106: 160-166, 2003.
- Hudes G.R., Szarka C.E., Adams A., Ranganathan S., McCauley R.A., Weiner L.M., Langer C.J. Litwin S., Yeslow G., Halber T., Qian M., Gallo J.M., Phase I pharmacokinetic trial of perillyl alcohol (NSC 641066) in patients with refractory solid malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 6: 3071-3080, 2000.
- Hursting S.D., Perkins S.N., Haines D.C., Ward J.M., Phang J.M., Chemoprevention of spontaneous tumorigenesis in p53-knockout mice. *Cancer Res.*, 55: 3949-3953, 1995.
- Huwez F. U., Thorwell D., Cockayne A., Ala'Aldeen D.A., Mastic Gum Kills Helicobacter pylori. *N. Engl. J. Med.*, 339(26): 365, 1998.
- Izyumov D.S., Avetisyan A.V., Pletjushkina O.Y., Sakharov D.V., Wirtz K.W., Chernyak B.V., Skulachev V.P., "Wages of Fear": transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis. *Biochim. Biophys Acta*, 1658 141–147, 2004.

Katsiotis S. and Oikonomou N.G., Qualitative and quantitative GLC analysis of the Ae-theroleum mastics from different districts of the Chios Island. *Pharm. Delt. Epistem. Ekdosis*, 10: 17-28, 1984.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257, 1972.

Kim B.C., Kim H.G., Lee S.A., Lim S., Park E.H., Kim S.J., Lim C.J., Genipin-induced apoptosis in hepatome cells is mediated by reactive oxygen species/c-Jun NH₂-terminal kinase-dependent activation of mitochondrial pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 70: 1398-1407, 2005.

Kraft M., Spahn T.W., Menzel J., Senninger N., Dietl K.H., Herbst H., Domschke W., Lerch M.M., Fulminant liver failure after administration of herbal antidepressant Kava. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 126: 970-2, 2001.

Lenaz G., La catena respiratoria mitocondriale come meccanismo per la conservazione dell'energia e fonte di radicali dell'ossigeno. Abstract da congresso *Alla scoperta del mitocondrio*, Bologna, 2005. (www.immunologia.unibo.it/mito/abstrct/lenaz.htm)

Liston B.W., Nines R., Carlton P.S., Gupta A., Aziz R., Frankel W., Stoner G.D., Perillyl alcohol as a chemopreventive agent in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Cancer Res.*, 63 (10): 2399-2403, 2003.

Liu G., Oettel K., Bailey H., Ummersen L.V., Tutsch K., Staab M.J., Horvath D., Alberti D., Arzoomaniam R., Rezazadeh H., McGovern J., Robinson E., DeMets D., Wilding G., Phase II trial of perillyl alcohol (NSC 641066) administered daily in patients with metastatic androgen independent prostate cancer. *Invest. New Drugs*, 21 (3): 367-372, 2003.

Lluria-Prevatt M., Morreale J., Gregus J., Alberts D.S., Kaper F., Giacca A., Powell M.B., Effects of perillyl alcohol on melanoma in the TP ras mouse model. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 11 (6): 573-579, 2002.

Lu X.G., Feng B.A., Zhan L.B., Yu Z.H., d-limonene induces apoptosis of gastric cancer cells. *Zhonghua Zhongliu Zazhi*, 25 (4): 325-7, 2003.

Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A.L., Chinou I.B., Mitaku S., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. *Planta Med.*, 65(8): 749-752, 1999.

Naik R.G., Kattige S.L., Bhat S.V., Alreja B., de Souza N.J., Rupp R.H., An anti-inflammatory cum immunomodulatory piperinylbenzopyranone from *Dysoxylum binectariferum*: isolation structure and total synthesis. *Tetrahedron*, 44: 2081-2086, 1988.

Maltzman T.H., Christou M., Gould M.N. and Jefcoate C. R., Effects of monoterpenoids on *in vivo* DMBA-DNA adduct formation and on phase I hepatic metabolizing enzymes. *Carcinogenesis*, 12: 2081-2090, 1991.

Martinez-Ruiz G., Maldonado V., Ceballos-Cancino G., Reyes-Grajeda J.P., Melendez-Zajgla J., Role of Smac/Diablo in cancer progression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 27: 48, 2008.

Marverti G., Andrews P.A., Stimulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation by modulation of passive permeability with genistein: an altered response in accumulation-defective resistant cells. *Clin. Cancer Res.*, 2(6):991-9,1996.

Masseri E., *Erbe in Cina. Panoramica e raffronto con le erbe europee*. Edizioni scientifiche internazionali, Milano-Roma, 1981.

Mills J.J., Chiari R.S., Boyer I.J., Gould M.N., Jirtle R.L., Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Res.*, 55: 979-983, 1995.

- Morgan-Meadows S.M., Mulkerin D., Berlin J., Bailey H., Kolesar J., Warren D., Thomas J.P., Phase II trial of perillyl alcohol in patients with metastatic colorectal cancer. *Int. J. Gastrointest. Cancer*, 32 (2-3): 125-128, 2002.
- Morgan-Meadows S.M., Dubey S., Gould M., Tutsch K., Marnocha R., Arzoomanin R., Alberti D., Binger K., Feierabend C., Volkman J., Ellingen S., Black S., Pomplun M., Wilding G., Bailey H., Phase I trial of perillyl alcohol administered four times daily continuously. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52 (5): 361-366, 2003.
- Mossmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.*, 65: 55, 1983.
- Mukherjee A.K., Basu S., Sarkar N., Ghosh A.C., Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.*, 8 (12): 1467-1486, 2001.
- Murren J.R., Pizzorno G., DiStasio S.A., McKeon A., Peccerillo L., Gollerkari A., McMurray W., Burtness B.A., Rutherford T., Li X., Ho P.T., Sartorelli A., Phase I study of perillyl alcohol in patients with refractory malignancies. *Cancer Biol. Ther.*, 1 (2): 130-135, 2002.
- National Toxicology Program (N.P.T.), Toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene in F-344/N rats and B6C3F1 mice (Gavage Study), N.T.P. TR 347. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1990.
- Neuzil J., Wang X.F., Dong L.F., Low P., Ralph S.J., Molecular mechanism of 'mitocan'-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple role of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. *FEBS Letters*, 580: 5125-5129, 2006.
- Nie F., Zhang X., Qi Q., Yang L., Yang Y., Liu W., Lu N., Wu Z., You Q., Guo Q., Reactive oxygen species accumulation contributes to gambogic acid-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *Toxicology*, 260: 60-67, 2009.
- Orrenius S., Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab. Rev.*, 39(2-3):443-55, 2007.
- Paoletti R., Nicosia S., Clementi F., Fumagalli G., *Farmacologia generale e molecolare*. Terza edizione, UTET, 2004.
- Papageorgiou V.P., Sagredos A.N., Moser R., GLC-MS computer analysis of the essential oil of mastic gum. *Chim. Chronica, New Ser.*, 10: 119-124, 1981.
- Pasqualino A., Panattoni G.L., *Anatomia umana*. UTET, Torino, 2002.
- Parafitt D.E. and Badenes M.L., Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 7987-7992, 1997.
- Pedretti M., *Chimica e farmacologia delle piante medicinali*. Erboristeria domani libri, Milano, 1983.
- Penso G., *Piante medicinali nella terapia medica*. OEMF, Milano, 1987.
- Pignatti S., *Flora d'Italia*, Edagricole, 2003.
- Poon G.K., Vigushin D., Griggs L.J., Rowlands M.G., Coombes R.C., Jarman M., Identification and characterization of limonene metabolites in patients with advanced cancer by liquid chromatography/mass spectrometry. *Drug Metabol. Dispos.*, 24 (5): 565-571, 1996.
- Rajesh D., Howard S.P., Perillyl alcohol mediated radiosensitization via augmentation of the Fas pathway in prostate cancer cells. *Prostate*, 57 (1): 14-23, 2003a.
- Rajesh D., Stenzel R.A., Howard S.P., Perillyl alcohol as a radio/chemosensitizer in malignant glioma. *J. Biol. Chem.*, 278 (38): 35968-35978, 2003b.

- Ralph S.J., Neuzil J., Mitochondria as targets for cancer therapy. *Mol. Nutr. Food Res*, 53(1):9-28, 2009.
- Ripple G.H., Gould M.N., Arzoomanian R.Z., Alberti D., Feierabend C., Simon K., Binger K., Tutsch K.D., Pomplun M., Wahamaki A., Marnocha R., Wilding G., Bailey H.H., Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. *Clin. Cancer Res.*, 6: 390-396; 2000.
- Rossi M., Tinture madri in fitoterapia. *Studio*, Milano, 1995.
- Samali A., Cai J., Zhivotovsky B., Jones D.P., Orrenius S., Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *The EMBO Journal*, 18 (8): 2040-2048, 1999.
- Sanz M.J., Terencio M.C., Pay M., In vivo hypotensive activity of *Pistacia lentiscus L.*, *Phytother. Res.*, 2(4): 201-203, 1988.
- Satomi Y., Miyamoto S., Gould M.N., Induction of AP-1 activity by perillyl alcohol in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 20 (10): 1957-1961, 1999.
- Scurbis B. and Markakis P., Essential oil of mastic gum. *Int. Flavours Food Addit.*, 6: 349, 1975.
- Shi W., Gould M.N., Induction of cytostasis in mammary carcinoma cells treated with the anticancer agent perillyl alcohol. *Carcinogenesis*, 23 (1): 131-142, 2002.
- Shoff S.M., Grummer M., Yatvin M. B., Elson C.E., Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol. *Cancer Res.*, 51: 37-42, 1991.
- Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F., Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5: 415-418, 2000.
- Stark M.J., Burke YD, McKinzie J.H., Ayoubi A.S., Crowell P.L., Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. *Cancer Lett.*, 96(1): 15-21, 1995.
- Tallarida R.J. and Murray R.B., Manual of pharmacological calculations with computer program. *Springer-Verlag*, 1987.
- Valtriani C. and Hurle C., Citometria a flusso: Aspetti generali con riferimento particolare allo studio di alcune malattie ematologiche. *Caleidoscopio Italiano*, n. 113, 1997.
- van Engeland M, Ramaekers F.C., Schutte B, Reutelingsperger C.P., A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*, 1;24(2):131-9, 1996.
- Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein Annexin V. *J. Immunol. Meth.*, 184: 39-51, 1995.
- Vigushin D.M., Poon G.K., Boddy A., English J., Halbert G.W., Pagonis C., Jarman M., Coombes R.C., Phase I and pharmacokinetic study of *d*-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 42 (2): 111-117, 1998.
- Weiss R., *Trattato di fitoterapia*. Aporie, Roma, 1996.
- Williams D.A., Lemke T.L., Dall'Acqua F., Caffieri S., *Foye's principi di chimica farmaceutica*. Piccin, Padova, 2005.
- Wyllie S.G., Brophy J.J., Sarafis V., Hobbs M., Volatile components of the fruits of *Pistacia lentiscus*. *J. Food Sci.*, 55: 1325-1326, 1990.
- Yu P.G., Hildebrandt L.A., Elson C.E., Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. *J. Nutr.*, 125: 2763-2767, 1995.