



Università degli Studi della Calabria

Dottorato di ricerca in
“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare”
XX Ciclo

**Caratterizzazione della citotossicità indotta dall'Olio
Essenziale di Bergamotto (*Citrus Bergamia, Risso*)
in colture di neuroblastoma umano ed identificazione dei
componenti responsabili**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14 Farmacologia

Coordinatore
Chiar.mo Prof.
Giacinto Bagetta

Relatore
Chiar.ma Prof.ssa
Maria Tiziana Corasaniti

Dottoranda
Dott.ssa Simona Maida

Anno Accademico 2007/2008

Indice

Sommario.....	1
1. Introduzione	4
1.1 Caratteristiche botaniche del bergamotto	4
1.2 Estrazione dell'olio essenziale di bergamotto	7
1.3 Composizione chimica dell'olio essenziale di bergamotto	9
1.4 Proprietà farmacologiche dell'olio essenziale di bergamotto.....	21
1.5 Proprietà farmacologiche dei composti maggiormente rappresentati dell'olio essenziale di bergamotto	24
1.6 Usi dell'olio essenziale di bergamotto.....	37
2 Scopo della tesi	40
3. Materiali e metodi	42
3.1 Colture cellulari e trattamenti	43
3.2 Studi di citotossicità.....	43
3.2.1 Test di esclusione al <i>trypan blue</i>	43
3.2.2 Saggio MTT.....	45
3.3 Analisi citofluorimetrica	46
3.3.1 Test di vitalità FDA/PI.....	49
3.3.2 Analisi del ciclo cellulare e dell'ipodiploidia.....	51
3.3.3 Colture cellulari per analisi citofluorimetrica.....	55
3.3.4 Raccolta delle cellule	55
3.3.5 Marcatura cellulare con FDA/PI.....	55
3.3.6 Marcatura con PI per l'analisi del ciclo cellulare.....	56
3.4. Analisi dei dati.....	56
4. Risultati	60
4.1 Caratterizzazione degli effetti citotossici indotti dall'olio essenziale di bergamotto (BEO) nelle colture SH-SY5Y	60
4.2 Effetti citotossici delle frazioni del BEO in colture SH-SY5Y	70
4.2.1. Citotossicità dell'olio essenziale di bergamotto priva di bergaptene (BEO-BF) in colture di SH-SY5Y.....	70
4.2.2 Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in colture di SH-SY5Y esposte al BEO-BF ...	74
4.2.3 Effetti citotossici del BEO-BF/HF in colture di SH-SY5Y.....	76
4.3. Effetti di alcuni componenti del BEO sull'ipodiploidia e sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in cellule SH-SY5Y	79
4.3.1 Bergaptene o 5-MOP	79
4.3.2 Effetti dei monoterpeni idrocarburi sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare e sull'ipodiploidia in colture SH-SY5Y	82
4.3.3. Citotossicità dei terpeni ossigenati presenti nel BEO.....	87
4.3.4 Sinergismo tra i componenti del BEO	90
4.4. Effetti citotossici del BEO in colture di cellule HeLa	94

5. Discussione.....	97
6 Parte speciale: Metodi di indagine sperimentale acquisiti durante lo stage formativo	112
BIBLIOGRAFIA	125
Produzione scientifica.....	146

Sommario

Nel presente lavoro di tesi sono stati indagati gli effetti dell'olio essenziale di bergamotto (*Citrus bergamia*, Risso) in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y.

Lo studio è stato rivolto alla caratterizzazione della citotossicità indotta dal BEO ed all'identificazione del/dei principio/i responsabile/i.

L'olio essenziale di bergamotto (BEO) induce morte cellulare quando impiegato a concentrazioni superiori allo 0,01%. La morte cellulare sembra essere di tipo necrotico.

La frazione deprivata del bergaptene riproduce lo stesso effetto del BEO alle concentrazioni 0,02%-0,04% mentre l'esposizione al solo bergaptene alle concentrazioni corrispondenti a quelle presenti nel fitocomplesso, non causa morte cellulare.

La frazione dell'olio deprivata del bergaptene e dei monoterpeni idrocarburi, ma contenente un'elevata percentuale di monoterpeni ossigenati, non riproduce l'effetto del fitocomplesso.

Tuttavia, nessuno dei monoterpeni idrocarburi più rappresentati nella frazione volatile (limonene, β -pinene e γ -terpinene), esplica lo stesso effetto citotossico osservato con il fitocomplesso.

I dati ottenuti dimostrano che l'olio essenziale di bergamotto causa morte cellulare e che tale effetto è dovuto all'interazione di due composti i quali verosimilmente attraverso meccanismi d'azione differenti, sinergizzano per determinare morte cellulare.

Nella parte finale del corso di Dottorato di Ricerca, durante lo stage formativo al Medical Research Council (MRC) di Leicester, Inghilterra, è stato effettuato un lavoro di caratterizzazione del tipo di morte indotto dal 2-Naphthylvinylketone (2-NVK) sulla linea cellulare di leucemia Jurkat T clone E.6.1., sulla base di risultati precedentemente ottenuti su colture di cellule tumorali di leucemia cronica (CLL) esposte al 2-NVK. Dallo studio è emerso che il 2-NVK, un inibitore della Janus chinasi, determina morte cellulare per apoptosi delle colture di Jurkat, in maniera caspasi-dipendente quando impiegato per 4 ore alla concentrazione 10 μ M. A concentrazioni pari a 30 μ M, il 2-NVK determina un tipo di morte che presenta le caratteristiche sia dell'apoptosi che della necrosi, come risulta dallo studio dell'esposizione dei residui di fosfatidilserina, dal potenziale di membrana mitocondriale, dall'espressione dell'attivazione della caspasi. Alla concentrazione pari a 100 μ M, il 2-NVK determina morte cellulare per necrosi.

Poichè in letteratura è riportato che le calpaine sono le proteasi principalmente coinvolte nella morte eccitotossica (Seubert et al., 1989) e che esse clivano la proforma della caspasi-3 producendo un frammento di 29 kda (Blomgreen et al., 2001), è stato indagato il ruolo di queste proteasi utilizzando come modello colture di cellule di tumore umano della cervice uterina HeLa sovra esprimenti la calpastatina ed esposte al 2-NVK. Dallo studio effettuato non è emersa alcuna reversione della degradazione della proforma della caspasi-3 indotta dal 2-NVK nelle colture di HeLa escludendo le calpaine come uniche proteasi responsabili del processo di morte. Esperimenti preliminari sono stati condotti eseguendo una zimografia in cui, lisati di cellule HeLa non transfettate, esposte al 2-NVK, sono stati caricati su gel di acrilamide copolimerizzata con caseina, substrato delle calpaine. L'esperimento ha permesso di identificare delle proteasi calcio dipendenti non corrispondenti alle calpaine ricombinanti

utilizzate come controllo positivo, che potrebbero riferirsi, probabilmente, a calpaine mutate, recanti sequenze amminoacidiche diverse da quelle specifiche per gli inibitori e, per tale ragione, non riconosciute da essi.

Introduzione

1.1. Caratteristiche botaniche del bergamotto.

Il bergamotto (*Citrus bergamia*, *Risso*) è un agrume appartenente alla famiglia delle *Rutacee*, genere *Citrus*, che cresce in maniera pressochè esclusiva nella striscia di costa calabrese compresa tra Villa San Giovanni e Gioiosa Jonica.

L'albero di bergamotto non supera normalmente i tre metri di altezza e si presenta con una struttura di modesto vigore. Le foglie sono grandi, oblunghe, molto scure e glabre mentre i fiori, chiamate *zagare*, sono bianchi e profumatissimi e possono essere sia ascellari che terminali, ma sempre riuniti in gruppi.

Il frutto, profumatissimo, appare rotondeggiante o piriforme, di un colore che va dal verde al giallo secondo il grado di maturazione, con un peso che varia tra gli 80 e i 200 grammi. Come tutti gli alberi appartenenti al genere *Citrus*, il frutto è una bacca modificata detta "esperidio", caratterizzata da una parte esterna (esocarpo o epicarpo) di notevole spessore e ricca di ghiandole (otricoli) contenenti l'olio essenziale; la parte direttamente saldata all'esocarpo è detta mesocarpo ed appare bianca e spugnosa, mentre la parte più interna (endocarpo), suddivisa in logge o spicchi per mezzo di sottili membrane, costituisce la vera polpa del frutto ripiena di una soluzione acquosa di zuccheri ed acidi. Di norma, il numero degli spicchi varia dai dodici ai quindici. I semi, di colore biancastro e di forma ovoidale, contengono diversi embrioni di cui però solo uno ha origine dalla fecondazione mentre i restanti presentano un patrimonio cromosomico identico a quello della pianta madre.

Un'immagine rappresentativa delle caratteristiche botaniche della pianta è indicata in figura 1.1.



Fig.1.1 *Citrus Bergamia*

La specie coltivata in Calabria è la *Vulgaris* distinta in tre cultivar ovvero, *Femminello*, *Castagnaro* e *Fantastico* che si distinguono in base alla morfologia e della pianta che del frutto. In particolare:

1. *Femminello*: l'albero ha rami esili con un rapido e precoce accrescimento, è molto produttivo, ma, poiché necessita di un ricca composizione minerale del terreno in cui vive, risulta essere poco longevo. Le sue foglie sono poco sviluppate e di forma lanceolata. Il frutto è sferico, a buccia sottile.
2. *Castagnaro*: si differenzia dalla *Femminello* in quanto ha fronde più vigorose e frutti meno sferici dall'aspetto rugoso; le sue foglie sono grandi e di forma lanceolata. Il frutto è globoso con una buccia di medio spessore.

3. *Fantastico*: l'albero è di rapido sviluppo e presenta un'elevata produzione; le sue foglie sono più grandi di quelle delle altre cultivar sopra descritte, il suo frutto è particolarmente rugoso.

Quest' ultima cultivar rappresenta circa l'80% delle piante di bergamotto coltivate in Calabria ed è caratterizzata da una resa elevata e da un'ottima qualità di olio essenziale.

Anche se piante di bergamotto sono coltivate in regioni dell'Africa, è in Calabria che la pianta dà il meglio dei suoi frutti poiché è in questa regione che sono soddisfatte le esigenze indispensabili alla sopravvivenza del bergamotto.

La pianta cresce bene nei terreni alluvionali e argilloso-calcarei (con un pH compreso tra 6,5 e 7,5), meglio se ubicati in zone collinari e ben soleggiate, che consentono di ottenere una maggiore resa in olio essenziale. Una temperatura compresa tra i 13-30°C insieme a frequenti irrigazioni consente una crescita ottimale per la pianta. Il bergamotto si riproduce per innesto e attualmente il portainnesto più usato è l'arancio amaro che dà luogo ad alberi robusti, longevi e resistenti alle avversità; la preferenza dell'innesto alla riproduzione per semi è dovuta all'esigenza di evitare l'insorgenza di alcune fitopatie che colpiscono facilmente l'apparato radicale della pianta (Crispo & Dugo, 2003).

1.2. Estrazione dell'olio essenziale di bergamotto.

L'estrazione dell'olio essenziale di bergamotto in Calabria ebbe inizio intorno alla metà del XVII secolo e fu a lungo effettuata esclusivamente con il processo manuale "a spugna" consistente nel tagliare i frutti a metà, nel cavare la polpa con un rastrello e comprimere quindi, con movimento rotatorio della mano, la scorza contro una spugna naturale in modo da far sprizzare dagli otricoli l'essenza.

Dalle spugne l'olio essenziale, insieme al liquido delle scorze veniva spremuto in una "concolina" e separato per decantazione.

La prima macchina operativa nell'estrazione dell'olio essenziale fu la "macchina calabrese" messa a punto da Nicola Barillà nel 1840.

Il fulcro lavorativo della macchina era costituito, molto semplicemente, da due scodelle di zinco denominate "coppe", che richiamavano la "scodella", un sistema di estrazione originario del sud della Francia. La coppa inferiore era fissa e munita di punte sul fondo e di denti sulle pareti, mentre la coppa superiore era costituita da lamelle radiali; entrambe ruotavano attorno ad un asse verticale pressando i frutti. Il liquido così ottenuto, costituito non solo da olio essenziale ma anche da detriti solidi ed acqua, passava per gravità in un recipiente posto al di sotto della coppa inferiore.

Al termine si sollevava la coppa superiore e si sostituivano i frutti estratti con altri (da sei a dodici bergamotti), possibilmente scelti di misura uniforme. L'olio veniva separato dal resto della miscela per decantazione, ed inoltre una parte dell'olio veniva recuperata per filtrazione dei detriti solidi versati in appositi saccotti di lana.

La qualità dell'olio essenziale ottenuto era ottima, ma la resa piuttosto scarsa dal momento che la macchina lavorava circa un quintale di frutti per ora. La macchina calabrese fu poi sostituita dalle "macchine pelatrici" tuttora in uso.

Quest'ultime prevedono tre operazioni fondamentali:

- a) l'abrasione della superficie dei frutti per provocare la rottura degli otricoli e la fuoriuscita dell'olio essenziale;
- b) il trascinamento dell'olio essenziale misto ad acqua;
- c) la separazione dell'olio puro dall'acqua mediante centrifugazione;

La macchina pelatrice "Moscato" è quella oggi maggiormente utilizzata negli impianti del Consorzio del Bergamotto di Reggio Calabria ed ha una capacità lavorativa di circa venti quintali di bergamotti all'ora.

Risulta interessante conoscere che oltre all'olio puro, ottenuto attraverso due centrifugazioni consecutive, si recuperano altre piccole quantità di olio dai residui del processo di estrazione.

Più in particolare:

- dalla pulizia dei dischi della macchina si ottiene lo 0.5% della resa totale in seguito a decantazione dei residui liquidi ed a centrifugazione dei residui solidi;
- dalla pressione dei residui solidi, mediante torchietti idraulici, si ottiene il 3.5% della resa totale;
- dal riciclo e centrifugazione spinta delle acque di lavorazione si recupera l'1%;
- dalla distillazione a pressione atmosferica degli scarichi espulsi dal separatore si ottiene fino al 3% della resa totale in olio (Crispo & Dugo, 2003).

A causa delle richieste di mercato imposte dall'industria cosmetica, gli oli essenziali, vengono privati di costituenti come il bergaptene e i monoterpeni idrocarburi. La deprivazione dell'olio di Bergamotto dal bergaptene viene effettuata attraverso l'iniziale miscelazione di una

quantità di essenza naturale con una quantità doppia di soluzione alcalina. Dopo agitazione in un serbatoio di acciaio inox, per circa 6-7 ore, si centrifuga per eliminare il bergaptene precipitato. L'essenza deprivata del bergaptene, viene sottoposta a 2-3 lavaggi con una quantità doppia di acqua, e, successivamente, l'essenza viene centrifugata per eliminare le tracce di idrossido di sodio presenti.

La deterpenazione, ovvero la deprivazione dei monoterpeni idrocarburi e dei sesquiterpeni degli oli essenziali viene effettuata per distillazione frazionata sotto vuoto spinto. Tale processo determina la concentrazione iniziale degli oli essenziali fino a 5 volte l'essenza originale. Altri sistemi di preparazione di sostanze deterpenate concentrate sfruttano le proprietà di alcuni solventi di solubilizzare i costituenti ossigenati e lasciare insolubilizzati i costituenti monoterpenici.

1.3. Composizione chimica dell'olio essenziale di bergamotto

L'olio essenziale di bergamotto si presenta come un liquido limpido di colore giallo-verde, chimicamente composto da una frazione volatile (circa il 93-96%) ed un residuo non volatile (rimanente 4-7%). La frazione volatile è costituita chimicamente da idrocarburi monoterpenici e sesquiterpenici e dai loro derivati ossigenati: esteri ed alcoli monoterpenici; sono inoltre presenti, in piccole quantità, composti carbonilici a catena lineare (Verzera et al., 1996).

La struttura chimica dei terpeni è basata su uno scheletro a 5 atomi di carbonio (unità isoprenica); il numero delle unità isopreniche presenti nella struttura principale della molecola, dà luogo alla classificazione di questi composti. I derivati ossigenati dei terpeni (esteri ed alcoli) presentano la stessa struttura chimica degli idrocarburi terpenici ma presentano in più, rispettivamente, il gruppo carbonilico (=O) ed il gruppo ossidrilico (OH).

Le tecniche analitiche cromatografiche più avanzate, hanno fornito informazioni preziose circa la composizione dell'olio essenziale di bergamotto, fra queste:

- HRGC → gas-cromatografia ad alta risoluzione;
- HRGC/MS → gas-cromatografia ad alta risoluzione associata alla spettrometria di massa;
- HRGC/ HRGC → gas-cromatografia multidimensionale;
- HPLC → cromatografia liquida ad alta prestazione;

L'analisi della frazione volatile, condotta con la gas-cromatografia ad alta risoluzione accoppiata alla spettrometria di massa (HRGC/MS), ha permesso di separare i numerosi composti presenti, spesso chimicamente molto simili tra loro, o presenti solo in tracce. In particolare, l'applicazione di tale tecnica ha permesso di identificare la presenza, nell'olio di bergamotto estratto a freddo, di 78 componenti, come documentato dal cromatogramma riportato nella figura 1.2.

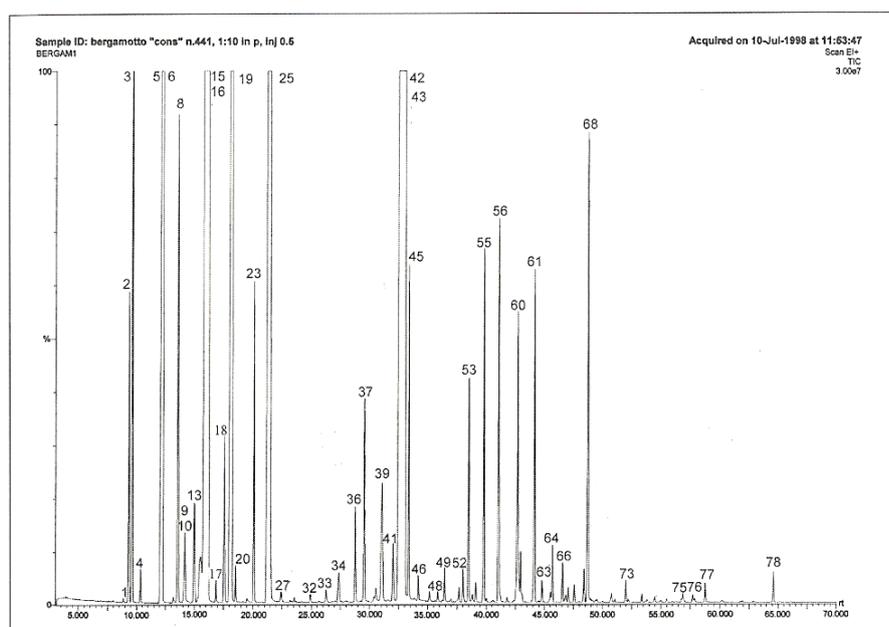


Figura 1.2 Cromatogramma della frazione volatile dell'olio essenziale di Bergamotto estratto a freddo (Da Verzera et al., 2003).

Nella parte iniziale del cromatogramma sono presenti i picchi relativi agli idrocarburi monoterpenici, nella parte centrale quelli della maggior parte dei composti ossigenati e nella parte finale i picchi degli idrocarburi sesquiterpenici e degli alcoli sesquiterpenici (Verzera et al., 2003).

Riportando la percentuale dell'area del picco di ogni componente rispetto al totale, è stato possibile ottenere informazioni quantitative relativamente ai singoli componenti identificati.

In base a questi studi cromatografici gli idrocarburi monoterpenici costituiscono dal 38.7 al 70.5% della frazione volatile, gli esteri dal 22.8 al 42.2% e gli alcoli dal 3.8 al 22.8%; i composti carbonilici e gli idrocarburi sesquiterpenici sono invece poco rappresentati (Verzera et al., 2003). Nella tabella 1.1 sono riportati i valori minimi e massimi dei singoli componenti e delle classi di sostanze identificate in diversi campioni di olio essenziale di bergamotto.

La composizione quantitativa della frazione volatile dell'olio di bergamotto è estremamente variabile: ciascun componente, infatti, oscilla entro intervalli anche ampi. Ciò è dovuto a diversi fattori tra cui il periodo di produzione, la cultivar di appartenenza dei frutti, l'area di provenienza dei frutti e la tecnologia di estrazione.

Per esaminare singolarmente l'influenza delle variabili sopra elencate sulle caratteristiche dell'olio, sono stati presi in considerazione tre composti quantitativamente più rappresentati nella frazione volatile:

- a) il limonene (25,3-45,4%)
- b) il linalile acetato (21,8-41,4%)
- c) il linalolo (3,6-22,7%)

Nella figura 1.3 sono rappresentate le formule chimiche del limonene (A), del linalile acetato (B) e del linalolo (C).

	min	max			
1) triciclene	tr	tr	47) indolo	tr	0.01
2) a-tuiene	0.19	0.46	48) undecanale	tr	0.02
3) a-pinene	0.72	1.76	49) nonile acetato	0.01	0.03
4) canfene	0.02	0.05	50) metilgeranoato	tr	0.01
5) sabinene ←	4.81	12.69	51) linalile propionato	0.02	0.06
6) β-pinene			tr	0.01	
7) 6-metil-5-epten-2-one	tr	0.01	53) α-terpenile acetato	0.07	0.22
8) mircene	0.63	1.23	54) citronellile acetato	0.01	0.03
9) ottanale	0.03	0.08	55) nerile acetato	0.13	0.64
10) α-fellandrene	0.02	0.04	56) geranile acetato	0.11	0.51
11) esile acetato	tr	tr	57) dodecanale	0.02	0.05
12) δ-3-carene	tr	tr	58) decile acetato	0.01	0.03
13) α-terpinene	0.10	0.24	59) <i>cis</i> -α-bergamottene	0.02	0.05
14) <i>p</i> -cimene ↘	0.01	0.72	60) β-cariofillene	0.15	0.43
15) limonene + β-fellandrene	25.38	45.41	61) <i>trans</i> -α-bergamottene	0.16	0.36
16) 1.8-cineolo	0.01	0.02	62) α-umulene	0.01	0.04
17) (Z) -β-ocimene	0.01	0.05	63) <i>cis</i> -β-farnesene	0.03	0.09
18) (E) -β-ocimene	0.17	0.32	64) β-santalene	tr	0.02
19) γ-terpinene ←	5.27	11.15	65) dodecanolo	-	tr
20) <i>cis</i> -sabinene idrato	0.01	0.05	66) germacrene D	0.03	0.11
21) ottanolo	tr	0.01	67) biciclogermacrene	0.01	0.04
22) <i>cis</i> -linalolo ossido	tr	tr	68) (Z)-α-bisabolene	tr	tr
23) terpinolene	0.22	0.45	69) (E,E) -α-farnesene	tr	tr
24) <i>trans</i> -linalolo ossido	tr	tr	70) β-bisabolene	0.21	0.51
25) linalolo ←	3.63	22.68	71) <i>cis</i> -γ-bisabolene	tr	0.01
26) nonanale	0.02	0.06	72) germacrene B	tr	0.01
27) eptile acetato	tr	0.02	73) (E)-nerolidolo	0.01	0.03
28) <i>cis</i> -limonene ossido	tr	tr	74) tetradecanale	-	tr
29) <i>trans</i> -limonene ossido	tr	tr	75) 2,3-dimetil-3-		
30) isopulegolo	tr	tr	(4-metil-3-pentenil)		
31) canfora	tr	0.01	-2-norbornanolo	0.01	0.02
32) citronellale	tr	0.02	76) canferenolo	0.01	0.02
33) terpinen-4-olo	0.01	0.03	77) α-bisabololo	0.01	0.02
34) α-terpineolo	0.04	0.13	78) nootkatone	0.01	0.09
35) dodecano	tr	0.01			
36) decanale	0.05	0.10	Idrocarburi	39.81	71.48
37) ottile acetato	0.07	0.20	Monoterpeni	38.75	70.48
38) nerolo + citronellolo	0.02	0.08	Sesquiterpeni	0.68	1.44
39) nerale	0.10	0.28	Composti ossigenati	28.43	59.84
40) carvone	tr	tr	Composti carbonilici	0.58	1.07
41) <i>trans</i> -sabinene idrato acetato	0.05	0.10	Alcoli	3.81	22.85
42) linalile acetato ←	21.84	41.36	Esteri	22.80	42.21
43) geraniolo	tr	tr			
44) 2-decen-1-ale	tr	0.01	linalolo/linalile acetato	0.16	0.50
45) geraniale + perillaldeide	0.20	0.44			
46) bornile acetato	0.01	0.02	tr= <0.01		

Tabella 1.1 Valori minimi e massimi dei singoli componenti e delle classi di sostanze identificate in diversi campioni di olio essenziale di bergamotto (Da Verzera et al., 2003)

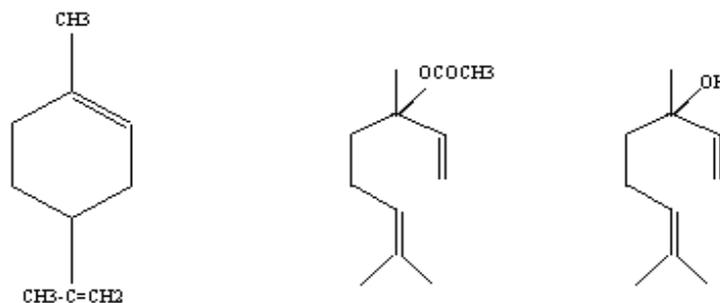


Figura 1.3 A) limonene; B) linalile acetato; C) linalolo

Il linalolo ed il linalile acetato caratterizzano le note olfattive dell'olio ed il loro contenuto è considerato un indice di qualità del prodotto; infatti, un basso rapporto linalolo/linalile acetato è considerato un indice di buona qualità per l'essenza dell'olio di bergamotto (Statti et al., 2004).

Il tempo di maturazione dei frutti è senz'altro un fattore importante di variabilità chimica compositiva.

Questo fenomeno è particolarmente evidente per il linalolo ed il linalile acetato come si può evincere dalla figura 1.4 che riporta il contenuto medio di linalolo e linalile acetato durante una stagione produttiva, divisa per quindicine, dal 1 dicembre al 15 marzo (Verzera et al., 2003).

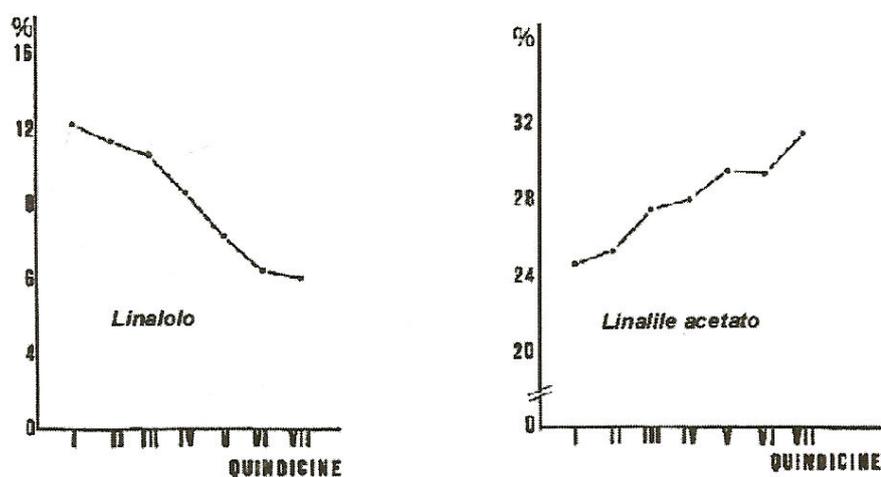


Figura 1.4 Contenuto di linalolo e linalile acetato nel tempo (dicembre/marzo) (Da Verzera et al., 2003)

Il contenuto di linalolo diminuisce da inizio a fine stagione (da 12 al 6%), mentre quello del linalile acetato aumenta (dal 24 al 32%).

Di conseguenza anche il valore del loro rapporto varia in ciascun periodo andando dallo 0.5 % all'inizio della stagione produttiva allo 0.2% alla fine della stagione.

Anche il luogo di produzione dei frutti (latitudine) incide sulla composizione quantitativa della frazione volatile come è rappresentato nella figura 1.5: suddividendo le zone produttive di bergamotto in 10 aree specifiche, è possibile osservare le differenze dei valori medi di limonene, linalolo e linalile acetato.

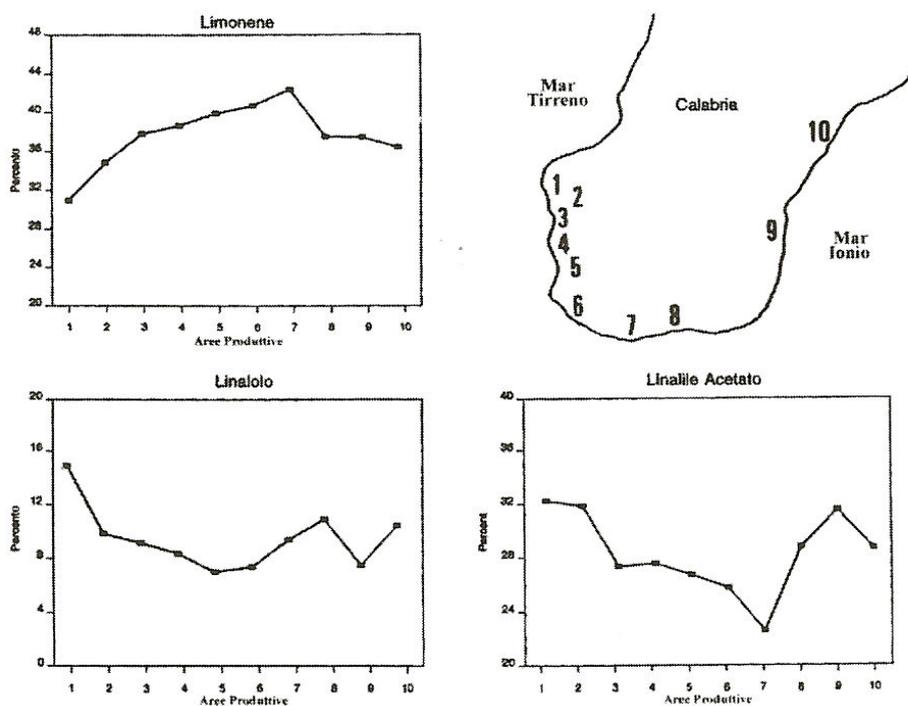


Figura 1.5 Contenuto medio di limonene, linalolo e linalile acetato in funzione dell'area di provenienza dei frutti (Da Verzera et al.,2003)

Infine anche la cultivar dei frutti incide sulla composizione dell'olio come rappresentato nella figura 1.6.

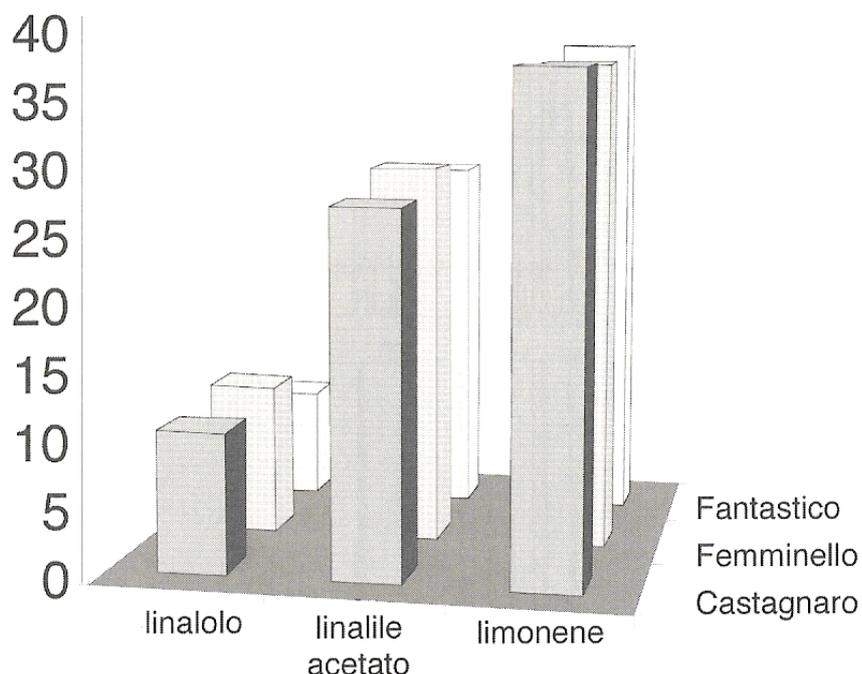


Figura 1.6. *Contenuto medio di limonene, linalolo e linalile acetato in funzione dell'area di provenienza dei frutti (Da Verzera et al., 2003)*

La cultivar Fantastico ha un contenuto di alcoli ed esteri più basso rispetto a quello delle altre cultivar ma, al contempo, il contenuto più alto di monoterpeni e sesquiterpeni.

Accanto a queste considerazioni, l'analisi che probabilmente più delle altre fornisce informazioni valide per la determinazione della qualità e della genuinità dell'olio di bergamotto, è lo studio della distribuzione enantiomerica dei componenti: ogni composto chirale, infatti, è presente nell'olio con un caratteristico rapporto enantiomerico (Verzera et al., 2003). Il linalolo ed il linalile acetato presentano, negli oli estratti a freddo, un eccesso dell'isomero (-), mentre il limonene dell'isomero (+); l'isomero (-) prevale nel β -pinene, sabinene e terpinen-4-olo, mentre l'isomero (+) nell' α -terpinolo. Queste informazioni sui rapporti enantiomerici sono chiaramente visualizzate nella figura 1.7.

Durante la stagione produttiva, i rapporti enantiomerici del linalolo, linalile acetato e limonene si presentano costanti, quelli del β -pinene e del sabinene variano entro limiti piuttosto piccoli, mentre quelli del terpinen-4-olo variano in maniera irregolare (Mondello et al., 1998).

Le variazioni dei rapporti enantiomerici in relazione alla stagione produttiva, sono schematizzati nella tabella 1.2.

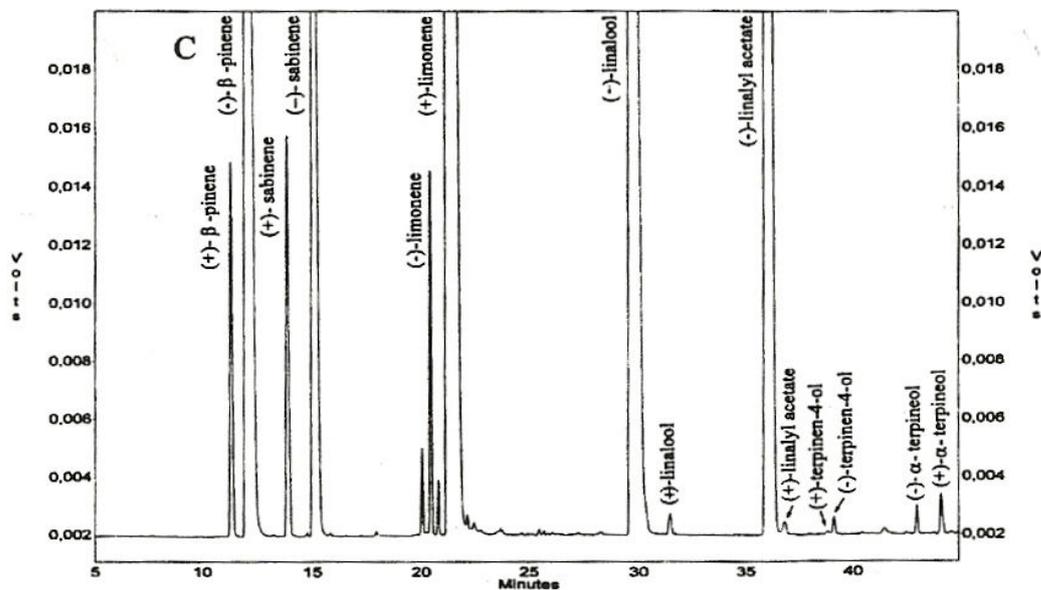


Figura 1.7. Distribuzione enantiomerica dei principali composti della frazione volatile di un olio di bergamotto (Da Mondello et al., 1998)

	1-15 Dicembre	16-31 Dicembre	1-15 Gennaio	16-31 Gennaio	1-15 Febbraio	16-28 Febbraio	2-4 Marzo
S (-) β-pinene	92,3	92,2	91,9	91,8	91,9	92,1	91
S (-) sabinene	85,2	85,1	85	84,8	84,8	84,8	84
R (+) limonene	97,7	97,7	97,6	97,7	97,8	97,7	97,9
R (-) linalolo	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6
R (-) terpinen-4-olo	84,5	81,3	88,3	86,7	85,5	84,1	83,9
R (+) α-terpinolo	37	42,3	52,2	58	62,2	65,9	78,3
R (-) linalile acetato	99,8	99,8	99,8	99,8	99,9	99,8	99,8

Tabella 1.2 Valori medi (X) dei rapporti enantiomerici di alcune componenti dell'olio essenziale di Bergamotto pressato a freddo (Da Mondello et al., 1998)

Complessivamente, la distribuzione enantiomerica permette di valutare la genuinità dell'olio e di avere informazioni sul periodo di produzione e sulla tecnologia di estrazione utilizzata. La

presenza di sostanze, naturali o di sintesi, di origine diversa da quelle presenti nel bergamotto determina una variazione del rapporto enantiomerico dei componenti originali dell'olio, evidenziabile anche in seguito a piccole aggiunte (Verzera et al., 2003).

Nella figura 1.8 sono paragonati due cromatogrammi relativi ad un olio di bergamotto genuino (A) e ad uno ricostituito (B). Il linalolo, nell'olio ricostituito, è presente in entrambe le forme enantiomeriche mentre, in quello genuino è presente prevalentemente l'isomero (-).

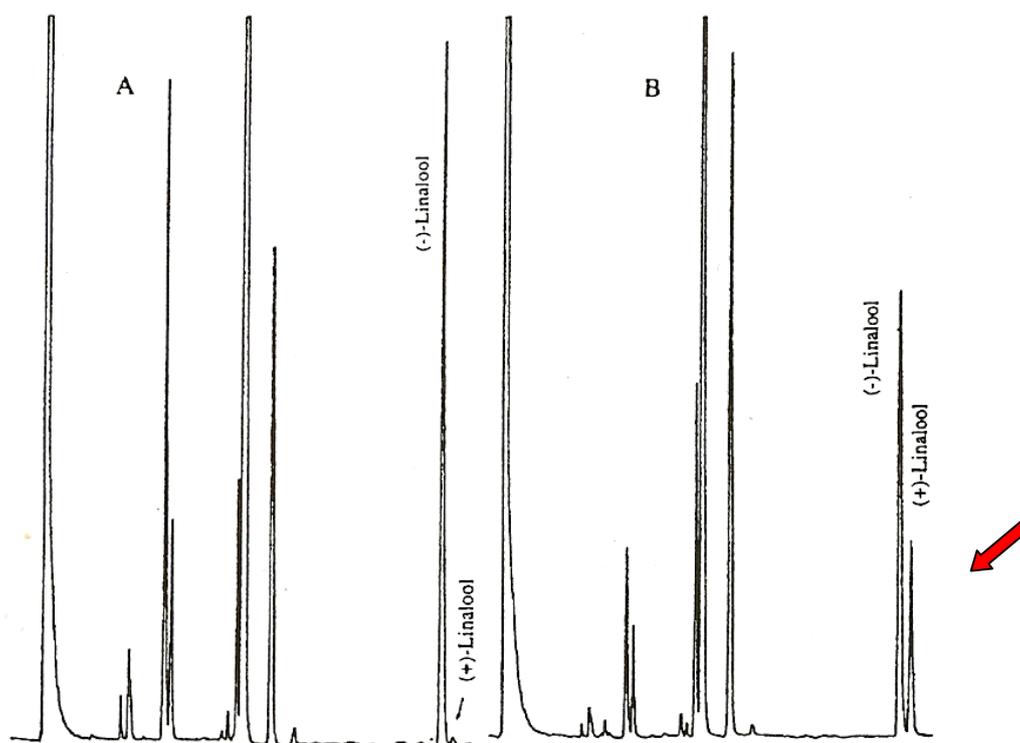


Figura 1.8. Cromatogramma di un olio di bergamotto genuino (A) ed uno ricostituito (B)
(Da Verzera et al., 2003)

La descrizione chimica fin qui trattata ha riguardato solo la frazione volatile dell'olio essenziale di bergamotto. In realtà anche la conoscenza del residuo non volatile, che influenza le proprietà olfattive dell'essenza dal momento che si comporta da fissativo naturale dei

profumi, fornisce indicazioni ed informazioni utili sulla qualità dell'olio. Il residuo non volatile dell'olio essenziale di bergamotto contiene cere, flavoni polimetossilati, cumarine e psoraleni. In particolare, mediante cromatografia HPLC sono state identificate nella frazione non volatile, le **cumarine**, citroptene e 2,5-geranilossi-7-metossicumarina e gli **psoraleni**, bergaptene e bergamottina. Un cromatogramma dei componenti della frazione non volatile è rappresentato nella figura 1.9.

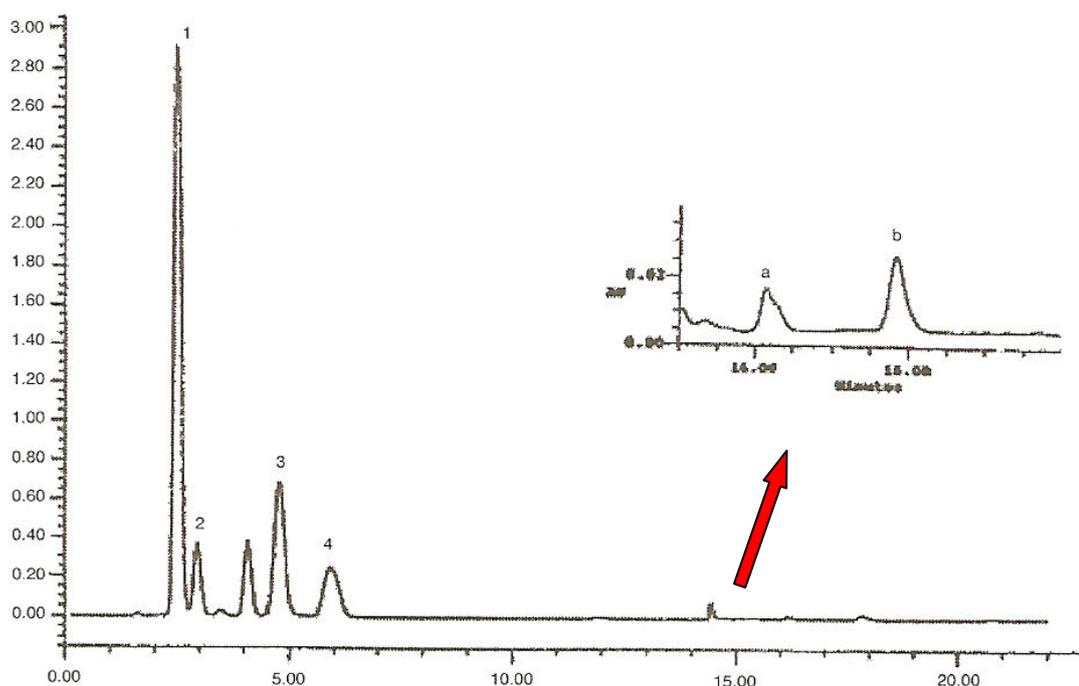


Figura 1.9 Cromatogramma HPLC della frazione non volatile di un olio essenziale di bergamotto: 1) bergamottina; 2) 5-geranilossi-7-metossicumarina; 3) citroptene; 4) bergaptene; a) tetra-O-metil-scutellareina; b) sinensetina (Da Verzera et al., 2003)

Studi condotti sulla frazione non volatile hanno dimostrato che la latitudine e l'altitudine dell'area di produzione dei frutti non ne influenzano la composizione; al contrario modeste variazioni possono essere apprezzate nel tempo durante la stagione produttiva (Mondello et al., 1993).

Valori medi	GENNAIO	FEBBRAIO	MARZO
Bergamottina	1,82	1,91	1,95
2,5-geranilossi-7- metossicumarina	0,13	0,12	0,12
Citroptene	0,24	0,21	0,18
bergaptene	0,23	0,19	0,15

Tabella 1.3 Valori medi percentuali della frazione non volatile dell'olio di bergamotto durante la stagione produttiva (Da Mondello et al., 1993)

Come si può osservare dalla tabella 1.3, nel periodo che va da gennaio a marzo, i livelli di 2,5-geranilossi-7-metossicumarina rimangono costanti, quelli della bergamottina aumentano di poco, mentre il citroptene ed il bergaptene presentano una diminuzione del loro contenuto di circa due terzi.

Il bergaptene ed il citroptene sono eccellenti indicatori della genuinità dell'olio di bergamotto: infatti, nel caso di oli ricostituiti o addizionati di sostanze estranee, i loro valori risultano più bassi del normale. Frequentemente oli di bergamotto adulterati, vengono arricchiti con olio di limetta che riporta nei valori normali le caratteristiche spettrofotometriche dell'olio. Tuttavia, la presenza dell'olio di limetta può essere svelata facilmente analizzando il residuo non volatile tramite HPLC: nel cromatogramma compaiono, in questo caso, l'isopimpinellina e l'erniarina, entrambi componenti caratteristici dell'olio di limetta, ma non presenti nell'olio di bergamotto (Mondello et al., 1993).

Allo scopo di tutelare la qualità e la genuinità dell'olio essenziale di bergamotto, il Consorzio del bergamotto di Reggio Calabria si avvale della Legge Regionale 5 febbraio 1977, n° 7 (Norme sul conferimento obbligatorio dell'essenza di bergamotto. BUR n° 10; 11 febbraio 1977). La legge prevede che tutte le essenze di bergamotto prodotte annualmente devono

essere obbligatoriamente consegnate al Consorzio di Reggio Calabria (art. 2; art. 3) e che l'essenza deve essere estratta a freddo dai frutti di bergamotto che abbiano raggiunto la cosiddetta "maturazione tecnologica" (art. 4). Inoltre, in base al punto 2 dell'articolo 13 della stessa Legge, i diversi campioni di essenza vengono sottoposti ad un'analisi chimica presso la Stazione Sperimentale per l'industria delle essenze e dei derivati degli agrumi di Reggio Calabria. In base all'articolo 14 le partite di essenze verranno poi classificate da una commissione di valutazione merceologica che attribuirà un coefficiente variabile da 0.90 a 1.10 alle partite dichiarate pure e che non presentano difetti organolettici (comprese le essenze le cui eventuali anomalie dipendono dalle condizioni climatiche stagionali).

In base all'articolo 17 le essenze dichiarate dalla commissione come non genuine verranno confiscate ed eliminate direttamente dal Consorzio del bergamotto di Reggio Calabria.

Dal 1999 la produzione calabrese dell'olio essenziale di bergamotto di Reggio Calabria è tutelata da Denominazione di Origine Protetta (D.O.P.) che la Comunità Europea ha concesso nel marzo 2001 (Reg. CE n. 509/01, GUCE L.76 del 16/03/01). Il Consorzio del Bergamotto ha recentemente varato il progetto dell'"Istituto Superiore di Profumeria", collegato a quello prestigioso di Versailles. L'Istituto di Profumeria potrà costituire la base di partenza per racchiudere tutte le fasi produttive del bergamotto: dalla coltivazione alla vendita del prodotto finito.

1.4. Proprietà farmacologiche dell'olio essenziale di bergamotto.

L'olio essenziale di bergamotto è stato ed è tutt'ora impiegato nell'industria farmaceutica, cosmetica ed alimentare. Recentemente sono stati condotti esperimenti volti a caratterizzare profilo neurofarmacologico del BEO in modelli sperimentali *in vitro* (Corasaniti et al., 2007) ed *in vivo* (Morrone et al., 2007) a cui si sono aggiunti studi che hanno definito proprietà protettive a livello del sistema cardiovascolare (Mollace et al., 2008).

Mediante esperimenti di microdialisi intracerebrale nell'animale libero di muoversi, Morrone e collaboratori hanno messo in evidenza che il BEO è in grado di promuovere il rilascio di neurotrasmettitori aminoacidici nell'ippocampo di ratto (Morrone et al., 2007). Somministrato per via sistemica (intraperitoneale), il BEO aumenta i livelli di aspartato, di glicina e di taurina nell'ippocampo attraverso un meccanismo Ca^{2+} -dipendente; somministrato direttamente nell'ippocampo, aumenta i livelli di aspartato, di glicina, di taurina, di glutammato e di GABA attraverso un meccanismo Ca^{2+} -indipendente. Esperimenti condotti impiegando preparazioni di sinaptosomi ippocampali di ratto hanno permesso di caratterizzare i meccanismi alla base degli effetti di rilascio neurotrasmettitoriale indotti dal BEO (interferenza con il rilascio esocitotico calcio-dipendente e con il rilascio calcio-indipendente, carrier-mediato) e documentare, inoltre, che la frazione di BEO deprivata dei monoterpeni idrocarburi risulta inattiva mentre la frazione bergaptene-free riproduce l'effetto di rilascio osservato con il fitocomplesso, escludendo quindi il coinvolgimento degli psoraleni in tale attività (Morrone et al., 2007).

Corasaniti e collaboratori (2007) hanno documentato l'azione neuroprotettiva del BEO in un modello di eccitotossicità indotta dall'N-metil-D-aspartato (NMDA) in colture di cellule di neuroblastoma umano SHSY5Y. L'NMDA è un agonista selettivo di un sottotipo di recettori-canale del glutammato, il principale neurotrasmettitore a carattere eccitatorio del sistema nervoso centrale dei mammiferi. Il glutammato si trova all'interno dei neuroni prevalentemente

immagazzinato nelle vescicole sinaptiche dove raggiunge concentrazioni molto elevate dell'ordine di 100 mM; l'aminoacido è presente, a concentrazioni minori (1-10 mM), anche nel citosol, in attesa che venga immagazzinato nelle vescicole (Kvamme et al., 1985). Nell'ambiente extracellulare, infine, il glutammato è presente in concentrazioni notevolmente inferiori comprese approssimativamente in un range che va da 1 a 5 μ M (Bouvier et al., 1992). Il glutammato che, liberato dai terminali glutamatergici durante l'attività sinaptica, è ricaptato dalle cellule gliali, viene qui convertito in glutammina, ad opera di specifiche glutammina-sintetasi; la glutammina così sintetizzata può essere trasportata fuori del SNC o raggiungere i neuroni dove viene ritrasformata in glutammato ad opera dell'enzima glutamminasi (Hamberger et al., 1979).

Una volta liberato nello spazio sinaptico, il glutammato si lega ai recettori posti sui neuroni post-sinaptici. I recettori a cui il glutammato può legarsi sono:

recettori metabotropi;

recettori ionotropi che comprendono i recettori per il kainato, i recettori AMPA ed i recettori di tipo NMDA. L'eccessiva attivazione di questi ultimi determina un massivo ingresso di Ca^{2+} attraverso il canale cationico associato al recettore, con conseguente attivazione di enzimi calcio-dipendenti, produzione di ROS e perossinitriti responsabili del danno neuronale.

Nel lavoro è stato dimostrato che la pre-incubazione con il BEO riduce in maniera statisticamente significativa sia la morte cellulare, che la produzione delle specie reattive dell'ossigeno, nonché la attivazione della Calpaina I indotte dall'NMDA

Lo studio della pathway intracellulare fosfatidilinositolo-3-chinasi/protein chinasi B/glicogeno sintasi-chinasi β (PI3K-Akt (o PKB)-GSK) ha evidenziato come l'esposizione all'NMDA determini una rapida defosforilazione/inattivazione della proteina pro-survival Akt e la

conseguente attivazione della proteina a valle GSK-3 β , la cui attività viene negativamente controllata tramite fosforilazione dall'Akt.

La pre-incubazione di 1 ora con il BEO era in grado di ripristinare la fosforilazione/attivazione di Akt e la conseguente fosforilazione/inattivazione della proteina a valle GSK-3.

Nello stesso lavoro, il coinvolgimento della via PI3K-Akt-GSK nei meccanismi di neuroprotezione, veniva confermato dai dati ottenuti inibendo farmacologicamente PI3K. Tali esperimenti evidenziavano come il pre-trattamento delle colture con LY490082, revertiva la protezione conferita dal BEO nei confronti della morte cellulare indotta da NMDA (Corasaniti et al., 2007).

Recentemente Mollace e collaboratori hanno evidenziato l'azione protettiva esplicita dalla frazione non-volatile dell'olio di bergamotto (BEO-NVF) in un modello di angioplastica sperimentale nei ratti. In tale modello, il danno meccanico a carico dell'endotelio vasale, conseguente all'introduzione di un catetere a palloncino nella carotide comune, causa proliferazione delle cellule della muscolatura liscia vasale e formazione di un tessuto neointimale; questo processo è associato a stress ossidativo e ad aumento dell'espressione del recettore LOX-1 per le LDL ossidate. Il pretrattamento con il BEO-NVF riduce la formazione della neointima, l'accumulo di radicali liberi e l'espressione del recettore LOX-1 suggerendo che gli antiossidanti naturali possono rappresentare una strategia terapeutica importante per il trattamento di disordini vascolari in cui siano coinvolti proliferazione delle cellule della muscolatura liscia e disfunzioni delle cellule endoteliali indotte dalle lipoproteine a bassa densità nella forma ossidata.

1.5. Proprietà farmacologiche dei composti maggiormente rappresentati dell'olio essenziale di bergamotto.

Gli oli essenziali e i costituenti della frazione volatile sono ampiamente utilizzati nella prevenzione e nel trattamento di diverse patologie. Gran parte della letteratura riguarda l'uso di tali sostanze nella prevenzione e trattamento di tumori, patologie a livello del sistema cardiovascolare, e anche come agenti anti-ossidanti e antidiabetici. (Bakkali et al., 2008) Di alcuni componenti degli oli essenziali è stata messa in evidenza l'azione di *penetration enhancer* per l'assorbimento di farmaci attraverso la cute.

I composti maggiormente rappresentati nell'olio essenziale di bergamotto sono:

Limonene;

Linalolo;

Linalile acetato.

Il limonene è il composto maggiormente rappresentato della frazione volatile dell'olio essenziale di bergamotto, di cui costituisce circa il 38% dell'intera essenza, e degli oli essenziali estratti da frutti appartenenti al genere *citrus*. Commercialmente viene impiegato sia nell'industria alimentare che nell'industria cosmetica e profumiera quale additivo in saponi e profumi.

Numerosi studi, condotti impiegando modelli sperimentali animali, hanno dimostrato come il limonene sia in grado di prevenire l'insorgenza di tumori a livello della ghiandola mammaria, del polmone, dello stomaco e della pelle indotti da idrocarburi policiclici aromatici e da nitrosammine. (Homburger et al., 1971; Elegbede et al., 1986; Elson et al., 1988).

Nel 1990 il Programma di Tossicologia Nazionale, ha riportato il limonene come carcinogeno nel rene di ratti maschi (National Toxicology Program, 1990). Successivamente, sono stati attribuiti al limonene, fenomeni quali l'insorgenza di nefropatie dovute alla possibile

interazione tra il limonene e l' α_{2u} -globulina, una proteina a basso peso molecolare trovata solo nei ratti e, solo nei ratti maschi, in quantità significative. Il legame tra il limonene e la proteina impedisce la degradazione lisosomiale di quest'ultima causandone un accumulo a livello del tubulo prossimale con conseguenti effetti tossici; tale effetto non è mai stato evidenziato nell'uomo per l'assenza di tale proteina (Whysner & Williams, 1996).

La specificità del meccanismo attraverso cui il limonene induceva la formazione di tumori nell'animale (EPA, *Environmental Protection Agency*, 1991), escludeva la tumorigenesi del limonene nell'uomo supportata anche dall'assenza di dati epidemiologici riportati in letteratura.

Studi successivi hanno evidenziato come il limonene espliciti attività antiproliferativa in vitro e determini inibizione della crescita tumorale in modelli sperimentali *in vivo*.

Nel 2004, infatti, Lu e collaboratori hanno dimostrato effetti proapoptotici del limonene in cellule cancerose gastriche impiantate nei topini (Lu et al., 2004).

La formazione di corpi apoptotici è stata osservata anche in colture di cellule di tumore gastrico BGC-823 con un'efficacia potenziata dall'azione combinata di limonene e 5-fluorouracile (Lu et al., 2003).

La chemioprevenzione del limonene è stata osservata in modelli sperimentali in vivo in cui ratti maschi venivano alimentati con una dieta contenente 1-2% di limonene. In tali studi è stato osservato come la presenza del limonene riduce la formazione di epatocarcinomi indotti chimicamente (Kaji et al., 2001).

L'effetto antitumorale del limonene è stato osservato anche in topi affetti da linfoma nei quali il limonene aumenta la sopravvivenza e ne modula la risposta immunitaria (Del Toro Arreola et al., 2005).

Diversi gruppi di ricerca si sono impegnati allo scopo di caratterizzare il meccanismo alla base dell'effetto antiproliferativo del limonene (Chen et al., 1999; Jiri et al., 1999; Parija & Das, 2003).

I meccanismi alla base dell'attività antitumorale del limonene sono stati solo parzialmente chiariti, tuttavia, un ruolo importante potrebbe essere svolto dalla capacità del limonene di interferire con il metabolismo del mevalonato (Elson, 1995) e con l'isoprenilazione delle proteine (Crowell et al., 1994; Kawata et al., 1994).

L'isoprenilazione è una modificazione post-trascrizionale che comporta l'aggiunta di gruppi isoprenilici su un residuo di cisteina all'estremità carbossi-terminale di molte proteine delle cellule eucariotiche (Schafer & Rine, 1992). I gruppi isoprenilici vengono trasferiti alle proteine da donatori specifici come il farnesil-pirofosfato (FPP) ed il geranilgeranil-pirofosfato (GGPP), entrambi metaboliti della via del mevalonato (Gelb et al., 1995). In questo caso, le reazioni di isoprenilazione sono catalizzate rispettivamente dalla farnesil-transferasi e dalla geranilgeranil-transferasi.

Alcune proteine come Ras e p21, in seguito ad isoprenilazione, stimolano la progressione neoplastica cellulare. E' stato suggerito che gli effetti antitumorali del limonene e dei suoi metaboliti sono dovuti alla loro capacità di bloccare l'isoprenilazione proteica attraverso l'inibizione della sintesi di farnesil-pirofosfato e geranilgeranil-pirofosfato oppure presumibilmente attraverso l'inibizione degli enzimi farnesil-transferasi e geranilgeranil-transferasi (Gelb et al., 1995).

Preparazioni a base di d-limonene sono entrate in fase clinica di sperimentazione in pazienti affetti da cancro in fase avanzata (Vigushin, 1998).

Relativamente al linalolo, composto monoterpenco presente negli olii essenziali di varie specie aromatiche impiegate in aromaterapia, fra le quali la lavanda ed il bergamotto, è stato riportato che esso è responsabile degli effetti sedativi dell'olio essenziale di lavanda (Buchbauer et al.,

1991). In seguito a somministrazione intraperitoneale nel topo, il linalolo esplica effetti sedativi, ipnotici ed anti-convulsivanti in modelli sperimentali di epilessia indotta da pentilentetrazolo, picrotossina, acido N-metil-D-aspartico (NMDA) ed acido chinolinico (Elisabetsky et al., 1999). Studi di binding, condotti su membrane ottenute da cortecce cerebrali di topo, hanno documentato che il linalolo inibisce in maniera competitiva il binding del glutammato ma non quello del muscimolo, un agonista del recettore GABA_A (Silva Brum et al., 2001a). Inoltre, il linalolo riduce il *release* di glutammato stimolato da potassio come documentato in sinaptosomi ottenuti da corteccia cerebrale di topo (Silva Brum et al., 2001b). Nel complesso, tali osservazioni suggeriscono che il linalolo, presente tra l'altro in percentuale significativa nell'olio essenziale di bergamotto, sia in grado di interferire con la trasmissione mediata dal glutammato, il principale neurotrasmettitore a carattere eccitatorio presente nel sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi. E' stato riportato in letteratura che il linalolo possiede attività anestetica locale dimostrata in preparazioni di giunzioni muscolari stabilite tra il nervo frenico e l'emidiaframma. In questo lavoro, il linalolo (0.01-10 µg/ml) riduce in maniera concentrazione-dipendente il numero di contrazioni elettricamente evocate nelle giunzioni neuromuscolari preparate ed, inoltre, la somministrazione di linalolo (30-2500 µg/ml) nel sacco congiuntivale di coniglio, causa l'aumento del numero di stimoli necessario per provocare il riflesso della congiuntiva (Ghelardini et al., 1999).

In un lavoro successivo, Re e collaboratori, hanno messo in evidenza l'effetto inibitorio del linalolo sul rilascio di acetilcolina (ACh) nelle giunzioni neuromuscolari di topo tra il nervo frenico e l'emidiaframma, e tale effetto sembra correlabile ad interazioni del linalolo con i canali ionici associati ai recettori nicotinici (Re et al., 2000).

Negli ultimi anni sono stati indagati gli effetti antiproliferativi del linalolo.

Cherng e collaboratori hanno dimostrato come il linalolo espliciti attività antiproliferativa in diverse linee cellulari di carcinoma umano di cervice, pelle, polmone e ossa.

Recentemente, è stato dimostrato come il linalolo, da solo, inibisce moderatamente la proliferazione di cellule di adenocarcinoma mammario MCF-7 (fenotipo *wild type*) e del fenotipo MDR (multi drug resistance) (MCF-7 AdrR) mentre, quando impiegato a concentrazioni sub tossiche, il linalolo potenzia la citotossicità indotta dalla doxorubicina in entrambe le linee cellulari. Il sinergismo, evidente nella linea MCF-7 AdrR, sembra essere dovuto alla capacità del linalolo di aumentare le concentrazioni intracellulari di doxorubicina e di indurre una diminuzione nei livelli di Bcl-xL (Ravizza et al., 2008).

Il linalolo, insieme ad altri terpeni, rientra nella composizione di prodotti cosmetici e dermatologici sia in qualità di principio attivo che come promotore di assorbimento di farmaci che non possono essere iniettati o somministrati oralmente.

La somministrazione orale rappresenta una via di somministrazione di farmaci non invasiva.

A volte tale via di somministrazione non si rivela adatta per alcuni farmaci che potrebbero essere inattivati a causa del pH acido che essi incontrano a livello dello stomaco, oppure potrebbero essere metabolizzati nelle reazioni di fase I del metabolismo epatico con conseguente riduzione della loro biodisponibilità (Jordan et al., 1993; Guy, 1996)

La pelle rappresenta un'ulteriore via di somministrazione non invasiva.

Tale modalità viene definita somministrazione transdermica o transcutanea (transdermal drug delivery).

La principale barriera per la somministrazione transdermica è rappresentata dallo strato corneo che costituisce lo strato più esterno della pelle costituito da cellule con un elevato contenuto in cheratina inserite in molteplici strati lipidici (Sweeny & Downing, 1970).

Diversi studi sono stati condotti al fine di sviluppare strategie che permettessero l'assorbimento transcutaneo di farmaci a bassa permeabilità. Le indagini sono state rivolte alla ricerca di promotori per l'assorbimento che fossero efficaci e non tossici per l'uomo (Takayama et al., 1991). Quest'ultimo aspetto ha indirizzato le ricerche verso prodotti di origine naturale, tra cui

i terpeni impiegati nella formulazione di prodotti cosmetici e dermatologici non solo per la promozione dell'assorbimento ma perché essi rientrano nella composizione del profumo (Williams & Barry, 1991).

I terpeni sono promotori per l'assorbimento ampiamente impiegati in diversi studi anche se la cinetica dell'assorbimento transdermico non è stato ancora elucidato.

Il meccanismo dei cambiamenti che essi inducono nello strato corneo è stato oggetto di diversi studi (Williams and Barry, 1991; Zhao & Singh, 1998).

Solitamente sono i monoterpeni ad essere impiegati come promotori per l'assorbimento e, tra essi, i terpeni monociclici sono stati più intensamente studiati.

E' stato riportato che il limonene aumenta la permeabilità del tamoxifene attraverso lo strato corneo, e che questo sembra essere dovuto all'estrazione dei lipidi in esso contenuti (Zhao and Singh, 1998).

La promozione dell'assorbimento da parte dei terpeni aciclici come il linalolo, invece, è attribuita all'orientamento molecolare nello strato lipidico intercellulare dello strato corneo che risulta tale da favorire sia il proprio assorbimento sia quello di altri principi attivi come l'aloiperidolo (Vaddi & Chan., 2002).

L'assorbimento di linalolo e linalile acetato è stato dimostrato in diversi modelli sperimentali.

In un lavoro, risalente al 1991, è stata riportata la presenza di linalolo e linalile acetato nel sangue di animali da esperimento esposti a vapori contenenti linalolo e linalile acetato (Jirovetz et al., 1991).

Successivamente, in uno studio condotto nel 1993, è stato osservato che l'esposizione ad alcuni olii essenziali ed ai composti in essi contenuti, causa la riduzione della motilità degli animali indotta da caffeina, evidenziando le proprietà sedative degli olii essenziali (Buchbauer et al., 1993).

Recentemente è stato riportato che linalolo e linalile acetato sono assorbiti anche per via transdermica (Cal & Sznitowska, 2003).

Sorprendentemente, nel lavoro di Cal e Sznitowska è stato dimostrato che il linalile acetato nonostante sia il composto più lipofilo rispetto al linalolo ed al citronellolo, risulta quello meno assorbito, in un modello di assorbimento cutaneo *in vitro*.

Nell'olio essenziale di bergamotto il linalolo costituisce il 10% mentre il linalile acetato rappresenta circa il 30% dell'intera essenza.

In uno studio condotto nel 2002, Peana e collaboratori hanno evidenziato un effetto antinfiammatorio del linalolo e del linalile acetato nei confronti dell'edema indotto da carragenina nei ratti (Peana et al., 2002).

Il linalile acetato, noto anche come bergamol, è un costituente di diversi prodotti cosmetici, shampoo, saponi a cui conferisce il profumo ed è impiegato nella produzione di prodotti per la pulizia del corpo e per la pulizia della casa.

In un lavoro pubblicato nel 2003 da Letizia e collaboratori, è stata riportata la quantità giornaliera di linalile acetato a cui un soggetto medio risulta esposto utilizzando 10 diversi prodotti cosmetici contenenti il linalile acetato. Tale studio è stato condotto attraverso l'analisi di alcuni fattori proposti in precedenza (Ford et al., 2000) quali la quantità di prodotto usato, la frequenza d'uso e la concentrazione del linalile acetato in tali prodotti.

Sulla base di questi fattori, la quantità di linalile acetato a cui la cute di un adulto di 60 Kg risulta mediamente esposta era compresa tra 0,0009-0,13 mg/Kg/die a seconda del prodotto cosmetico utilizzato.

Dati tossicologici sul linalile acetato risalgono al 1964 quando Jenner e collaboratori calcolarono la DL₅₀ del linalile acetato somministrato per via orale nei ratti Osborne-Mendel.

Il valore della DL₅₀ calcolato risultava essere pari a 14,550 mg/Kg (Jenner et al., 1964).

Successivamente, Motoyoshi e collaboratori hanno messo in evidenza come l'esposizione cutanea a 0,05 g di linalile acetato non diluito, non provocava l'irritazione cutanea nei maiali, mentre l'applicazione di 0.1 ml di linalile acetato non diluito provocava una lieve irritazione cutanea nei porcellini d'India (Motoyoshi et al., 1979).

Nel lavoro di Letizia e collaboratori sono stati riportati i risultati ottenuti da studi condotti in precedenza dal Research Institute for Fragrance Material (RIFM) in cui applicazioni di 10% di linalile acetato sciolto in paraffina, venivano effettuate sulla schiena di 131 soggetti volontari. Nessuna reazione cutanea fu osservata dopo 48 ore di esposizione al linalile acetato. (RIFM 1974a ; RIFM 1974b;RIFM 1982 a,b,c)

In un studio risalente al 1967, Greif aveva già riportato l'assenza di reazioni cutanee riscontrata in 25 volontari ai quali venivano effettuate applicazioni di linalile acetato al 12% sciolto in paraffina (Greif,1967).

Nel 2004, è stato osservato che, *in vitro*, il linalile acetato risulta citotossico su cellule endoteliali e fibroblasti umani e che l'effetto del linalile acetato è maggiore rispetto a quello indotto dall'olio essenziale di lavanda (*Lavandula angustifolia*) (Prashar et al., 2004).

Oltre l'attività citotossica indagata sia in modelli sperimentali in vivo che in vitro, recentemente sono state messe in evidenza proprietà antitumorali del linalile acetato.

Il trattamento con linalile acetato, in combinazione con altri due composti terpenici, il terpeniolo (α -terpineolo) e la canfora, causa l'inibizione della crescita di cellule umane di tumore al colon HCT-116, mentre nessun effetto citotossico è stato osservato su cellule intestinali non tumorali FHs74Int. Nel lavoro è riportato che l'esposizione delle colture HCT-116 (p53(+/+)) alla combinazione tra il terpeniolo, la canfora ed il linalile acetato (10^{-3} M ciascuno), determina un significativo accumulo cellulare in pre-G1 corrispondente al 64% dopo 48 ore che risulta maggiore rispetto alle combinazioni tra linalile acetato e terpeniolo (25%) e linalile acetato e canfora(14%).

L'esposizione, invece, delle colture HCT-116 (p53(-/-)) alla combinazione tra linalile acetato, canfora e terpeniolo, determina il 38% di apoptosi e l'accumulo cellulare in fase G2/M.

L'apoptosi indotta dalla combinazione tra linalile acetato, terpeniolo e canfora nelle colture HCT-116 (p53(+/+)), è associata all'aumento del rapporto tra Bax/Bcl-2 e p53/p53. Tuttavia l'apoptosi risulta anche dal clivaggio e dall'attivazione della caspasi-3, dalla perdita del potenziale di membrana mitocondriale e dal rilascio di citocromo c. Dal lavoro emerge che i tre costituenti l'olio essenziale di *Salvia libanolitica*, inducono attivazione della poli-(ADP-ribosio)-polimerasi (PARP) sia nella linea HCT-116 (p53(+/+)) che in quella HCT-116 (p53(-/-)). Tuttavia, mentre la pre-incubazione con l'inibitore ad ampio spettro delle caspasi, blocca l'attivazione della caspasi-3 e di PARP delle colture HCT-116 (p53(+/+)), la pre-incubazione delle cellule HCT-116 (p53(-/-)) con l'inibitore delle caspasi potenzia la morte cellulare mediata dai tre costituenti. Nel lavoro si conclude che l'apoptosi delle cellule HCT-116 (p53(+/+)) avviene mediante la via mitocondriale caspasi-dipendente mentre, l'apoptosi nelle cellule HCT-116 (p53(-/-)) sia caspasi-indipendente nonostante la presenza degli eventi caratteristici l'apoptosi quali rilascio del citocromo c e il clivaggio di PARP (Itani et al., 2008).

Oltre alla valutazione degli effetti antitumorali, il linalile acetato è stato al centro di uno studio che ha messo in evidenza come esso possieda attività cardioprotettiva. Infatti, è stato documentato che il linalile acetato determina rilasciamento delle cellule muscolari lisce di arterie carotidi di coniglio mantenute in vitro e pre-contratte da fenilefrina (Koto et al., 2006).

In tali esperimenti, l'azione rilasciante del linalile acetato è parzialmente, ma significativamente, ridotta da inibitori della nitrossido (NO) sintasi e della guanilato ciclasi, come pure dalla rimozione dell'endotelio, suggerendo come la vasodilatazione indotta dal linalile acetato sia, almeno in parte, NO-mediata. Inoltre, è stato osservato che, nel preparato vascolare privo di endotelio, la contrazione indotta dalla fenilefrina e la fosforilazione della catena leggera della miosina (MLC: *myosin light chain*), venivano significativamente ridotte

dal pre-trattamento con il linalile acetato e che tale effetto veniva revertito dalla caliculina A, un inibitore delle fosfatasi (Ishihara et al., 1989); quest'ultima osservazione suggerisce che parte dell'azione vasodilatatoria del linalile acetato è mediata dalla defosforilazione della MLC conseguente all'attivazione delle fosfatasi (Koto et al., 2006).

Meno rappresentati nel BEO rispetto al limonene, linalolo e linalile acetato, sono il γ -terpinene ed il β -pinene nella frazione volatile, ed il 5-metossipsoralene (5-MOP, o bergaptene) nella frazione non volatile.

La presenza del bergaptene nell'olio essenziale di bergamotto giustifica il largo impiego del bergamotto nella produzione di creme abbronzanti.

E' stato proposto che gli psoraleni favoriscono l'abbronzatura poiché stimolano la melanogenesi in colture di cellule di melanoma murino S91 e melanociti umani (Mengeaud & Ortonne, 1994, 1996) e determinano l'ispessimento dello strato corneo dell'epidermide (Treffel et al., 1991). Il principale responsabile di questo effetto è il bergaptene che, come tutti gli psoraleni fotoattivi, causa una reazione fototossica nella cute umana in seguito ad applicazione topica e successiva esposizione alle radiazioni ultraviolette ad onde lunghe (UVA; 320-400 nm).

I meccanismi di stimolazione della pigmentazione indotti dagli psoraleni, in particolare dal 5-MOP e dai raggi UV, sono complessi e non completamente chiariti. Tuttavia, le conseguenze di tale processo sono:

- l'aumento del numero dei melanociti funzionali, dovuto sia alla stimolazione diretta della replicazione mitotica dei melanociti, che all'attivazione dei melanociti quiescenti già presenti nell'epidermide o negli annessi cutanei (Mengeaud & Ortonne, 1994);
- l'induzione di un'ipertrofia dei melanociti;
- la stimolazione della migrazione dei melanociti attivati e proliferanti provenienti dagli annessi cutanei (Conconi et al., 1998).

L'applicazione sulla pelle di prodotti contenenti essenza di bergamotto, tuttavia, deve essere accompagnata dall'uso di filtri solari. In questo modo si ottiene una rapida abbronzatura, a seguito dell'esposizione ai raggi UVA della luce del sole, mentre, al contempo, i filtri solari proteggono dai raggi UVB (290-320 nm) dello spettro solare che notoriamente provocano eritemi e scottature (Forlot, 2003).

Le sostanze fotodinamiche dell'olio di bergamotto risultano rilevanti, inoltre, nella cura di alcune patologie importanti come la psoriasi e la vitiligine. Gli psoraleni sono composti naturali presenti in elevate concentrazioni in numerose piante (Forlot et al., 1998); dal punto di vista chimico appartengono alla classe delle furocumarine le quali derivano dalla fusione di un furano con una cumarina. Gli psoraleni maggiormente rappresentati in natura sono l'8-metossipsoralene (8-MOP) ed il 5-metossipsoralene (bergaptene o 5-MOP) (Forlot, 2000).

La fotochemioterapia è un trattamento in cui la risposta terapeutica viene indotta da un farmaco fotosensibilizzante in presenza di una radiazione di lunghezza d'onda adeguata. L'impiego di piante contenenti psoraleni per la cura di patologie cutanee ha origini remote (1500 a.C.). Nel 1974 Parrish e collaboratori introdussero l'impiego di 8-MOP (P) e UVA per il trattamento della psoriasi, coniando il termine "PUVA-terapia" (Parrish et al., 1974).

I meccanismi di induzione della fotosensibilizzazione tramite PUVA terapia non sono del tutto noti, ma pare si basino sulla tendenza degli psoraleni a formare addotti covalenti con le macromolecole biologiche (Averbeck, 1989).

A livello del DNA, il 5-MOP e l'8-MOP determinano, una volta fotoattivati, una reazione di cicloaddizione con le basi pirimidiniche (Musajo et al., 1965; Vigny et al., 1985; Anselmino & Cadet, 1995), generando la distorsione della doppia elica e la conseguente inibizione della replicazione e della trascrizione. La formazione degli addotti covalenti, infatti, compromette l'informazione genetica su entrambe le eliche, impedendo la sintesi semiconservativa, la trascrizione e riducendo la velocità di rinnovamento delle cellule epidermiche (Dall'acqua,

1986). Questo meccanismo è in grado di spiegare l'uso della terapia PUVA nel trattamento sintomatico della psoriasi la quale è dovuta ad un'iperproliferazione e ad una errata differenziazione dei cheratinociti (Pathak & Fitzpatrick, 1992; Tanew et al., 1988).

Il trattamento della psoriasi con la PUVA terapia determina una diminuzione della proliferazione dei cheratinociti mentre il deposito di melanina e la proliferazione dei melanociti è alla base del miglioramento dei sintomi della vitiligine, una comune discromia cutanea acquisita dovuta ad assenza o riduzione zonale dei melanociti (Gupta & Anderson, 1987).

L'origine della vitiligine è probabilmente imputabile ad un difetto genetico che coinvolge il sistema immunitario. La PUVA terapia, tuttavia, è anche in grado di modulare le funzioni e la distribuzione dei linfociti nelle regioni periferiche oltre che di sopprimere l'induzione e lo sviluppo delle risposte di ipersensibilità ritardata cellulare, intervenendo nella modulazione delle risposte immunitarie delle cellule cutanee immunocompetenti (cheratinociti) (Tokura et al., 1991). Per tali ragioni, la PUVA terapia trova applicazione non solo nel trattamento della vitiligine (Pathak et al., 2003), ma anche di altre patologie di origine immunitaria come il lupus eritematoso (Cruz et al., 2004).

Studi clinici condotti con gli psoraleni 5-MOP e 8-MOP hanno documentato che la PUVA terapia con 5-MOP determina una minore incidenza di effetti collaterali e tossici rispetto a quella con 8-MOP (McNeely & Goa, 1998); quest'ultimo, infatti, può indurre effetti collaterali indesiderati quali nausea, mal di stomaco, eritema con vescicolazione e, in un numero limitato di pazienti, proporzionalmente alla dose ed alla durata del trattamento, la formazione di tumori cutanei (Stern, 2001).

Un altro effetto indotto dagli psoraleni, in presenza di raggi UV, è la fotodistruzione dei microrganismi e dei virus. La fototossicità degli psoraleni dipende strettamente dalla dose di psoralene utilizzata e dall'esposizione ai raggi UV. Infatti, dosi elevate di psoralene inducono

la distruzione dei microrganismi, indipendentemente dal mezzo in cui essi si trovino, a condizione che i raggi UV possano penetrare nel mezzo stesso. La presenza di polisaccaridi e di altri componenti idrofili sulla superficie dei microrganismi sembra conferire resistenza all'azione microbica del bergaptene; a causa della diversa struttura della parete cellulare i batteri Gram-positivi sono, quindi, più sensibili agli psoraleni dell'olio essenziale di bergamotto rispetto a quelli Gram-negativi (Frugoni et al., 1996).

Recentemente, è stato dimostrato che il 5-MOP è in grado di influenzare i bioritmi ormonali determinando un progressivo aumento dei livelli sierici di melatonina nel ratto (Mauviard et al., 1991) e nell'uomo (Souetre et al., 1987). Il bergaptene, nell'uomo, agirebbe sull'ormone inibendone il processo di degradazione e allungandone, di conseguenza, l'emivita (Mauviard et al., 1995).

A questo riguardo, i risultati di uno studio condotto su un numero limitato di pazienti affetti da depressione severa documentano come il trattamento con 5-MOP determini un aumento dell'attività pineale e quindi delle concentrazioni di melatonina nel sangue con miglioramento della sintomatologia clinica associata alla depressione (Souetre et al., 1988).

Negli ultimi anni, sono stati condotti studi atti a valutare l'attività antiproliferativa degli psoraleni.

Esperimenti condotti impiegando cellule T24 (cellule derivanti da carcinoma della vescica) in coltura, hanno documentato come l'esposizione ad una miscela costituita da 8-MOP, 5-MOP e 4'-amminometil 4,5',8'-trimetilpsoralene (AMT) determina una significativa riduzione della proliferazione cellulare (Keane et al., 1994). Ulteriori indagini sperimentali, condotte in cellule di carcinoma epatico umano, J5, hanno dimostrato una significativa compromissione della proliferazione cellulare in seguito a trattamento con lo psoralene 5-MOP (Lee et al., 2003).

Nella stessa linea cellulare, l'analisi morfologica, la valutazione della mortalità, l'analisi del DNA e del ciclo cellulare hanno permesso di documentare che l'esposizione a 5-MOP

determina: 1) morte cellulare dovuta a citotossicità diretta; 2) induzione di apoptosi mediante blocco delle cellule J5 nella fase G₂/M del ciclo cellulare; 3) induzione di apoptosi con l'attivazione di una pathway indipendente dal blocco proliferativo e successivo arresto del ciclo cellulare dopo 24-72 ore dall'esposizione delle cellule al bergaptene. Il meccanismo attraverso cui il 5-MOP induce l'arresto delle cellule J5 nella fase G₂/M del ciclo cellulare coinvolgerebbe l'inibizione dell'espressione della ciclina B1 (Lee et al., 2003).

1.6 Usi dell'olio essenziale di bergamotto

L'olio essenziale di bergamotto resta da secoli uno dei principali costituenti di base per la realizzazione dei profumi; ciò è dovuto alle sue proprietà d'amalgama che fissano il bouquet aromatico dei profumi ed armonizzano tra loro tutte le essenze, esaltandone la fragranza.

Trascorsi ormai tre secoli dall'invenzione dell'acqua di Colonia, il bergamotto si è dimostrato adattabile a tutti i tipi di profumazione, nonostante le evoluzioni sociali e l'avvicinarsi delle mode. L'olio essenziale di bergamotto rientra, infatti, nella composizione dei più noti profumi (Peyron, 2003).

Fra gli usi storici del bergamotto, ma ancora mantenuti dalla tradizione locale, si ricorda il suo impiego nella preparazione delle famose "tabacchiere di Varapodio" utilizzate per il tabacco da pipa: secondo l'antica tradizione si prendono i frutti di bergamotto, meglio se ben maturi ed un po' essiccati, e se ne isola la sola buccia esterna in seguito all'estrazione delicata dell'agrume attraverso un piccolo foro praticato alla sommità del peduncolo. Successivamente si lascia essiccare la buccia al sole che diventa, così, una piccola ampolla, pronta per essere riempita di tabacco; essa viene quindi chiusa con un tappo che assicura il mantenimento della fragranza di bergamotto miscelata al tabacco (De Masi, 2003).

Importante è anche l'impiego del frutto nell'industria alimentare: la tradizione gastronomica locale vanta, infatti, una serie di ottimi prodotti realizzati con il bergamotto fra i quali si distinguono la crema al bergamotto, i cioccolatini aromatizzati, i canditi, i torroni, il gelato al bergamotto, il liquore detto "bergamino" oltre a numerose altre bibite e ricette tradizionali. In Lorena (Francia) vengono, inoltre, prodotte le caramelle "bergamotes di Nancy" dal colore ambrato e dall'aroma inconfondibile. E' giusto, infine, ricordare il "Twinings Earl Grey Tea", un tè aromatizzato al bergamotto esistente fin dal 1830 e tuttora uno dei più apprezzati dagli intenditori (Spinelli, 2003).

E' importante, tuttavia, sottolineare che l'abuso di questa qualità di tè può provocare disturbi a livello neuromuscolare. La rivista medica *Lancet* (Finsterer, 2002) ha riportato il caso clinico di un uomo, che accusava crampi muscolari ai piedi, insensibilità alle mani ed annebbiamenti della vista, in seguito al consumo giornaliero di oltre tre litri di tè aromatizzato al bergamotto. Questi sintomi sono stati associati, inizialmente, a disfunzioni neurologiche, escluse in un secondo momento dai risultati degli esami clinici. E' stato, infine, riconosciuto il bergaptene quale responsabile della sintomatologia riportata dal paziente (Finsterer, 2002). Il bergaptene, interferisce, infatti, sulla funzionalità neuromuscolare alterando la permeabilità dei canali al potassio (During et al., 2000).

Oltre che per la produzione di profumi per il corpo e deodoranti per l'ambiente, l'olio essenziale di bergamotto viene impiegato nella produzione di prodotti cosmetici come detergenti e creme per il corpo. Inoltre, esso viene impiegato nell'industria farmaceutica nella produzione di prodotti per la pulizia del viso o come disinfettante del cavo orale ed, ad esso, vengono attribuite anche proprietà antisettiche delle vie urinarie, digestive e respiratorie che ha consentito il suo inserimento nelle Farmacopee ufficiali di molti paesi (Capasso et al., 2000).

L'azione antibatterica ed antimicotica del BEO è ben documentata in letteratura.

L'attività antibatterica è stata recentemente valutata sia su batteri Gram-positivi che Gram-negativi, oltre che nei lieviti. I ceppi batterici venivano esposti all'azione di estratti ottenuti dalla buccia di bergamotto. Nello studio è riportato che, tra i ceppi batterici studiati, l'*Escherichia Coli* risultava quello più sensibile. La concentrazione minima che determinava l'inibizione della crescita batterica (MIC) era compresa tra 200-600 µg/ml.

Risultavano sensibili all'azione degli estratti dalla buccia di bergamotto anche *Pseudomonas putida* e *Salmonella enterica* (Mandalari et al., 2007).

Tra i batteri Gram-positivi risultano sensibili al bergamotto *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, che è il responsabile di alcune intossicazioni alimentari umane (Fisher & Phillips, 2006). Importante è anche l'attività contro ceppi di micoplasmi, batteri a localizzazione intracellulare, quali: *M. pneumoniae*, *M. hominis* e *M. fermentas*, implicato nella patogenesi dell'AIDS come possibile cofattore (Bisignano et al., 2003).

L'olio essenziale di bergamotto è risultato il più efficace tra gli olii essenziali testati su colonie di *Arcobacter butzleri* (Fisher et al., 2007).

L'attività dell'essenza naturale del bergamotto, dell'essenza priva delle furocumarine e dell'estratto distillato è stata valutata nei confronti delle specie più patogene per l'uomo come *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida Krusei* e *Candida tropicalis*. La concentrazione minima inibente la crescita (MIC), dopo 24 ore, è risultata essere del 5% per l'essenza di bergamotto, 2,5% e 1,25%, per l'essenza priva di furocumarine e dell'estratto distillato, rispettivamente. Dopo 48 ore, si osservava un incremento delle MIC corrispondenti al 10%, per l'essenza naturale, 5% per l'essenza deprivata delle furocumarine e 2,5%, per l'estratto distillato (Romano et al., 2005).

2.Scopo della tesi.

Recenti indagini sperimentali hanno documentato che il BEO protegge dalla morte cellulare indotta in colture di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, dall'eccitotossina NMDA (Corasaniti et al., 2007). Esperimenti condotti impiegando specifiche frazioni dell'olio essenziale hanno permesso di escludere un ruolo per il bergaptene ed i terpeni ossigenati negli effetti neuroprotettivi del BEO, suggerendo, invece, un coinvolgimento dei monoterpeni idrocarburi (Corasaniti et al., 2007).

Alcune osservazioni preliminari indicavano che il BEO, applicato alle colture SH-SY5Y a concentrazioni maggiori rispetto a quelle neuroprotettive, causava morte cellulare. Pertanto, scopo del presente lavoro sperimentale è stato quello di caratterizzare il profilo farmacotossicologico del BEO ed identificare i costituenti responsabili degli effetti citotossici/antiproliferativi.

A tal fine, sono stati condotti esperimenti atti a:

1. stabilire se il BEO induce morte cellulare concentrazione-dipendente;
2. caratterizzare il tipo di morte cellulare indotta dal BEO

L'indagine sperimentale è stata condotta sulla linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y.

In una prima fase sperimentale è stato caratterizzato il profilo tossicologico dell'olio essenziale di bergamotto.

La vitalità cellulare è stata inizialmente valutata con il saggio MTT e il test di esclusione del Trypan Blue. Successivamente, al fine di meglio definire il tipo di morte cellulare, è stata condotta un'analisi citofluorimetrica impiegando sia il test di vitalità biparametrico fluorescein-diacetato/ioduro di propidio (FDA/PI) eseguito su cellule vive e la colorazione con il PI su cellule fissate che ha permesso, inoltre, la valutazione degli effetti del BEO sul ciclo cellulare.

In una seconda fase dello studio, sono stati condotti esperimenti volti ad identificare il/i principi attivi responsabili dell'effetto citotossico osservato.

Tale obiettivo è stato perseguito impiegando due frazioni dell'olio essenziale di bergamotto ovvero, la frazione deprivata del bergaptene (BEO-BF) e la frazione deprivata del bergaptene e dei monoterpeni idrocarburi (BEO-BF/HF).

Inoltre, lo studio è stato esteso ai composti maggiormente rappresentati sia nella frazione volatile dell'olio che in quella non volatile.

Tra i costituenti della frazione volatile del BEO sono stati studiati i monoterpeni idrocarburi limonene, β -pinene, γ -terpinene, ed i terpeni ossigenati linalolo e linalile acetato. Per la frazione non volatile è stato indagato l'effetto del bergaptene.

L'indagine sulle proprietà citotossiche del BEO e dei suoi costituenti, in linee cellulari tumorali, deriva dall'interesse farmacologico verso composti di origine naturale quali potenziali agenti antitumorali e chemiopreventivi (Butler & Newman, 2008).

Diverse sono le sostanze di origine naturale ed i loro derivati semisintetici attualmente impiegati nella pratica clinica per il trattamento di neoplasie, fra i quali vinblastina, vincristina, vinorelbina, etoposide, teniposide, taxolo, docetaxel, topotecano ed irinotecano (Srivastava et al., 2007).

I risultati ottenuti in questo studio hanno permesso di ottenere originali informazioni relativamente all'effetto citotossico del BEO in cellule tumorali umane mantenute in coltura.

Inoltre, l'osservazione che specifici componenti dell'olio essenziale sinergizzano fra loro per indurre morte cellulare, offre interessanti spunti per un approfondimento del meccanismo alla base di tale sinergia, meccanismo che potrebbe utilmente essere sfruttato al fine di migliorare le strategie farmacologiche nell'ambito della terapia antitumorale.

3. Materiali e metodi

L'olio essenziale di bergamotto (BEO) e le sue frazioni, olio essenziale privo di bergaptene (BEO-BF) ed olio essenziale privo del bergaptene e dei monoterpeni idrocarburi (BEO-BF/HF), sono stati forniti dal "Conorzio del bergamotto" di Reggio Calabria (Italia), unitamente ai certificati di analisi, condotta dalla Stazione Sperimentale per le Industrie delle Essenze e dei Derivati degli Agrumi (SSEA, Reggio Calabria). In accordo con i dati riportati in letteratura (Mondello et al., 1995; Verzera et al., 1996, 2003), il contenuto dei monoterpeni idrocarburi limonene, β -pinene e γ -terpinene era rispettivamente del 37,98%, 6,15% e 7,17%. Le percentuali di linalolo e linalile acetato erano rispettivamente del 9,83% e 30,02%, mentre il bergaptene era pari a 3500mg/Kg di essenza, corrispondente allo 0,35%.

Nel BEO-BF, le percentuali di limonene, β -pinene e γ -terpinene erano rispettivamente 38,91%, 6,34% e 7,2%; le percentuali di linalolo e linalile acetato erano 8,98% e 30,23%, mentre il bergaptene era pari a 3mg/Kg di essenza corrispondente allo 0,0003%. Nel BEO-BF/HF, il contenuto del limonene, β -pinene e γ -terpinene corrispondeva al: 0,38%, 0,62% e 0,03% rispettivamente, mentre linalolo e linalile acetato era 18,95% e 70,26%.

Il BEO e le sue frazioni sono stati diluiti 1:1 con una soluzione idroalcolica di etanolo al 90% e, successivamente, per diluizione in terreno di coltura, sono state ottenute le concentrazioni (vol/vol) impiegate negli esperimenti (0,0005%; 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,03% e 0,04%). Limonene, β -pinene, γ -terpinene, linalolo e linalile acetato (ottenuti dalla Sigma-Aldrich, Milano), sono stati diluiti 1:10 con etanolo 90%, mentre il 5-MOP (Sigma-Aldrich, Milano) è stato disciolto in DMSO alla iniziale concentrazione dello 0,1%; partendo da questi stock, per successive diluizioni in terreno di coltura, sono state ottenute le concentrazioni finali desiderate, corrispondenti, per ognuno dei singoli composti, a quelle presenti nelle varie diluizioni del BEO.

3.1 Colture cellulari e trattamenti

Lo studio è stato condotto in cellule aderenti di neuroblastoma umano SH-SY5Y mantenute in coltura; questa linea è un subclone delle cellule umane SK-N-SH, ottenute da un aspirato di midollo osseo di una bambina di 4 anni affetta da neuroblastoma metastatico (Biedler et al., 1973). Le cellule SH-SY5Y hanno un'origine neuroectodermale, con caratteristiche fenotipiche molto simili a quelle delle cellule neuronali.

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI 1640, in presenza di siero bovino fetale (10% vol/vol) inattivato al calore, di L-glutamina (2mM), di penicillina-streptomicina (100X, 1%) e sodio piruvato (1 mM) a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Le cellule, mantenute in coltura in fiasche da 75cm², raggiunta una confluenza dell'80%, venivano tripsinizzate e seminate in piastre da 6 o 96 pozzetti, secondo le esigenze sperimentali.

3.2.Studi di citotossicità.

La valutazione della citotossicità dell'olio essenziale di bergamotto, delle sue frazioni e dei componenti, è stata effettuata mediante il test di esclusione del Trypan blue, il saggio di proliferazione cellulare MTT e, successivamente, mediante analisi citofluorimetrica.

3.2.1.Test di esclusione del Trypan Blue.

Le cellule sono state seminate in piastre a 6 pozzetti da 35 mm di diametro alla densità di 100 x 10³ cellule per pozzetto.

Dopo 18-24 ore il *medium* è stato rimosso e sostituito con terreno normale (cellule controllo) o con terreno contenente il BEO o le sue frazioni alle concentrazioni (vol/vol) 0,0005%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,03% e 0,04% (concentrazioni finali nel *medium* di esposizione).

Dopo 24 ore di esposizione, la valutazione della morte cellulare è stata effettuata mediante la tecnica di esclusione al trypan blue (0,4% p/vol).

Il colorante acido Trypan blue, come è possibile osservare nella figura 3.1, è caratterizzato nella sua struttura chimica da due gruppi azotati e quattro gruppi sulfonici, legati ad anelli aromatici. I gruppi sulfonici conferiscono alla molecola una globale carica negativa. Questa caratteristica impedisce al colorante di attraversare le membrane cellulari, a meno che non risultino danneggiate; quest'ultima condizione si verifica quando la cellula va incontro a morte cellulare e, con buona probabilità, quando la morte è avvenuta per necrosi.

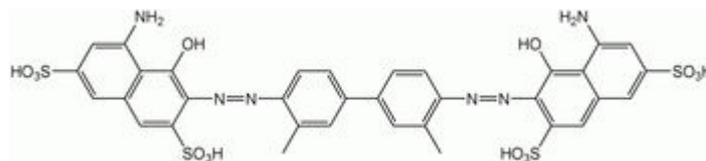


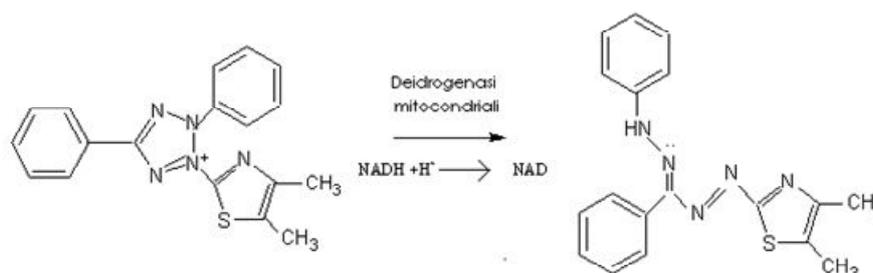
Figura 3.1 Formula chimica del colorante acido Trypan blue.

Le cellule non vitali appaiono, pertanto, colorate in blu al microscopio ottico (Trypan blue positive), mentre quelle vitali appaiono non colorate (Trypan blue negative).

Operativamente, il terreno di ogni pozzetto è stato prelevato, per raccogliere eventuali cellule sofferenti o morte presenti in sospensione, quindi le cellule aderenti sono state tripsinizzate, aggiunte al terreno precedentemente raccolto, e centrifugate per 10' a 1200 x g; il pellet è stato risospeso in un'opportuna quantità di soluzione di trypan blue e le cellule contate mediante un emocitometro Improved Neubauer. La percentuale di morte cellulare, è stata espressa come percentuale delle cellule colorate (non vitali) rispetto alle cellule totali contate (Corasaniti et al., 1995) ed i valori riportati come media \pm errore standard.

3.2.2. Saggio MTT

L'MTT, un sale colorato in giallo, corrispondente chimicamente al bromuro di 3-(4,5 dimetilthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, viene ridotto ad opera delle deidrogenasi mitocondriali, in presenza di NADH come cofattore, con formazione di cristalli di formazano intracellulari insolubili (di colore blue), successivamente solubilizzati mediante una soluzione di SDS (al 10% in HCl 0.01 M). Poichè la riduzione dell'MTT è proporzionale al numero di cellule metabolicamente attive, questo saggio viene usato per misurare la citotossicità, la proliferazione o l'attivazione cellulare (Mosmann, 1983).



Le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti, alla densità di 8×10^3 cellule per pozzetto e mantenute in terreno di coltura senza rosso fenolo; dopo circa 18-24 ore sono state esposte al BEO o alle specifiche frazioni dell'olio essenziale per 24 ore.

Al termine del periodo di esposizione, il *medium* è stato rimosso e le cellule incubate per 4 ore con MTT (5 mg/ml); quindi, i cristalli di formazano sono stati solubilizzati mediante incubazione con SDS per 18-24 ore prima di misurare l'assorbanza a 540 nm (filtro di referenza: 690 nm) mediante uno spettrofotometro per micropiastre (Multiscan MS, Labsystems, Helsinki, Finlandia). I valori sono stati riportati come media \pm errore standard delle variazioni percentuali rispetto al controllo (cellule non trattate) posto uguale a 100.

3.3. Analisi citofluorimetrica

L'ulteriore caratterizzazione del profilo tossicologico del BEO, è stata effettuata mediante analisi citofluorimetrica, che ha consentito di ottenere utili informazioni sul tipo di morte cellulare causato dal BEO.

La citometria a flusso o citofluorimetria è una tecnica d'analisi che permette di contare, esaminare e “sortare” (laddove è presente il dispositivo) microscopiche particelle, come le cellule, in sospensione. Essa consente l'analisi multiparametrica di una vasta popolazione cellulare e l'aspetto innovativo di questa tecnica è che ogni cellula della sospensione viene analizzata individualmente. La citofluorimetria si basa sulla capacità delle cellule di riflettere/rinfrangere (*scattering*) la luce in base alla loro forma, complessità interna, altresì detta granularità, o in base alla presenza di molecole marcate in grado di emettere fluorescenza se eccitate da un fascio di luce. L'uso di molecole fluorescenti che possono essere anticorpi che si legano a recettori presenti sulla superficie cellulare o molecole che vengono scisse da enzimi endogeni, permette l'identificazione di sottopopolazioni cellulari grazie all'analisi contemporanea di più parametri. All'interno di un citofluorimetro le cellule sono forzate a scorrere in un flusso laminare (principio della focalizzazione idrodinamica) garantito dal sistema idrodinamico che fa sì che esse passino allineate una dietro l'altra davanti al raggio laser. Lo strumento nel nostro laboratorio è un FacsCalibur a tre colori (Becton-Dickinson, CA, USA) dotato del sistema ottico mostrato in figura 3.2 (immagine ottenuta dal sito internet www.iscr.ed.ac.uk/FACS)

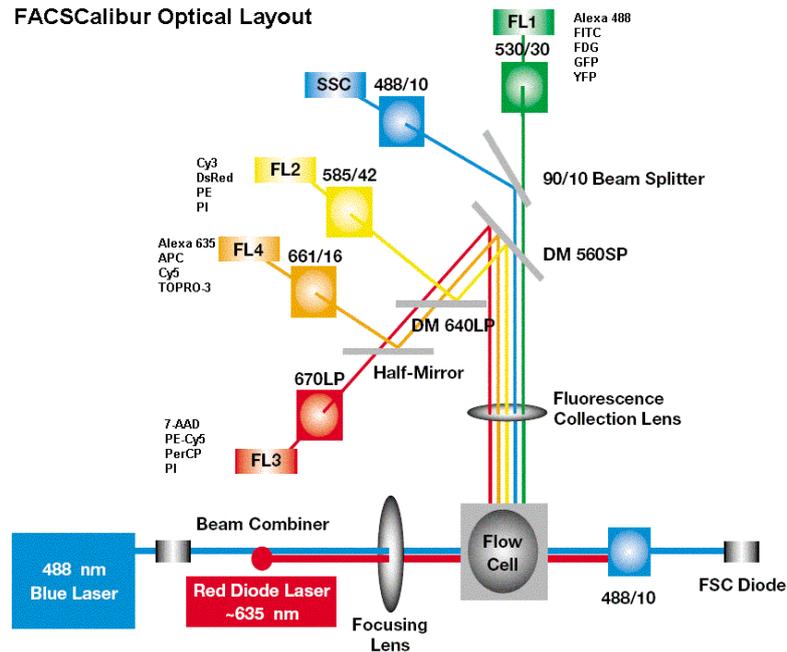


Fig.3.2

Le cellule passano singolarmente nella camera di flusso dove vengono colpite da un raggio laser (Argon) alla lunghezza d'onda di 488 nm. Una parte della radiazione che colpisce ciascuna cellula, viene raccolta da uno specchio diodo posto nella stessa direzione del raggio laser indicato nella figura dalla sigla FSC diode. FSC è la sigla di Forward Side Scatter così chiamato perché il rilevatore giace sulla stessa linea ma dalla parte opposta rispetto al punto di emissione del raggio laser. Il FSC misura lo *scattering* della luce da parte della cellula in relazione al diametro cellulare e, quindi, alle sue dimensioni. Le altre radiazioni emesse da ogni singola cellula vengono raccolte da un sistema collettore di lenti ed inviate a un sistema di specchi diecrici in grado di far passare radiazioni di determinate lunghezze d'onda e riflettere quelle di lunghezze d'onda differenti che vengono poi inviate ad altri specchi. Ciascuna radiazione emessa viene raccolta dal fotomoltiplicatore corrispondente e convertita in segnale analogico che viene trasferito al computer. Perpendicolarmente rispetto al FSC si trova il fotomoltiplicatore per il segnale SSC, Side Scatter, che fornisce informazioni circa la

complessità interna di ogni cellula (granulosità), del rapporto nucleo/citoplasma. Le sigle FL-1, FL-2, FL-3 indicano i fotomoltiplicatori o *detectors* che trasformano i segnali ottici che derivano dalle radiazioni emesse dai fluorocromi utilizzati. In particolare FL-1 rileva radiazioni emesse che cadono nella regione del verde dello spettro visibile (λ 500-550 nm), FL-2 rileva radiazioni che cadono nella regione del giallo (λ 600 nm) ed FL-3 rileva radiazioni emesse nella regione del rosso (λ 600-650 nm).

Il nostro strumento è dotato solo di tre colori intesi come i rilevatori delle fluorescenze emesse dai fluorocromi, manca il rilevatore FL-4 e manca la presenza del raggio Red Diode Laser destinato per l'eccitazione di molecole in grado di emettere nella regione oltre i 700 nm. Le informazioni che derivano dai dati di FSC e SSC risultano già sufficienti all'identificazione di sub-popolazioni all'interno della sospensione in esame. Un esempio deriva dalla distinzione delle cellule del sangue come risulta dal grafico di fig.3.3.

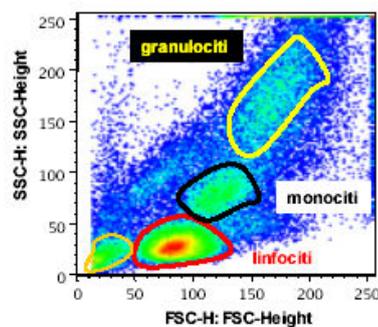


Fig3.3. (Immagine ottenuta dal sito www.uniurb.it)

Come si nota dal grafico, i granulociti che rappresentano le cellule più grandi, presentano alti valori di fluorescenza di FSC e di SSC, mentre i linfociti che sono più piccoli si trovano in basso a sinistra del grafico.

3.3.1. Test di vitalità FDA/PI

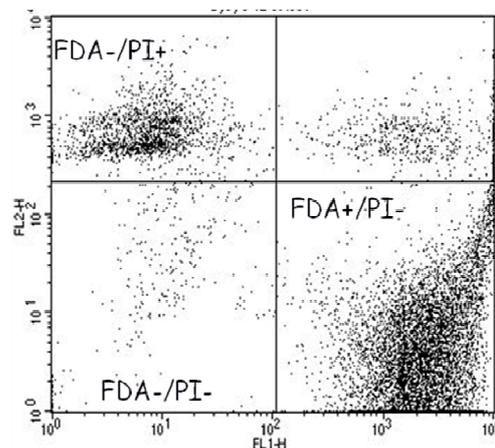
Il test di vitalità biparametrico FDA/PI, è un tipo di analisi che si effettua su cellule vive. Le cellule aderenti, vengono staccate con tripsina e risospese in soluzioni saline, generalmente PBS, contenente l'FDA e il PI. La fluoresceina-diacetato (FDA) è una molecola che entra liberamente nella cellula attraverso la membrana plasmatica. Una volta all'interno, se la cellula è metabolicamente attiva, la FDA viene scissa da alcune esterasi che producono un frammento in grado di emettere fluorescenza se eccitato da un fascio di luce. L'emissione di fluorescenza costituisce un indice della funzionalità metabolica della cellula; pertanto, la cellula che emette fluorescenza nella regione del verde risulta vitale. Al contrario, lo ioduro di propidio (PI) è un fluorocromo che non riesce ad attraversare la membrana citoplasmatica a meno che essa non presenti delle lacerazioni o rotture: in questo caso le cellule che emettono fluorescenza in seguito al legame del PI al DNA, risultano morte. La marcatura di una popolazione cellulare con entrambe le molecole fornisce la suddivisione della popolazione in esame in 4 subpopolazioni, distinguibili in:

- cellule positive alla colorazione con FDA e negative a quella col PI;
- cellule negative alla colorazione con l'FDA e positive al PI;
- cellule negative ad entrambe le colorazioni;
- cellule positive ad entrambe le colorazioni.

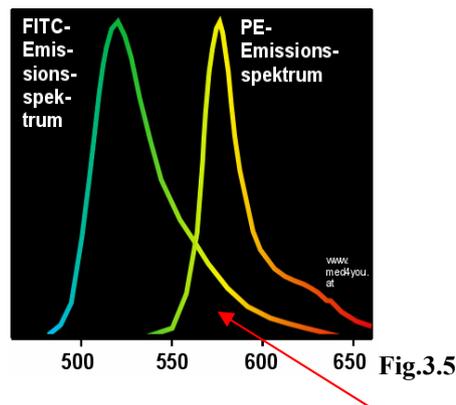
La fluorescenza cellulare dovuta all'ingresso dell' FDA e alla sua scissione da parte di esterasi presenti e attive all'interno delle cellule, è indicata nel grafico di figura 3.4 con la sigla FL-1H ed è riportata sull'asse delle ascisse. Sull'asse delle ordinate, è riportata l'intensità di fluorescenza dovuta al legame del PI al DNA ed è indicata con la sigla FL-2H. Le cellule risultanti positive alla colorazione con FDA e negative alla colorazione con PI corrispondono

alle cellule vitali, poiché possiedono esterasi metabolicamente attive che scindono l'FDA e possiedono una membrana plasmatica integra che nega l'accesso al PI. Queste cellule occupano il quadrante posto in basso a destra del pannello di figura 3.4. Le cellule positive alla colorazione con PI e negative alla colorazione con l'FDA, rappresentano le cellule che possiedono sia rotture e lesioni a livello della membrana plasmatica permettendo l'ingresso al PI, sia enzimi metabolicamente inattivi che non scindono l'FDA. Tali cellule corrispondono alle cellule necrotiche e occupano la posizione in alto a destra del pannello (Fig. 3.4).

Le cellule che si trovano nel quadrante in basso a sinistra sono quelle che risultano negative ad entrambe le colorazioni. In queste cellule l'FDA non viene scissa per produrre fluorescenza e il PI non penetra all'interno della cellula, segnali questi che indicano la presenza di esterasi inattive oltreché l'integrità della membrana plasmatica: queste cellule sono pertanto apoptotiche. Le cellule positive ad entrambe le colorazioni sono cellule metabolicamente attive, ma recanti piccole lacerazioni a livello della membrana plasmatica e vengono classificate come "sofferenti".

**Fig.3.4**

In analisi citofluorimetrica un inconveniente che si può avere quando si effettua una doppia colorazione delle cellule è dovuto alla parziale sovrapposizione degli spettri di emissione dei due fluorocromi utilizzati (Fig. 3.5).



In Fig. 3.5 sono mostrati gli spettri di emissione di anticorpi fluorescenti che marcano i recettori di superficie presenti sulle cellule linfocitarie. La freccia indica la parziale sovrapposizione degli spettri di emissione. Può accadere quindi che ad un determinato fotomoltiplicatore (PMT) giunga un notevole quantitativo di fluorescenza indesiderata, a causa dell'ampiezza della banda di emissione dei fluorocromi.

Ciò determina un'errata valutazione, in quanto particelle o cellule che emettono nella regione del verde potrebbero apparire come se emettessero nella regione del rosso e viceversa. Per ovviare a questo problema si effettua una compensazione del sistema elettronico durante l'acquisizione. La compensazione richiede nel nostro caso, la sottrazione alla fluorescenza rilevata nel canale del rosso FL-2H e dovuta all'emissione del PI, di una percentuale della fluorescenza rilevata nel canale del verde FL-1H dovuta alla fluorescenza emessa dall'FDA. Tale sottrazione viene effettuata fino a quando non si ha la netta separazione delle fluorescenze emesse dalla popolazione cellulare che fornisce la distinzione delle quattro sub-popolazioni indicate in Fig. 3.4.

3.3.2. Analisi del ciclo cellulare e dell'ipodiploidia

Nell'analisi del ciclo cellulare, la colorazione con PI, indipendentemente dall'integrità della membrana citoplasmatica, è resa possibile in seguito alla permeabilizzazione delle cellule con

agenti fissativi, quali etanolo al 70% o con l'ausilio di detergenti quali il Triton X-100. Il PI penetra all'interno della cellula e si intercala tra le basi del DNA. Questa proprietà permette di distinguere le diverse fasi del ciclo in cui si trovano le cellule. La intensità di fluorescenza che si osserva è proporzionale alla quantità di PI che si lega al DNA e quindi alla quantità di DNA presente nella cellula stessa. Se una cellula è in fase G₀/G₁, ovvero contiene una singola copia del genoma, presenta un certo valore di fluorescenza. Le cellule in fase G₂/M che possiedono due copie del genoma presentano un valore di fluorescenza pari al doppio delle prime. Le cellule che stanno attraversando la fase S presentano una fluorescenza equamente distribuita tra le cellule in fase G₀ e quelle in fase G₂ (Fig.3.6)

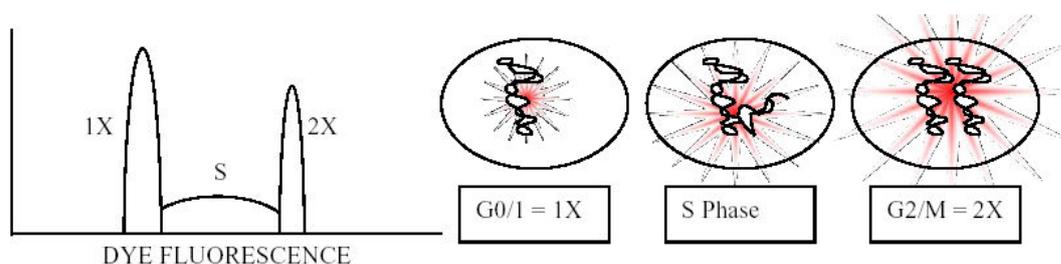


Fig.3.6

Uno degli inconvenienti che possono limitare l'analisi citofluorimetrica del DNA è la presenza di aggregati nel campione. Nonostante le cellule passino singolarmente davanti al fascio di luce, alcune possono rimanere attaccate e di queste si può rilevare una fluorescenza doppia che può essere erroneamente attribuita ad un contenuto doppio in DNA alterando l'analisi (Fig.3.7)

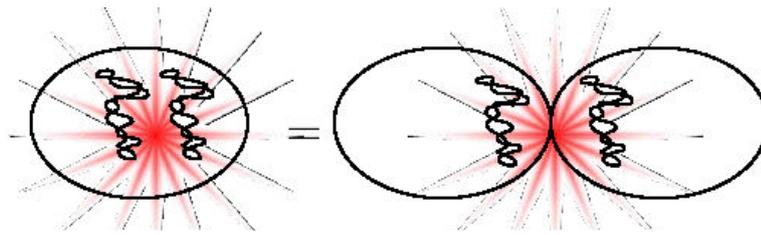


Fig.3.7.

Per ovviare a questo inconveniente, in citofluorimetria esiste un parametro che viene definito Discriminatore di Doppietti che permette l'identificazione delle singole cellule ciclanti escludendole e separandole dagli aggregati.

Al passaggio dal laser, la fluorescenza di una cellula genera un impulso che è descritto graficamente da una gaussiana (Fig.3.8) :

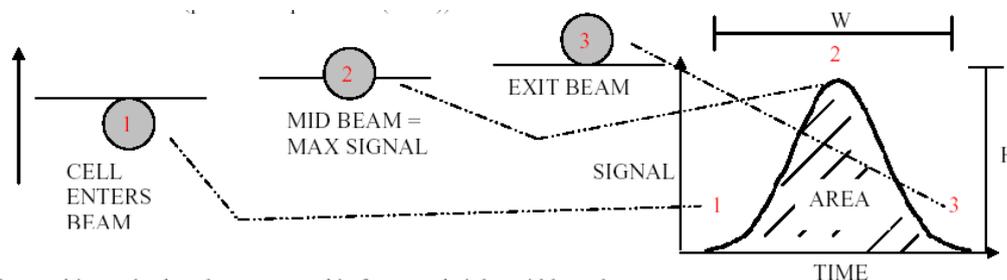


Fig.3.8.

H (height) indica l'intensità massima di fluorescenza e corrisponde all'altezza della gaussiana, W (width) il tempo di transito di una cellula davanti al raggio laser. Una cellula attaccata ad un'altra impiegherà un tempo maggiore nell'attraversare il raggio laser e l'area descritta sarà differente.

Mettendo in un grafico le informazioni derivanti dal parametro FL2-A contro FL2-W, si isolano le cellule singole ciclanti. Un esempio di grafico di questo tipo è indicato in Fig.3.9a.

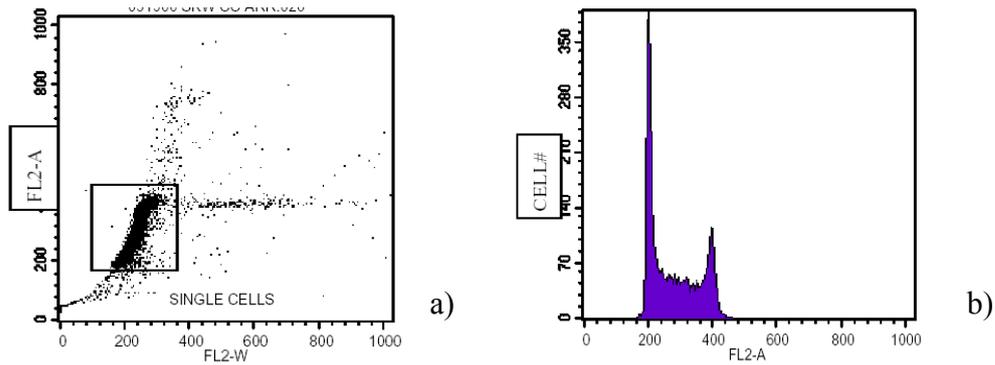


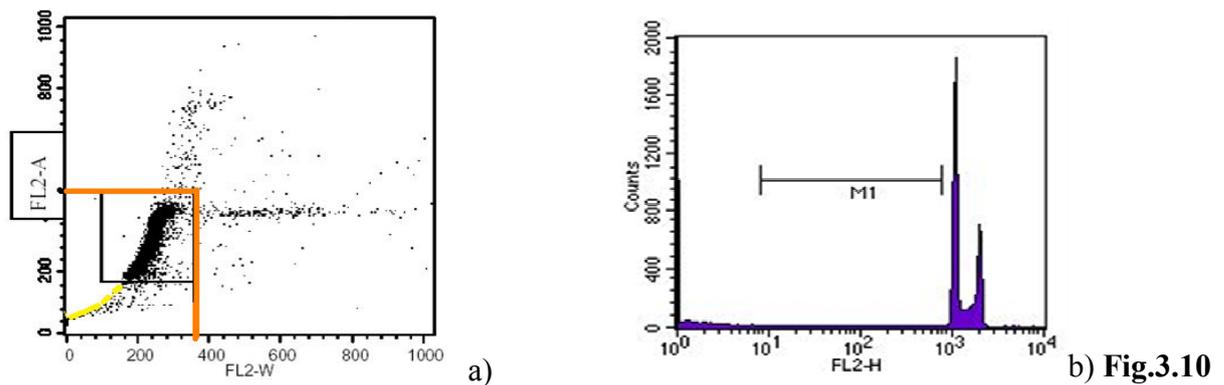
Fig.3.9

(Le immagini riportate nelle figure 6,7,8,9, sono state ottenute dal sito www.icmb.utexas.com)

Il pannello riportato in figura 3.9a rappresenta il discriminatore di doppietti che consente la distinzione delle cellule ciclanti (rettangolo) dagli aggregati cellulari.

L'istogramma riportato in fig 3.9 b, consente la quantificazione della distribuzione cellulare nelle fasi del ciclo.

Gli eventi attribuibili a cellule con un ridotto contenuto di DNA (ipodiploidi), sono evidenziati in giallo nel pannello di figura 3.10a e sono quantificati come eventi con valori di fluorescenza compresi nella regione designata dal marker M1, rappresentato nell'istogramma di figura 3.10b.



b) Fig.3.10

3.3.3. Colture cellulari per analisi citofluorimetrica

Le cellule, in fiasche da 75 cm², sono state seminate in piastre a 6 pozzetti da 35 mm di diametro alla densità di 35 X 10⁴ cellule per pozzetto. Dopo 24 ore il terreno è stato rimosso e sostituito con RPMI contenente BEO o BEO-BF, a diverse concentrazioni (0.0005%, 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%). Le concentrazioni della frazione BEO-BF/HF sono state 0,005%, 0,01% e 0,02%. Dopo 24 ore di trattamento le cellule sono state raccolte nel modo di seguito riportato.

3.3.4 Raccolta delle cellule

Il surnatante presente in ogni pozzetto è stato raccolto in provette per citofluorimetria (Facs-Tube; Becton-Dickinson). Dopo un lavaggio con 1 mL di terreno senza siero, sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 0.5 mL di una soluzione di tripsina-EDTA (GIBCO-Invitrogen, Milano) e le cellule sono state incubate a 37°C. Quando tutte le cellule erano staccate, a ciascun pozzetto è stato aggiunto 1 mL di terreno completo (contenente siero bovino, 10%) e le cellule sono state raccolte e trasferite nella provetta corrispondente.

3.3.5. Marcatura cellulare con FDA/PI

Dopo aver tripsinizzato e raccolto le cellule nel modo precedentemente descritto, esse sono state centrifugate a 1000-1200 g per 10', risospese in tampone fosfato (PBS), centrifugate ancora una volta e dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet risospeso e incubato per 5' in 300 µL di una soluzione di colorazione costituita da 9,8 mL di PBS, 10 µL di FDA 100 µM, 200 µL di PI 100µg/mL. Dopo due lavaggi in PBS freddo, le cellule sono state subito analizzate al citofluorimetro. 10'000 eventi totali sono stati acquisiti e l'esclusione dei detriti e

degli aggregati, è stata effettuata per mezzo di una regionalizzazione (gate) eseguita sul grafico FSC/SSC. I dati sono stati espressi come percentuali rispetto agli eventi esclusi dai detriti cellulari.

3.3.6. Marcatura con PI per l'analisi del ciclo cellulare

Dopo la raccolta, le cellule sono state lavate in PBS, centrifugate ed il pellet risospeso in 100 μ L di PBS; quindi, le cellule sono state fissate in etanolo al 70% per 24 ore a -20°C . Successivamente il fissativo è stato rimosso mediante lavaggio in PBS ed al pellet sono stati aggiunti 50 μ L di RNAsi DNAsi-free (1 mg/mL; Sigma, Milano) e successivamente 250 μ L di una soluzione di PBS contenente Triton X-100 0,1% e PI 20 $\mu\text{g/mL}$; dopo incubazione a 37°C per 15', le cellule sono state analizzate al citofluorimetro.

30'000 eventi totali sono stati acquisiti e l'analisi è stata eseguita previa esclusione degli aggregati tracciando un *gate* sul discriminatore di doppietti.

3.4. Analisi dei dati.

Le percentuali della distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare sono state ottenute con il software Modfit distribuito dalla VSH (*Verity Software House*). Il programma si basa sulla costruzione di due curve gaussiane intorno ai picchi corrispondenti alle fasi G0/G1 e G2M del ciclo.

La fase S è invece calcolata costruendo un trapezoide.

La determinazione della fase S con l'uso di software matematici, è stata al centro di dibattiti, in quanto alla percentuale di nuclei rilevata in fase S, si assegnava un valore prognostico in pazienti con carcinoma mammario (Clark et al., 1992; Ferno et al., 1992).

Il disaccordo generale in letteratura deriva dall'uso di differenti metodi statistici per la valutazione del contenuto in DNA cellulare, dalla variabilità nel processamento dei campioni (Il tipo di campione analizzato (fresco o congelato o incluso in paraffina) può influenzare le misure di ploidia: il materiale incluso in paraffina determina una maggiore quantità di detriti ed il CV è generalmente più alto che nei campioni freschi/congelati) e conseguente variabilità della raccolta dei dati, e dall'assenza di procedure di standardizzazione universali.

Questa situazione fu superata nel 1993, quando furono stabilite delle linee guida a cui dovevano attenersi i programmi di analisi di ciclo cellulare nel DNA Cytometry Consensus Conference riportate da Hedley e collaboratori.

Tra i parametri stabiliti dal Consensus vi era:

la presenza di non meno di 10000 eventi cellulari esclusi i detriti e gli aggregati cellulari.

La determinazione del numero di eventi cellulari ad un minimo di 10000 ha come fine la riduzione delle variazioni statistiche nella distribuzione dei dati (Eudey, 1996). Tale assunzione è correlata alla risoluzione derivata dalla trasformazione del segnale da impulso elettrico a analogico digitale.

Questa trasformazione avviene nel citofluorimetro grazie al dispositivo ADC (analog-digital-converter) che converte l'impulso elettrico amplificato (variabile continua) ad un numero intero che indica il canale di fluorescenza (channel number) variabile discreta.

Più alto è il numero dei canali di fluorescenza, maggiore sarà la risoluzione dell'istogramma.

Nella statistica dei citofluorimetristi si è assunto che la distribuzione del contenuto in DNA è di tipo gaussiano ed è pari a $x+\varepsilon$ indicando con X il contenuto in DNA ed ε l'errore dovuto al processamento del campione in esame.

Un altro parametro guida per la corretta valutazione delle fasi del ciclo cellulare è il coefficiente di variazione del picco G0/G1e la percentuale di *debris* e aggregati.

Nella conferenza del 1993 è stato stabilito che tale coefficiente non deve essere superiore all'8% mentre una percentuale di aggregati superiore al 20% risulta non soddisfacente per la corretta valutazione della Fase-S (Cytometry, 1993).

Il modfit, tiene conto di tutti questi parametri. L'analisi al modfit viene eseguita tracciando un gate sulla popolazione cellulare rappresentata dalle cellule singole ciclanti (Fig.3.10). Sulla distribuzione derivata dai dati acquisiti, il programma traccia il modello ideale di distribuzione tracciando le gaussiane intorno ai picchi corrispondenti alle fasi G₀/G₁ e G₂/M su cui è impostato e ha un sistema che valuta quanto il modello osservato si discosta dal modello teorico di distribuzione delle varie fasi del ciclo cellulare. In figura sono riportati i pannelli che vengono visualizzati dopo che il programma ha effettuato l'analisi.

Le informazioni che riporta il modfit riguardano il tipo di popolazione se diploide o aneuploide stabilita dall'operatore, la percentuale della popolazione nelle varie fasi, il coefficiente di variazione del picco G₀/G₁ e l'RCS che rappresenta il risultato del test statistico che esegue il programma e che indica la bontà del modello osservato rispetto a quello teorico. Un RCS (reduced-chi square) minore del 5% indica un buon "fitting" del modello con i dati osservati.

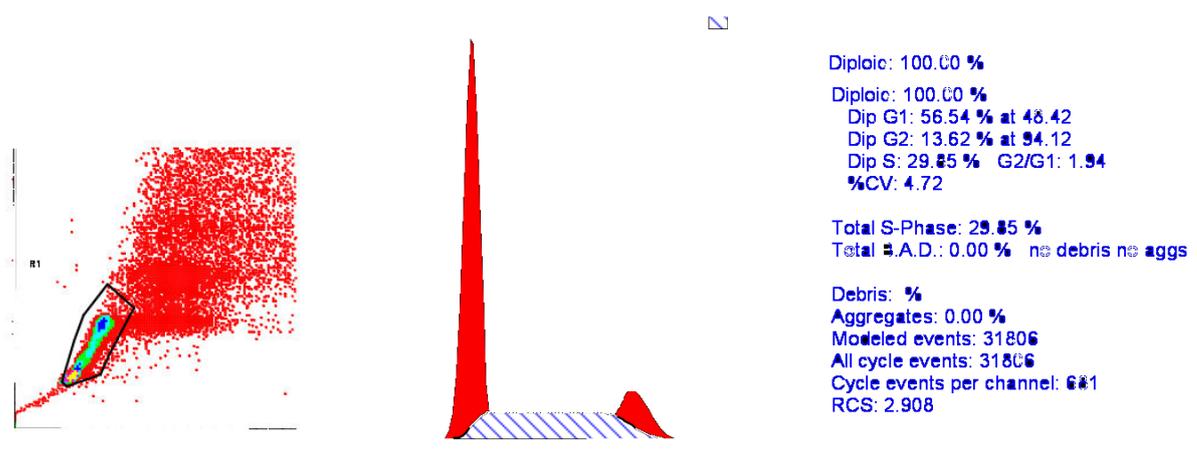


Fig.3.10.

Le percentuali dell'ipodiploidia cellulare sono state ottenute con il software CellQuest Pro, utilizzato per l'acquisizione dei campioni e fornito in associazione con lo strumento.

Anche la percentuale delle cellule necrotiche, vitali e apoptotiche (FDA/PI), sono state ottenute con il software Cell Quest Pro fornito in associazione con lo strumento (BD Biosciences, Milano).

I dati sono stati espressi come la media \pm errore standard dei valori dei singoli esperimenti. La differenza statistica tra le medie è stata valutata mediante l'analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple.

4. Risultati

4.1. Caratterizzazione degli effetti citotossici indotti dall'olio essenziale di bergamotto (BEO) nelle colture SH-SY5Y.

Allo scopo di valutare gli effetti del BEO sulla vitalità cellulare delle colture SH-SY5Y, queste sono state esposte a concentrazioni crescenti di olio essenziale di bergamotto (0,0005%, 0,005%, 0,01%, 0,02%, 0,03% e 0,04% (vol/vol)) per 24 ore.

Come mostrato in figura 4.1, l'esposizione delle colture al BEO induce effetti tossici.

Concentrazioni di BEO superiori a 0,01% determinano, infatti, una significativa riduzione della vitalità cellulare, come valutato mediante test MTT (Fig. 4.1a). Tale risultato è stato confermato dall'analisi della mortalità cellulare condotta mediante test del *Trypan blue* (Fig.4.1b).

L'analisi del grafico di Fig.4.1a documenta una riduzione della vitalità cellulare concentrazione-dipendente. L'esposizione, infatti, delle colture SH-SY5Y al BEO 0,02-0,03 e 0,04% determina una riduzione della percentuale di cellule vitali corrispondente al 25, 75 e 97% rispetto alle colture controllo (riportate come 100% di cellule vitali).

Simili considerazioni possono essere condotte riguardo l'effetto del BEO sulla mortalità cellulare Fig.4.1b. La percentuale di cellule morte dopo esposizione al BEO 0,02% risulta pari a circa il 20%. L'esposizione a concentrazioni superiori di BEO determina un aumento dell'effetto tossico che si traduce in una percentuale di morte cellulare pari al 60% quando il BEO è impiegato alla concentrazione 0,03% e al 100% in presenza di BEO 0,04%. Il marcato effetto tossico del BEO 0,04% nelle colture SH-SY5Y è evidente nelle immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase nelle quali si osserva la completa assenza di cellule aderenti e pertanto vitali (Fig.4.1c).

Gli effetti citotossici osservati con le più alte concentrazioni di BEO non sono imputabili al veicolo impiegato a diluire l'olio essenziale dal momento che concentrazioni di etanolo corrispondenti a quelle presenti nel BEO 0.04% non modificano la vitalità cellulare nè inducono un aumento del numero di cellule Trypan blue positive rispetto a colture controllo.

Concentrazioni del fitocomplesso pari a 0,0005-0,01% non determinano effetti citotossici come documentato dai risultati ottenuti sia dal saggio di vitalità MTT che dal test di esclusione al *trypan blue*.

I risultati ottenuti esponendo le colture cellulari al BEO 0,0005-0,01%, confermano i dati precedentemente ottenuti nella stessa linea cellulare nel corso di uno studio volto a caratterizzare il profilo neuroprotettivo dell'olio essenziale nei confronti del danno eccitotossico indotto dall'esposizione delle SH-SY5Y all'NMDA (Corasaniti et al., 2007).

Al fine di caratterizzare il tipo di morte cellulare indotto dal BEO, sono state impiegate due tecniche di analisi citofluorimetrica, ovvero il test di vitalità biparametrico fluoresceina diacetato (FDA)/ ioduro di propidio (PI) e la colorazione del DNA nucleare, con PI, eseguito su cellule permeabilizzate.

Inoltre, al fine di escludere che l'effetto osservato fosse imputabile al veicolo utilizzato per la diluizione del BEO, le colture SH-SY5Y, sono state esposte alla concentrazione di etanolo equivalente alla percentuale presente nel BEO 0,04%,

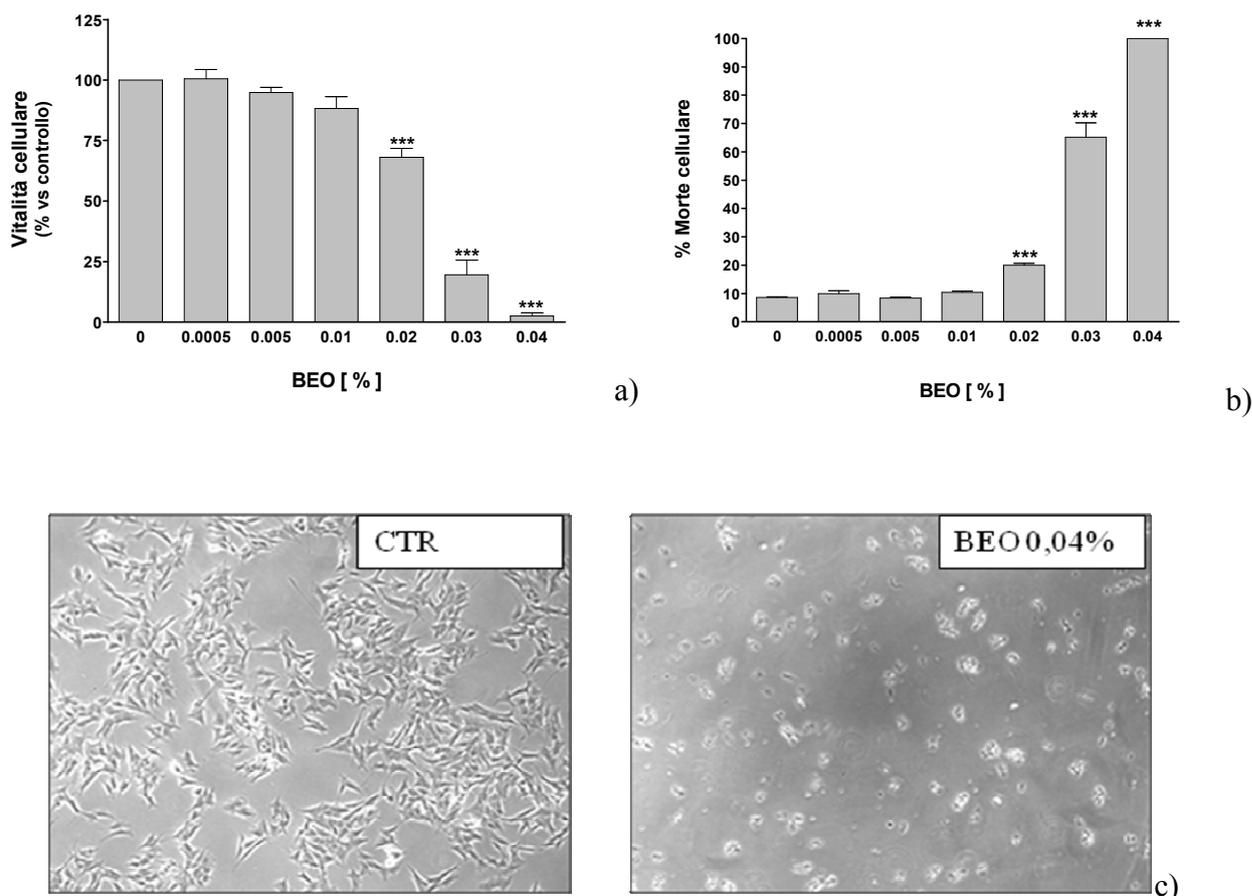


Figura 4.1 Effetti citotossici indotti dal BEO in colture SH-SY5Y esposte a concentrazioni crescenti del fitocomplesso. L'incubazione delle colture SH-SY5Y per 24 ore a concentrazioni pari a 0.02-0.04% di olio essenziale di bergamotto (BEO) induce riduzione della vitalità cellulare, valutata mediante test dell'MTT (a), incremento della percentuale di morte cellulare, valutato mediante tecnica di esclusione al *trypan blue* (b) e la perdita di aderenza alla superficie di crescita (BEO 0,04%) (c). L'effetto esplicito dal BEO risulta concentrazione dipendente con entrambi i metodi di analisi (MTT e trypan blue). Il BEO 0,02, 0,03 e 0,04% causa una riduzione della vitalità che risulta statisticamente significativa rispetto al controllo (istogramma a sinistra) e che ben si correla all'incremento della mortalità cellulare (istogramma a barre a destra). L'esposizione delle colture SH-SY5Y a concentrazioni inferiori di BEO (0,0005-0,01%) non causa variazioni significative né della vitalità cellulare (a) né della mortalità cellulare (b). Gli istogrammi a barre riportano la media \pm errore standard di 4-12 esperimenti. *** denota $P < 0.001$ rispetto alle colture controllo. (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

I pannelli riportati in figura 4.2a, ottenuti mediante il test biparametrico dell'FDA/PI, documentano come, l'esposizione delle colture di neuroblastoma al BEO 0,03%-0,04%, determina una riduzione statisticamente significativa delle cellule vitali (FDA⁺/PI⁻; quadrante in basso a destra). Tale riduzione risulta sovrapponibile ai dati di vitalità cellulare precedentemente ottenuti con il saggio MTT (Fig. 4.1a).

L'istogramma a barre, che descrive le variazioni percentuali della morte per necrosi (Fig.4.2,d) in presenza di BEO 0,03%-0,04% rispetto alle colture controllo, risulta a sua volta sovrapponibile a quanto ottenuto con il test di esclusione al *trypan blue*.

L'esposizione delle colture al BEO 0,03%-0,04%, causa una variazione significativa della distribuzione percentuale degli eventi apoptotici (quadrante in basso a sinistra). L'istogramma a barre riportato in figura 4.2b indica un incremento degli eventi FDA⁻/PI⁻ corrispondente al 134% e 200% rispetto alle colture controllo rispettivamente in presenza di BEO 0,03% e 0,04%. Nessuna variazione nei parametri studiati rispetto alle colture controllo, è stata rilevata esponendo le colture di SH-SY5Y a concentrazioni di BEO pari a 0,0005%-0,01%.

Tuttavia, i risultati ottenuti mediante analisi FDA/PI non sono sovrapponibili a quelli ottenuti con i test MTT e *Trypan blue* relativamente al BEO impiegato alla concentrazione 0,02%; infatti, rispetto a colture controllo, il BEO alla concentrazione 0,02% non modifica la percentuale di cellule FDA⁺/PI⁻ (vitali), nè aumenta in maniera statisticamente significativa la percentuale di cellule FDA⁻/PI⁺ (necrotiche).

Come risulta dal pannello riportato in figura 4.2, l'effetto del BEO 0,04% non è attribuibile al veicolo in cui il BEO è diluito (etanolo 0,036%). L'esposizione all'etanolo 0,036%, non causa, infatti, variazioni significative nella distribuzione percentuale delle cellule vitali, apoptotiche e necrotiche.

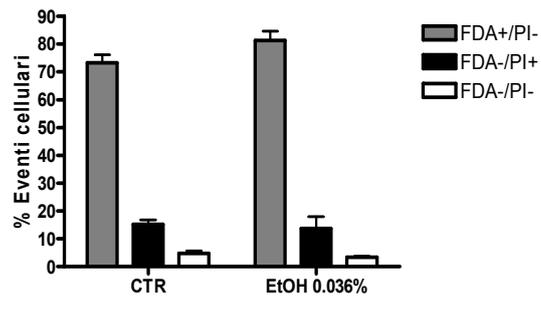
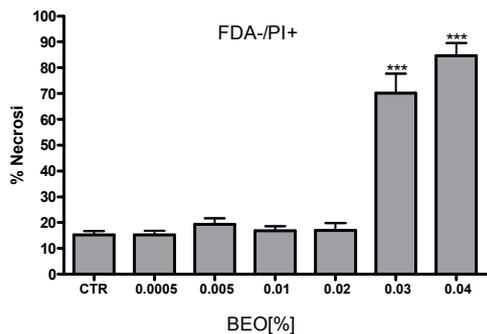
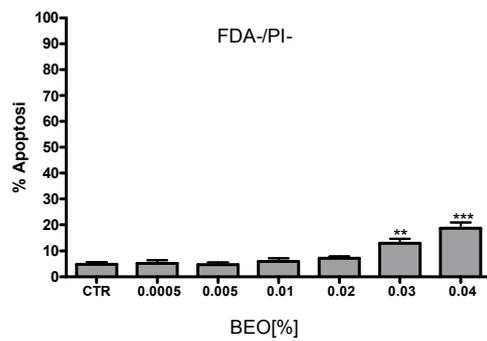
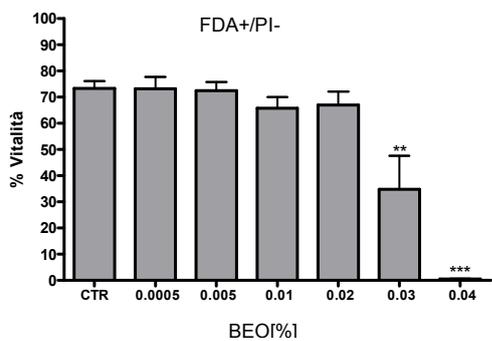
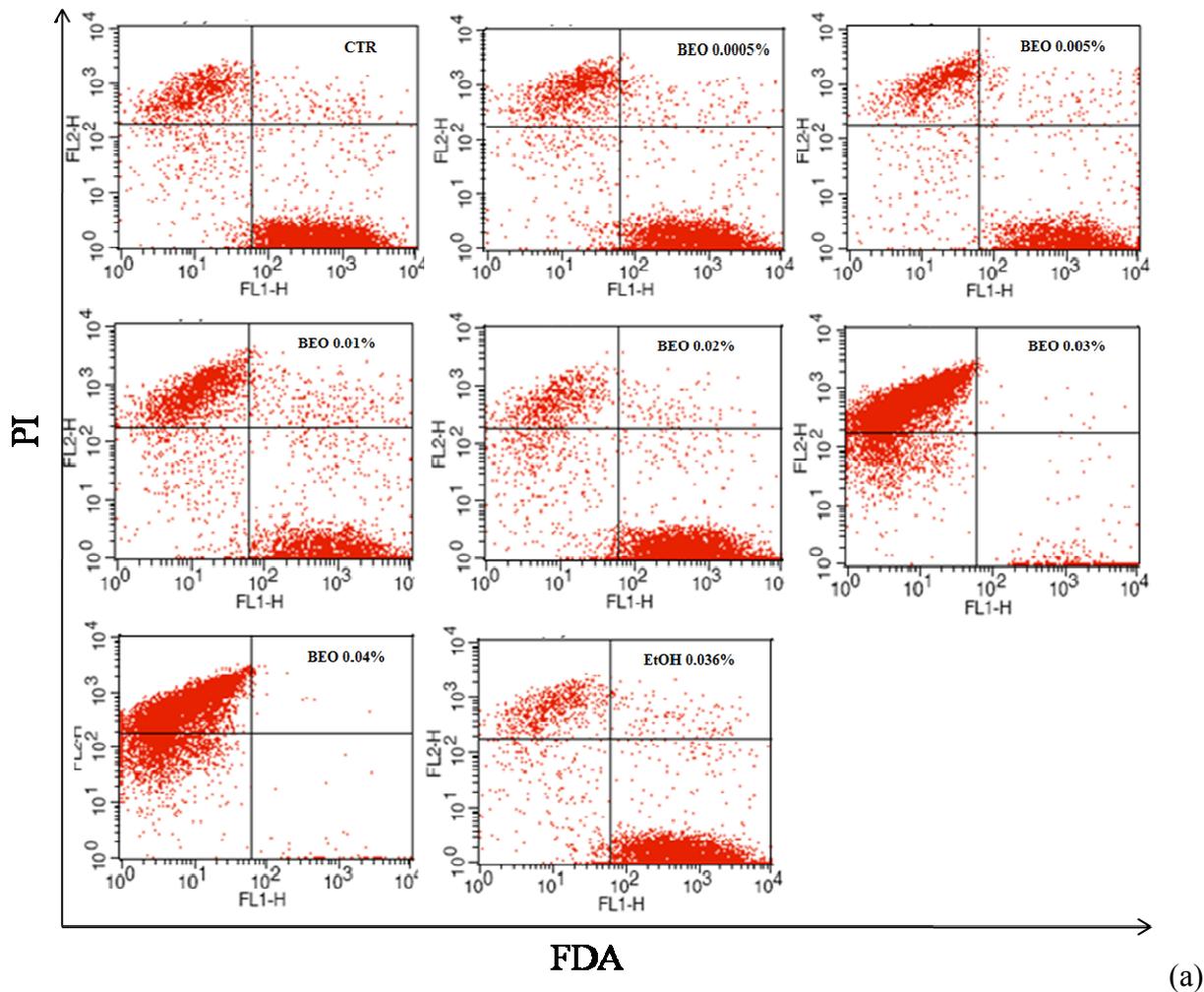


Fig.4.2. Analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare. I quadranti dei pannelli riportati in a) mostrano la distinzione delle cellule SH-SY5Y in cellule apoptotiche (quadrante in basso a sinistra), cellule necrotiche (quadrante in alto a sinistra) e cellule vitali (quadrante in basso a destra). L'esposizione al BEO 0,03 e 0,04% per 24 ore causa un aumento significativo della percentuale delle cellule necrotiche e apoptotiche ed una riduzione statisticamente significativa della percentuale delle cellule vitali. L'effetto non è attribuibile al veicolo utilizzato per diluire il BEO come risulta dall'esposizione delle colture a etanolo 0,036%, percentuale equivalente a quella presente nel BEO 0,04% (e). Nell'istogramma in b) è riportata la media \pm errore standard della percentuale delle cellule vive (FDA^+/PI^-) mentre la percentuale delle cellule apoptotiche (FDA^-/PI^-) e necrotiche (FDA^-/PI^+), è riportata negli istogrammi in c e d, rispettivamente. I valori si riferiscono alle medie \pm errore standard di 3 esperimenti indipendenti. **e***denotano $P < 0,01$ e $P < 0,001$ vs controllo. (ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per le comparazioni multiple).

Al fine di meglio caratterizzare gli effetti citotossici indotti dal BEO, è stata utilizzata la tecnica di analisi citofluorimetrica per la determinazione dell'apoptosi mediante la colorazione con PI di popolazioni cellulari permeabilizzate.

Nei pannelli della figura 4.3 sono riportati esempi tipici dei risultati dell'analisi citofluorimetrica ottenuta esponendo le colture SH-SY5Y alle diverse concentrazioni (0,0005-0,04%) di BEO, mentre, l'istogramma a barre riassume, come media \pm errore standard, i risultati ottenuti nei diversi esperimenti (n=3).

La regione designata col *marker* M1, riportata in ciascun pannello, indica, in scala logaritmica sul canale FL2-H, il *range* dei valori di fluorescenza del PI che sono attribuiti a cellule ipodiploidi.

L'incremento della percentuale di eventi ipodiploidi che si osserva in seguito all'esposizione delle colture di SH-SY5Y al BEO, risulta statisticamente significativo per concentrazioni di BEO 0,03 - 0,04%.

Nessuna variazione significativa è stata invece osservata, esponendo le colture cellulari a concentrazioni di BEO 0,0005 - 0,02% e all'etanolo 0,036% (veicolo del BEO 0,04%).

La visualizzazione della fluorescenza del PI in scala lineare ha consentito la valutazione degli effetti del BEO sul ciclo cellulare.

La figura 4.4 riporta esempi tipici dei risultati dell'analisi citofluorimetrica e della determinazione quantitativa della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare eseguita con l'ausilio del programma Modfit.

Dall'analisi dei pannelli riportati in figura 4.4 emerge che l'esposizione delle colture SH-SY5Y al BEO 0,03% e 0,04% determina variazioni significative nella distribuzione della fase G2/M del ciclo cellulare. La riduzione del picco G2/M delle colture esposte al BEO 0,03% e 0,04%, risulta statisticamente significativa rispetto alle colture controllo ($p < 0,001$).

Si osserva, inoltre, a concentrazioni di BEO superiori allo 0,02%, la tendenza delle cellule ad accumularsi nella fase S, anche se tale aumento non risulta statisticamente significativo.

L'esposizione delle colture a concentrazioni inferiori (0,0005-0,01%), mostra un profilo di distribuzione delle fasi che risulta sovrapponibile a quello delle colture controllo.

I dati ottenuti con la quantificazione percentuale della distribuzione delle fasi riportata in Fig. 4.4 **i**, potrebbero apparentemente discordare con quanto si osserva nei pannelli riportati in Fig. 4.4 **g-h** dove l'osservazione suggerirebbe una riduzione del picco G0/G1.

In realtà l'analisi del ciclo con il programma Modfit dimostra che la distribuzione degli eventi cellulari nelle fase G0/G1 dopo esposizione al BEO 0.03% e 0.04% si mantiene invariata rispetto alle colture controllo. L'effetto visivo di un'apparente riduzione deriva invece da un minor numero di eventi acquisiti considerati come cellule vitali. In altre parole, tale apparente discrepanza altro non è che una conseguenza dell'effetto citotossico del BEO alle alte concentrazioni.

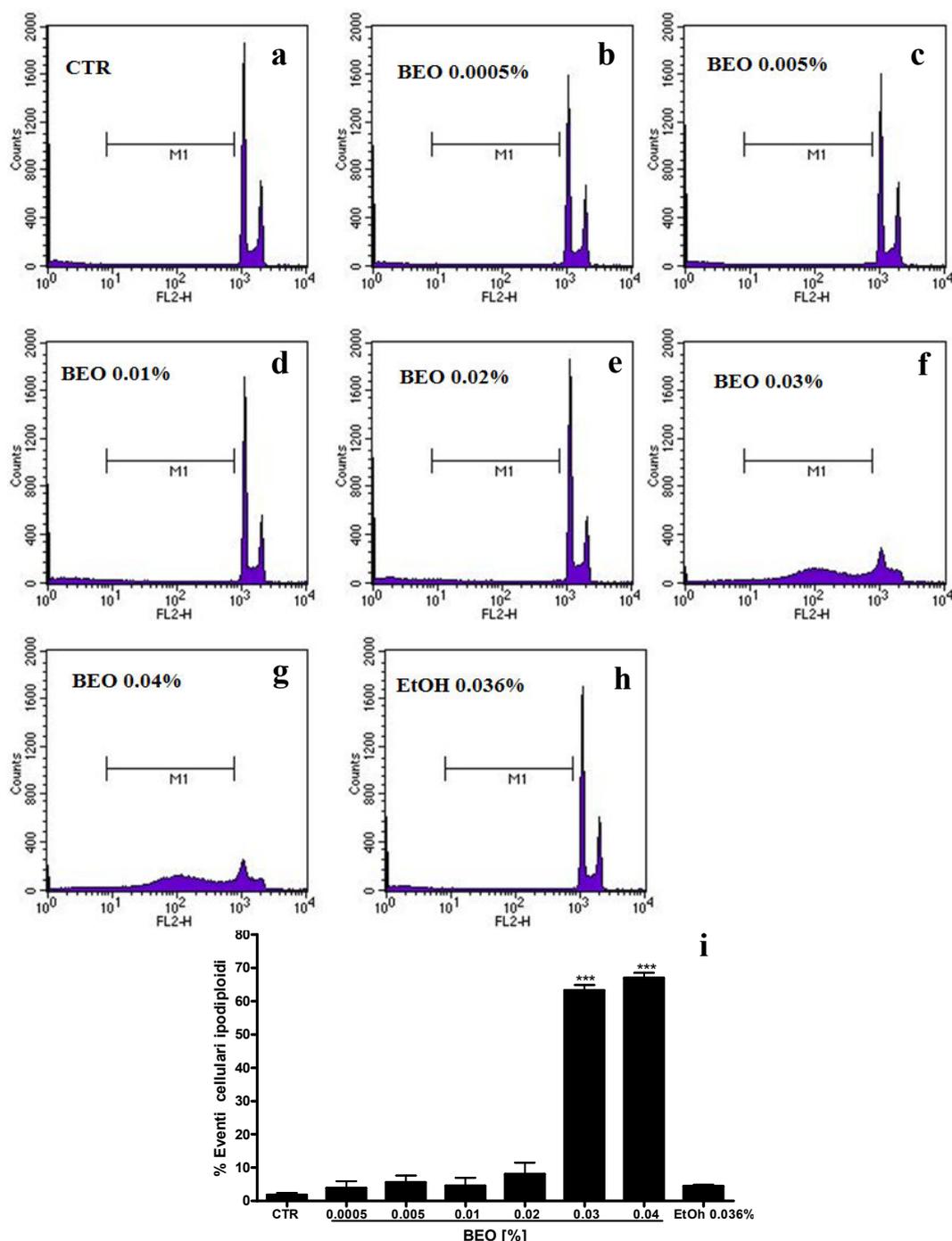


Fig.4.3 Ipodiploidia cellulare in culture di SHSY5Y esposte a concentrazioni crescenti di BEO. Esempi tipici degli eventi ipodiploidi valutati mediante analisi citofluorimetrica e indotti dall'esposizione delle culture SH-SY5Y a concentrazioni crescenti di BEO o del veicolo (etanolo; corrispondente alla massima concentrazione di BEO utilizzata 0,04%) (a-h). Il BEO 0,03-0,04% induce la formazione di eventi ipodiploidi che risulta statisticamente significativa rispetto alle culture controllo. Nessuna variazione significativa è stata osservata a concentrazioni inferiori (0,0005-0,02%) rispetto alle culture controllo. Il *marker* M1 riportato nei pannelli indica il *range* dei valori di fluorescenza attribuibili ad eventi con una quantità di DNA inferiore a $2n$. Valori di fluorescenza inferiori a 10^1 sono dati dai detriti cellulari. L'istogramma in i rappresenta la media \pm errore standard di tre esperimenti indipendenti. *** denota $P < 0,001$. (ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

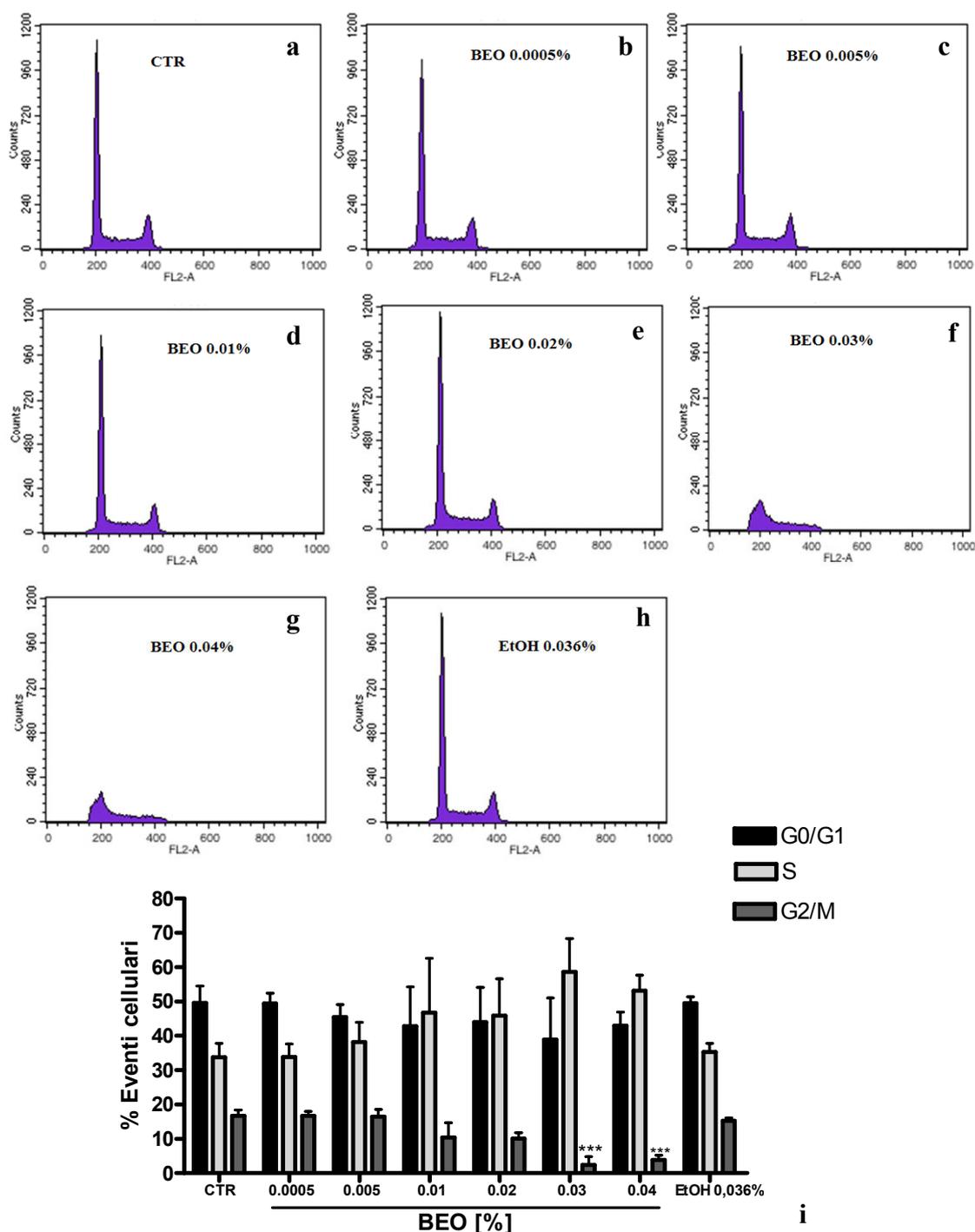


Fig.4.4. Distribuzione delle fasi ciclo cellulare in colture SHSY5Y esposte a concentrazioni crescenti di BEO. Il BEO causa una riduzione della percentuale di cellule nella fase G2/M quando impiegato alle concentrazioni 0,03%-0,04%, che risulta statisticamente significativa rispetto alle colture controllo (i). Tale effetto è associato ad un incremento delle cellule in fase S, sebbene esso non risulta statisticamente significativo. Nessuna variazione significativa si osserva con l'esposizione delle colture alle concentrazioni 0,0005-0,02%. I pannelli, a-h, rappresentano un esempio tipico di 3 esperimenti indipendenti e, l'istogramma a barre riporta la media \pm errore standard di 3 esperimenti indipendenti (ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

4.2. Effetti citotossici delle frazioni del BEO in colture SH-SY5Y.

4.2.1 Citotossicità della frazione dell'olio essenziale di bergamotto priva di bergaptene (BEO-BF) in colture di SH-SY5Y.

Poiché il BEO è costituito da una varietà di composti, le indagini successive sono state rivolte all'individuazione del componente responsabile degli effetti osservati con il BEO 0,03-0,04%, con particolare riferimento ai composti più rappresentati nell'essenza.

A tal fine l'indagine è stata estesa dapprima alla frazione di BEO deprivata del bergaptene (BEO-BF) e, successivamente, a quella deprivata del bergaptene e dei monoterpeni idrocarburi (BEO-BF/HF). La citotossicità delle suddette frazioni è stata valutata impiegando le medesime metodiche utilizzate per l'analisi del profilo citotossico del BEO fitocomplesso.

L'esposizione delle colture SH-SY5Y al BEO-BF produce effetti citotossici concentrazione – dipendenti con una riduzione della vitalità cellulare (Fig.4.5 a) ed un aumento della mortalità (Fig 4.5 b,c,d) rispetto alle colture controllo, sovrapponibili ai risultati ottenuti dall'esposizione delle colture al BEO fitocomplesso.

Alle concentrazioni 0,03% e 0,04%, il BEO-BF induce infatti:

- una riduzione dei valori di assorbanza al test MTT. Tali valori, risultanti dall'esposizione delle colture al BEO-BF 0,03 e 0,04%, sono rispettivamente 32 ± 6 e 3 ± 0 , con una riduzione che risulta statisticamente significativa ($P < 0,001$) rispetto alle colture controllo (poste pari a 100);
- un aumento statisticamente significativo della mortalità cellulare ($P < 0,001$);
- un aumento statisticamente significativo della percentuale di eventi ipodiploidi ($P < 0,001$).

Concentrazioni inferiori di BEO-BF (0,02%) inducono una significativa riduzione della vitalità cellulare (Fig. 4.5 b; $P < 0,01$) ed un aumento della mortalità, senza tuttavia produrre, a differenza dalle più alte concentrazioni, effetti rilevanti e statisticamente significativi sull'ipodiploidia.

Nessuna variazione rispetto alle colture controllo, è stata osservata esponendo le cellule a concentrazioni di BEO-BF inferiori alla 0,02%. Tale risultato è in accordo con quanto riportato in letteratura riguardo la neuroprotezione esplicata da questa frazione dell'olio nei confronti della morte cellulare indotta da NMDA nelle colture di SH-SY5Y (Corasaniti et al., 2007).

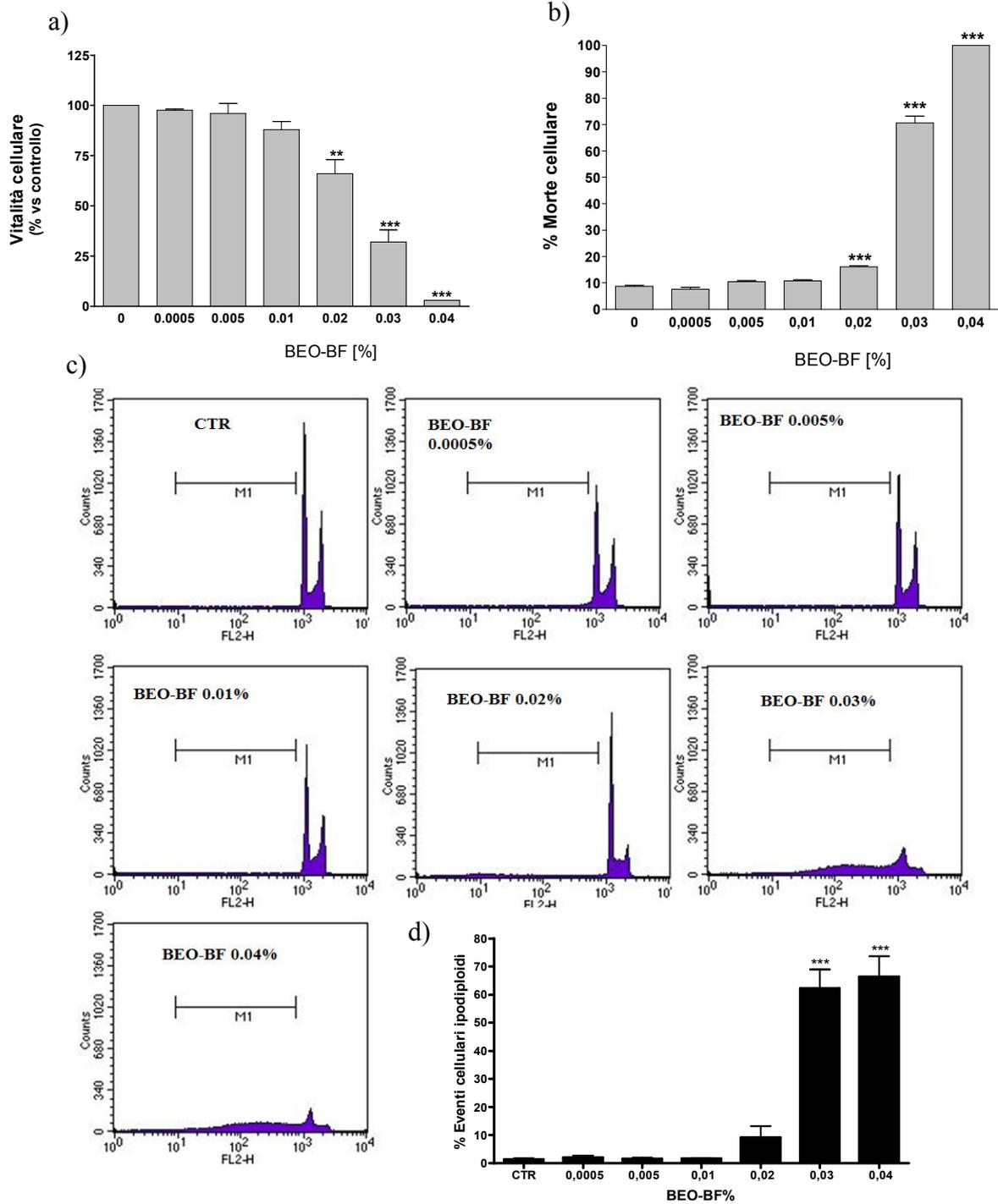


Fig.4.5. Effetti citotossici indotti dal BEO-BF nelle colture SH-SY5Y. Alle concentrazioni 0,03%-0,04% il BEO-BF causa effetti citotossici come valutato con il test di riduzione dell' MTT (a), con il test di esclusione al *trypan blue* (b) e con l'analisi citofluorimetrica dell' ipodiploidia cellulare (c) Gli effetti indotti dal BEO-BF sulla vitalità cellulare (MTT) e sulla mortalità (*trypan blue*) sono concentrazione-dipendenti, mentre, nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata negli effetti sull'ipodiploidia indotti dal BEO-BF alle concentrazioni 0,03 e 0,04%. Inoltre, il BEO-BF 0,02% determina una riduzione significativa ($P<0,01$) della vitalità cellulare (a) ed un incremento significativo ($P<0,01$) della mortalità (b), ma solo un *trend* all'aumento ($P>0,05$) dell'ipodiploidia cellulare rispetto alle colture controllo. Concentrazioni di BEO-BF inferiori a 0,02% non determinano alcuna variazione significativa dei parametri analizzati rispetto al controllo. In a), b) e d) sono riportate le medie \pm errore standard di 4-12 esperimenti indipendenti. **e *** denota $P<0,01$ e $P<0,001$ (ANOVA seguita dal test Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

4.2.2. Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in colture SH-SY5Y esposte al BEO-BF.

In figura 4.6 sono riportati gli istogrammi (**a-g**) relativi all'analisi degli effetti sul ciclo cellulare ottenuti esponendo le colture di neuroblastoma SH-SY5Y al BEO-BF.

I dati relativi alla distribuzione delle cellule di SH-SY5Y nelle fasi del ciclo mostrano un profilo che risulta sovrapponibile a quello del fitocomplesso.

L'esposizione delle colture di neuroblastoma alle concentrazioni di BEO-BF 0,03%-0,04%, produce, infatti, una riduzione significativa delle cellule in fase G2/M e l'aumento non statisticamente significativo della percentuale di cellule in fase S, rispetto alle colture controllo.

La percentuale delle cellule in fase G0/G1 dopo esposizione al BEO 0,03% e 0,04% non presenta variazioni significative rispetto alle colture controllo.

Similmente ai risultati ottenuti con il BEO fitocomplesso, nessuna variazione statisticamente significativa nel ciclo cellulare, è stata riscontrata esponendo le cellule SH-SY5Y a concentrazioni di BEO-BF comprese tra 0,0005% e 0,02%, rispetto alle colture controllo.

La sovrapponibilità degli effetti del BEO-BF con quelli ottenuti in seguito ad esposizione al BEO ha consentito di escludere il bergaptene quale principio responsabile della citotossicità indotta dal BEO 0,03% e 0,04% nelle colture SH-SY5Y.

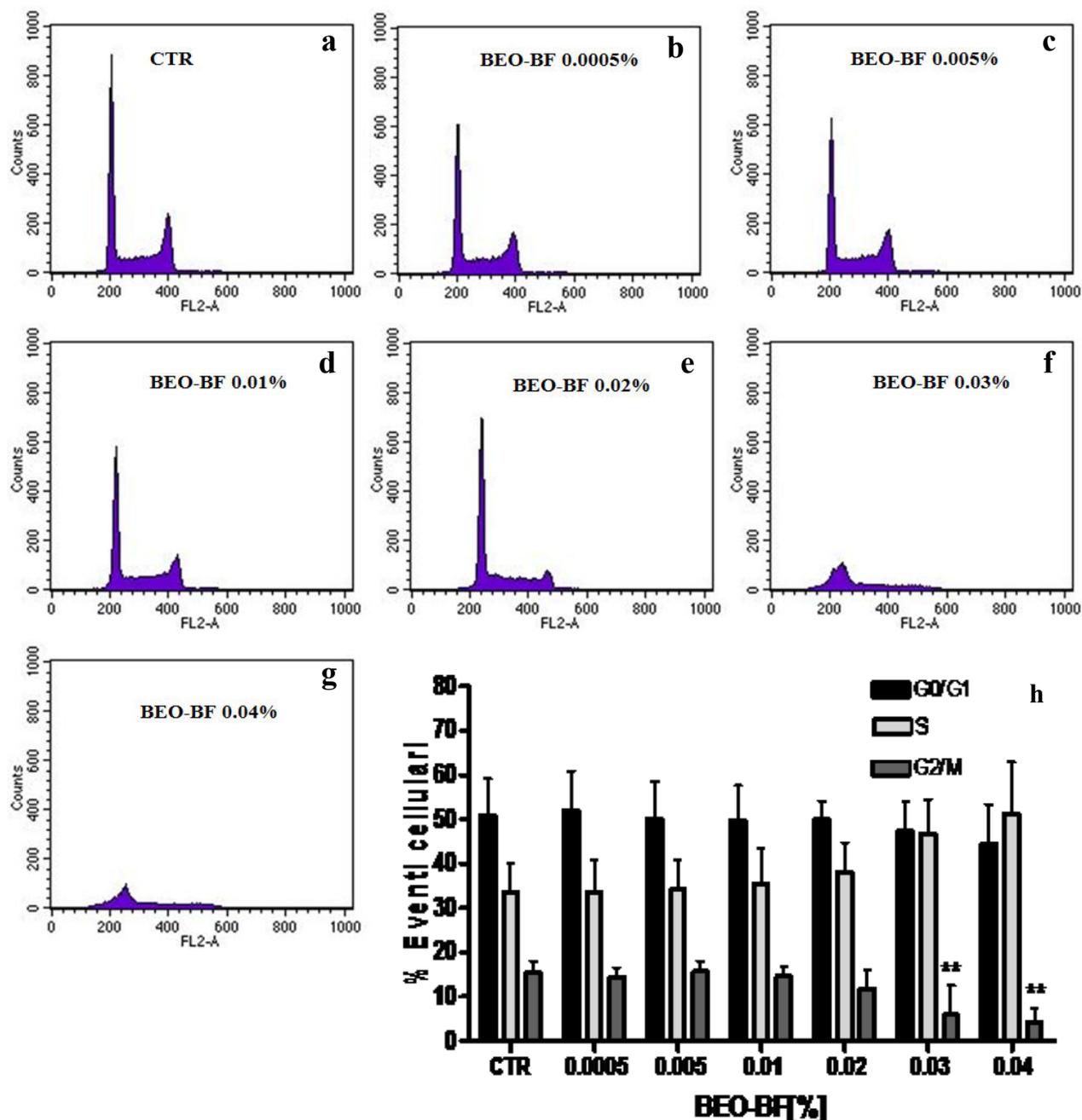


Fig.4.6. Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in colture SH-SY5Y esposte al BEO-BF. Il BEO-BF 0,03%-0,04% induce una riduzione statisticamente significativa del picco G2/M ed un accumulo delle cellule in fase S, rispetto alle colture controllo, mentre non modifica la percentuale delle cellule in fase G0/G1. Concentrazioni inferiori di BEO-BF (0,005-0,02%), non determinano variazioni della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare rispetto alle colture controllo. I pannelli (a-g) rappresentano un esempio tipico di 3 esperimenti indipendenti la cui media \pm errore standard è riportata in h. ** denota $P < 0,01$ (ANOVA seguito dal test di Tukey-Kramer per le comparazioni multiple.)

4.2.3 Effetti citotossici indotti dal BEO-BF/HF in colture SH-SY5Y.

I risultati ottenuti con la frazione deprivata del bergaptene (BEO-BF), hanno permesso di escludere il 5-MOP (bergaptene) quale principio attivo responsabile della citotossicità indotta dal BEO. Pertanto, le indagini successive, sono state effettuate impiegando la frazione dell'olio deprivata del bergaptene e dei monoterpeni idrocarburi (BEO-BF/HF) alle concentrazioni corrispondenti, in termini di terpeni ossigenati (linalolo e linalile acetato), a quelle presenti nell'intera essenza.

La deterpenazione degli olii essenziali destinati alla produzione di prodotti cosmetici, viene eseguita allo scopo di deprivare le essenze di composti, come i monoterpeni idrocarburi che, in seguito a reazioni di ossidazione, risulterebbero irritanti per la cute (Rolset et al., 2002).

La percentuale dei composti ossigenati (linalolo e linalile acetato) presente nel BEO-BF/HF risulta pari al doppio di quella presente nel fitocomplesso poiché, il processo di deterpenazione, prevede una concentrazione dell'olio pari a due volte quella iniziale.

L'analisi della frazione deterpenata è stata condotta impiegando il BEO-BF/HF a concentrazioni 0,005%, 0,01% e 0,02%, nelle quali la percentuale totale dei terpeni ossigenati, data dalla somma di linalolo e linalile acetato, è uguale a quella presente nel BEO 0,01%, 0,02% e 0,04%.

La figura 4.7 riporta l'analisi degli effetti prodotti dal BEO-BF/HF nelle colture di neuroblastoma. L'esposizione delle colture SH-SY5Y al BEO-BF/HF 0,02%, determina una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare ($P < 0,05$ vs controllo) (a) ed un incremento significativo della mortalità ($P < 0,001$ vs controllo) (b). Tuttavia, sia la riduzione dell'assorbanza dell'MTT che l'incremento della percentuale di cellule positive al *trypan blue*, benché statisticamente significativi, non risultano quantitativamente paragonabili a quelli prodotti dal BEO 0,04% (Fig. 4.1a-b). I valori di assorbanza al test MTT delle colture SH-SY5Y esposte al BEO 0,04% sono pari a 0,015 e riportano una riduzione della vitalità cellulare

pari al 97% rispetto alle colture controllo. L'esposizione delle colture al BEO-BF/HF 0,02%, causa, invece, una riduzione della vitalità pari al 29% (Controllo: 0,603; BEO-BF/HF 0,02%: 0,429)

Relativamente all'analisi della mortalità cellulare, la percentuale di cellule positive al *trypan blue* dopo esposizione al BEO 0,04% è pari al 100%, nettamente inferiore risulta invece la percentuale di morte rilevata dopo esposizione al BEO-BF/HF 0,02% (21%).

Inoltre, sebbene l'esposizione al BEO-HF/BF 0,02% aumenti la percentuale di cellule ipodiploidi (c,d), tale aumento non risulta statisticamente significativo rispetto alle colture controllo ($P > 0.05$).

I risultati dello studio degli effetti del BEO-BF/HF sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare, riportati in figura 4.7 (e,f), non documentano variazioni significative rispetto alle colture controllo a differenza di quanto osservato con il BEO fitocomplesso. Tali osservazioni sperimentali suggeriscono che i monoterpeni idrocarburi, dei quali la frazione analizzata è priva, siano potenzialmente responsabili degli effetti tossici del BEO.

Il BEO-BF/HF impiegato alle concentrazioni 0,005% e 0,01% non determina effetti citotossici come valutato mediante il test di vitalità MTT, test di esclusione *trypan blue* e analisi citofluorimetrica dell'ipodiploidia cellulare.

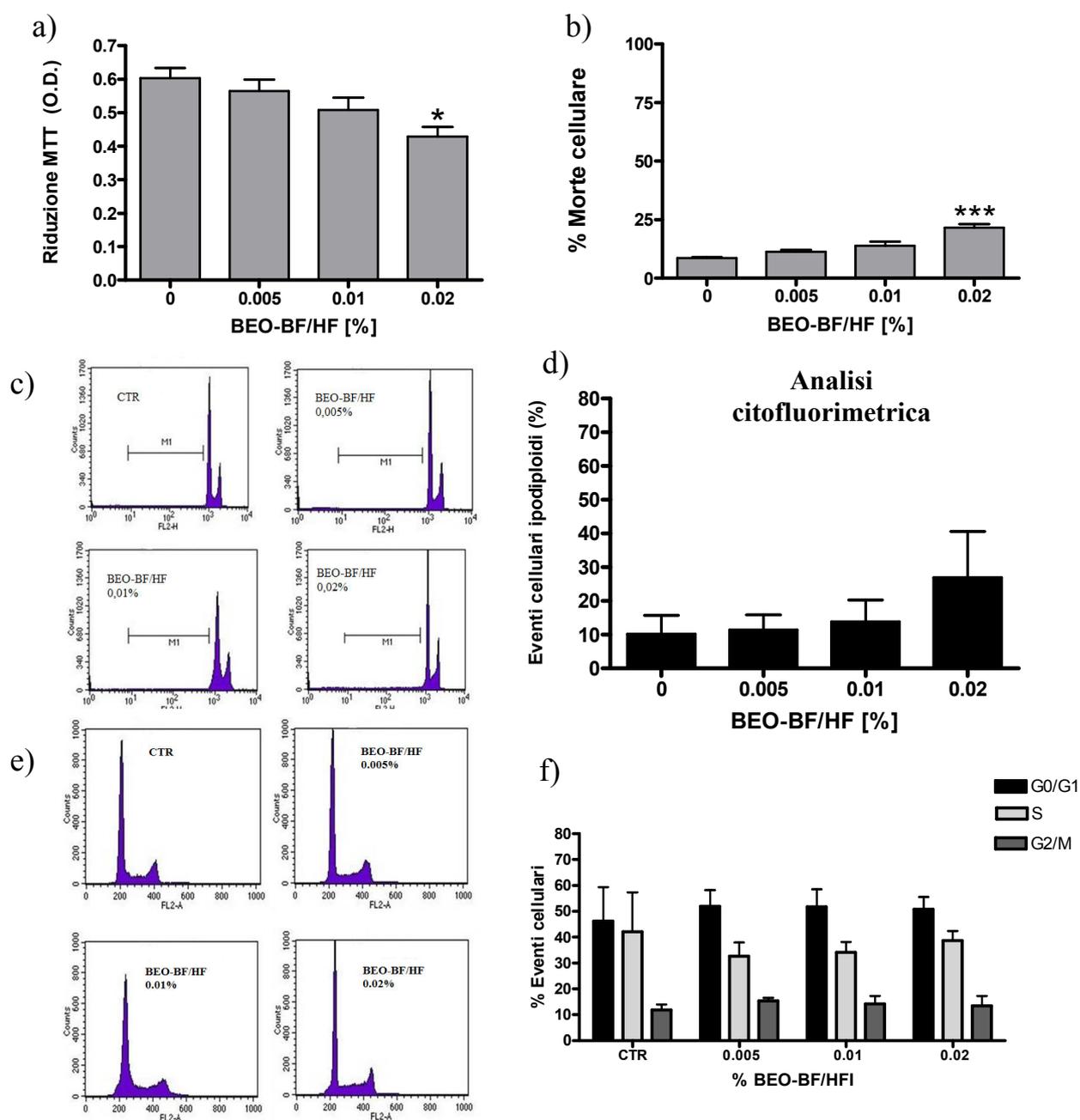


Fig.4.7. Effetti della frazione diterpenata BEO-BF/HF su colture di SH-SY5Y. Il BEO-BF/HF, una frazione del BEO deprivata del bergaptene e dei monoterpene idrocarburi, causa una significativa morte cellulare nelle cellule SH-SY5Y, come valutato mediante il saggio di vitalità cellulare MTT (a), il test di esclusione al *trypan blue* (b) e analisi citofluorimetrica degli eventi ipodiploidi (c,d). Nessuna variazione significativa della distribuzione nelle fasi del ciclo cellulare è stata osservata (e,f), rispetto alle colture controllo. I pannelli riportati in c ed in e, rappresentano un esempio tipico di 3 esperimenti indipendenti della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare (c) e dell'ipodiploidia (e).

I valori riportati negli istogrammi a barre a,b,d,f, rappresentano la media \pm errore standard di 3-5 esperimenti indipendenti. * e *** denotano $P < 0,05$ e $P < 0,001$. (ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per le comparazione multiple).

4.3 Effetti di alcuni componenti del BEO sulla ipodiploidia e sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in cellule SH-SY5Y.

Sulla base dei risultati ottenuti con la frazione deterpenata, le indagini successive hanno avuto come oggetto di studio la valutazione degli effetti esplicati dai composti maggiormente rappresentati sia nella frazione volatile che non volatile del BEO.

Tale valutazione è stata condotta esponendo le colture di neuroblastoma ai singoli componenti a concentrazioni equivalenti a quelle presenti nell'intera essenza.

4.3.1. Bergaptene o 5-MOP.

I risultati ottenuti esponendo le colture di neuroblastoma alle frazioni del BEO, hanno evidenziato che la frazione dell'olio deprivata del bergaptene (BEO-BF) riproduce gli effetti osservati con il fitocomplesso.

Questa osservazione suggerisce che il 5-MOP non sia responsabile degli effetti citotossici indotti dal BEO.

Al fine di confermare quanto indicato dai risultati dei precedenti esperimenti, le colture di neuroblastoma sono state esposte al bergaptene, a concentrazioni equivalenti a quelle presenti nelle diluizioni dell'olio essenziale impiegate nella prima parte dello studio.

Le concentrazioni di bergaptene utilizzate sono state le corrispondenti al BEO 0,01%, 0,02% e 0,04%, dal momento che nessuna variazione è stata osservata a concentrazioni inferiori alla 0,01% e nessuna differenza dell'effetto è stata rilevata tra il BEO 0,03% ed il BEO 0,04% nella valutazione dell'ipodiploidia cellulare.

Secondo il certificato di analisi, la quantità di bergaptene contenuta nel BEO è pari a 3500 mg/Kg, corrispondente allo 0,35% dell'intera essenza.

In particolare, il 5-MOP è stato testato alle seguenti concentrazioni: 0,000035%, 0,000070% e 0,000140% corrispondente in termini di molarità a 1.6, 3.2 e 6.4 μ M.

Al fine di escludere la presenza di eventuali effetti imputabili al veicolo utilizzato per la preparazione delle soluzioni di bergaptene, le colture cellulari sono state esposte a DMSO 0,140% corrispondente al veicolo del bergaptene 0,000140%.

Gli effetti del bergaptene sono stati valutati eseguendo l'analisi citofluorimetrica dell'ipodiploidia cellulare e della distribuzione delle fasi del ciclo.

I risultati ottenuti sono riportati in figura 4.8.

La quantificazione della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare, non mostra alcuna variazione significativa nelle colture esposte al bergaptene rispetto alle colture controllo; inoltre, il DMSO non modifica la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare.

L'analisi dell'ipodiploidia documenta che l'esposizione delle cellule SH-SY5Y al bergaptene, non determina variazioni significative rispetto alle colture controllo.

Nel complesso, i risultati ottenuti esponendo le cellule SH-SY5Y al BEO-BF ed al bergaptene, indicano che il bergaptene non è il principio responsabile della citotossicità del fitocomplesso.

L'esclusione del bergaptene, unitamente ai risultati ottenuti esponendo le colture cellulari alla frazione diterpenata dell'olio, hanno suggerito il coinvolgimento dei monoterpeni idrocarburi, presenti nella frazione volatile dell'olio, nella citotossicità indotta dal BEO.

Pertanto, le indagini successive sono state condotte impiegando i monoterpeni idrocarburi più rappresentati nell'olio, alle concentrazioni equivalenti a quelle presenti nel BEO.

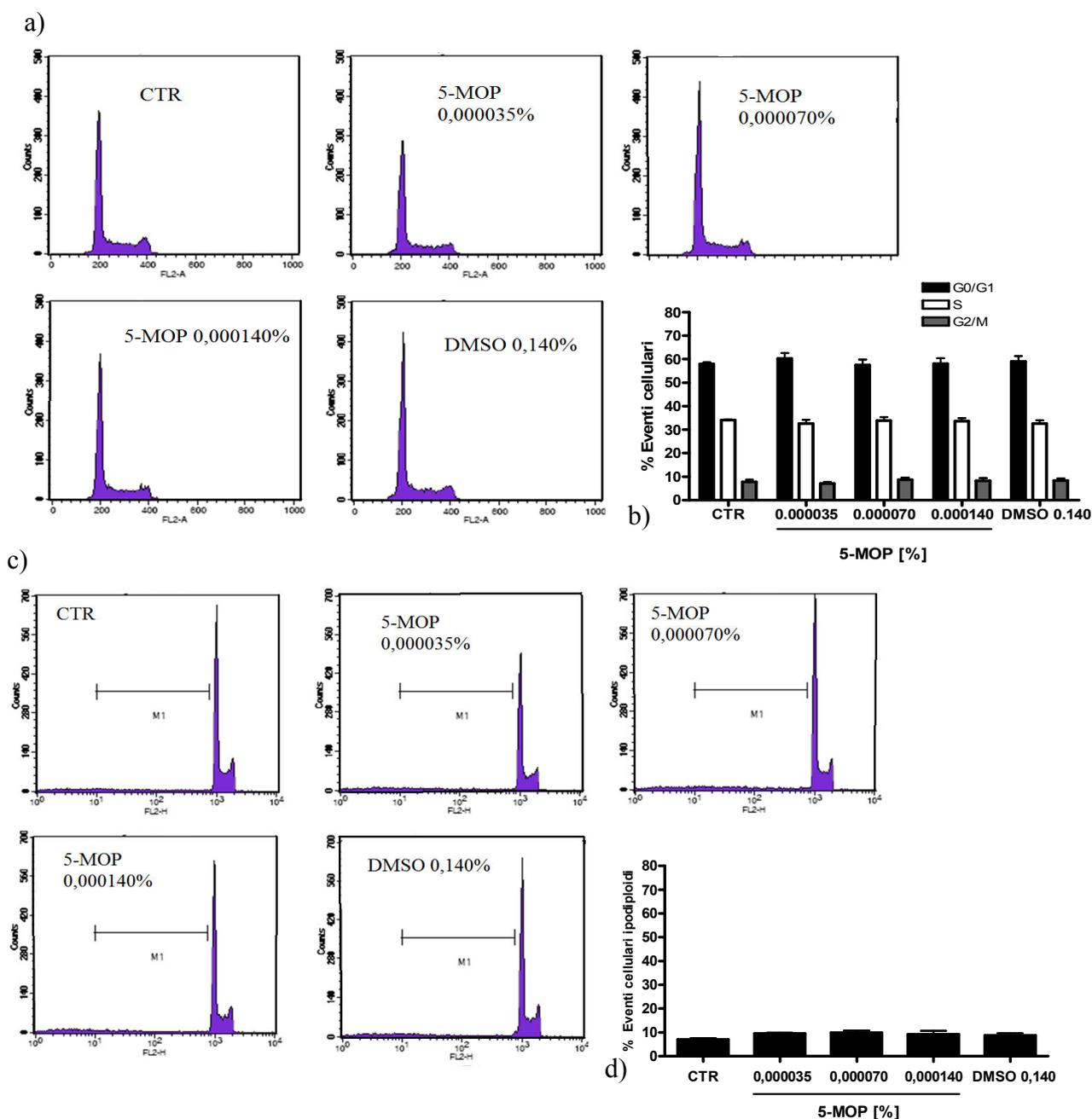


Fig.4.8. Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare ed ipodiploidia in SH-SY5Y esposte 5-MOP. Le colture di neuroblastoma sono state esposte per 24 ore al 5-MOP impiegato a concentrazioni corrispondenti a quelle presenti nel BEO 0,01-0,02-0,04%. In a e c, sono riportati esempi tipici derivanti dall'analisi citofluorimetrica della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare (a) e dell'ipodiploidia cellulare (c).

In b e d, sono invece riportate le medie \pm errore standard ($n=3$ esperimenti indipendenti) della percentuale di distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare (b) e della percentuale degli eventi ipodiploidi (d). Il bergaptene non induce alcuna variazione significativa ($P>0,05$; ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per le comparazioni multiple) della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare (a,b) e dell'ipodiploidia cellulare (c,d) rispetto alle colture controllo.

4.3.2. Effetti dei monoterpeni idrocarburi sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare e sull'ipodiploidia in colture SH-SY5Y.

I terpeni sono una classe di composti molto rappresentati negli olii essenziali. Essi sono formati da diverse combinazioni dell'unità base definita isoprene. Le unità isopreniche vengono sintetizzate a partire da precursori che originano dalla via del mevalonato che porta alla sintesi del colesterolo (Elson, 1995).

Tra le varie classi di terpeni, i monoterpeni sono formati dall'unione di due unità isopreniche.

Come precedentemente riportato, i monoterpeni idrocarburi più rappresentati nel BEO sono il limonene, β -pinene e γ -terpinene.

Nel BEO il limonene costituisce il 37,98% dell'olio, pertanto le concentrazioni di limonene corrispondenti al BEO 0,01-0,02-0,04% sono pari a 0,004%, 0,008% e 0,016%.

Esprese in termini di molarità, le concentrazioni di limonene impiegate sono comprese tra 247 (limonene 0,004%) e 988 μ M, quest'ultima corrispondente al limonene 0,016% presente nel BEO 0,04%.

β -pinene e γ -terpinene costituiscono, rispettivamente, il 6% ed il 7% dell'essenza e le concentrazioni impiegate per gli esperimenti sono state:

- 0,0006, 0,0012 e 0,0024% per il β -pinene;
- 0,0007, 0,0014 e 0,0028% per il γ -terpinene.

Esprese in termini di molarità, le concentrazioni di β -pinene impiegate corrispondono a 38,4 (0,0006%), 75,8 (0,0012%) e 153,6 μ M (0,0024%) mentre quelle del γ -terpinene sono 43,5 (0,0007%), 87 (0,0014%) e 174 μ M (0,0028%).

Dei tre costituenti è stato valutato l'effetto sulla distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare e sulla presenza di eventi ipodiploidi.

Come mostrato in Fig. 4.9, l'esposizione delle colture SH-SY5Y a concentrazioni di limonene corrispondenti a quelle presenti nelle concentrazioni citotossiche del BEO, non modifica il

profilo di distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo cellulare rispetto alle colture controllo (a,d). L'assenza di effetto è riscontrabile anche in seguito ad esposizione al β -pinene (b,e) e al γ -terpinene (c,f).

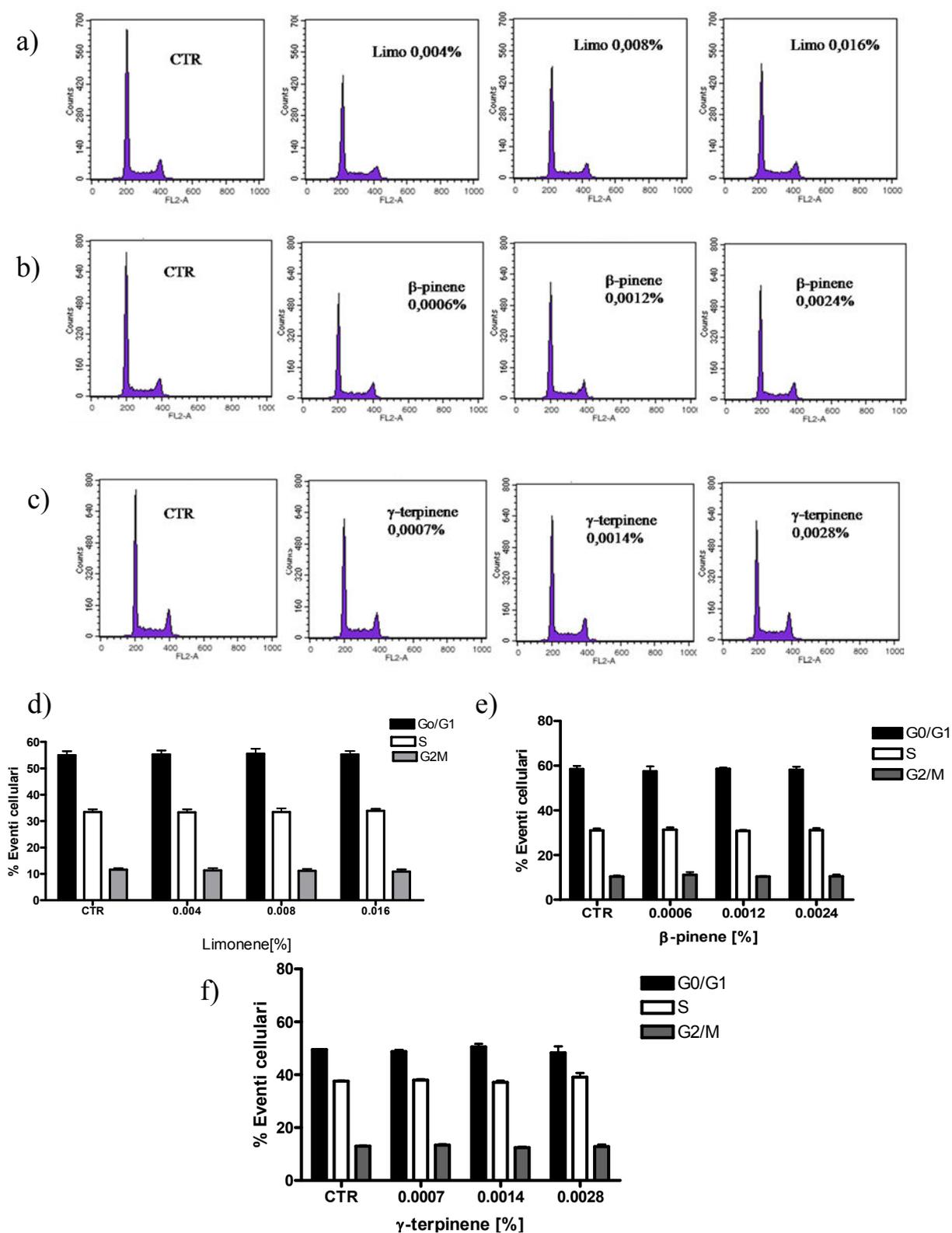


Fig.4.9. Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare delle colture SH-SY5Y esposte a limonene, β -pinene e γ -terpinene. Le colture di neuroblastoma sono state esposte per 24 ore a limonene, β -pinene e γ -terpinene impiegati a concentrazioni equivalenti a quelle presenti nel BEO 0,01,0,02 e 0,04%. In a, b e c, sono riportati esempi tipici derivanti dall'analisi citofluorimetrica. Nessuna variazione nelle distribuzioni delle fasi del ciclo cellulare è stata osservata con l'esposizione al limonene (a,d), β -pinene (b,e) e γ -terpinene (c,f). Gli istogrammi rappresentano la media \pm errore standard di 3 esperimenti indipendenti ($P > 0,05$ ANOVA seguito dal test Tukey-kramer per le comparazioni multiple)

La figura 4.10 riporta le percentuali di ipodiploidia osservate esponendo le colture SH-SY5Y alle diverse concentrazioni di limonene, β -pinene e γ -terpinene.

L'esposizione al limonene 0,004% corrispondente al BEO 0,01%, ha causato una variazione statisticamente significativa ($P < 0,05$) della percentuale di eventi ipodiploidi rispetto alle colture controllo, mentre nessuna variazione è stata osservata con il β -pinene ed il γ -terpinene impiegati alle concentrazioni corrispondenti al BEO 0,01%.

Sebbene in letteratura è riportato che il limonene induce apoptosi in cellule di tumore gastrico umano (Lu et al., 2003), nessuna variazione significativa rispetto alle colture controllo, è stata osservata in seguito ad esposizione delle cellule SH-SY5Y al limonene 0,016% (988 μ M) nella presenza di eventi ipodiploidi.

I risultati ottenuti hanno consentito di concludere che il limonene, benché sia presente in percentuale elevata nel fitocomplesso, non è responsabile della citotossicità indotta dal BEO.

Sulla base dei risultati ottenuti con le frazioni, con il bergaptene ed i monoterpeni idrocarburi, le indagini successive sono state condotte impiegando i composti ossigenati più rappresentati nella frazione volatile, ovvero il linalolo ed il linalile acetato.

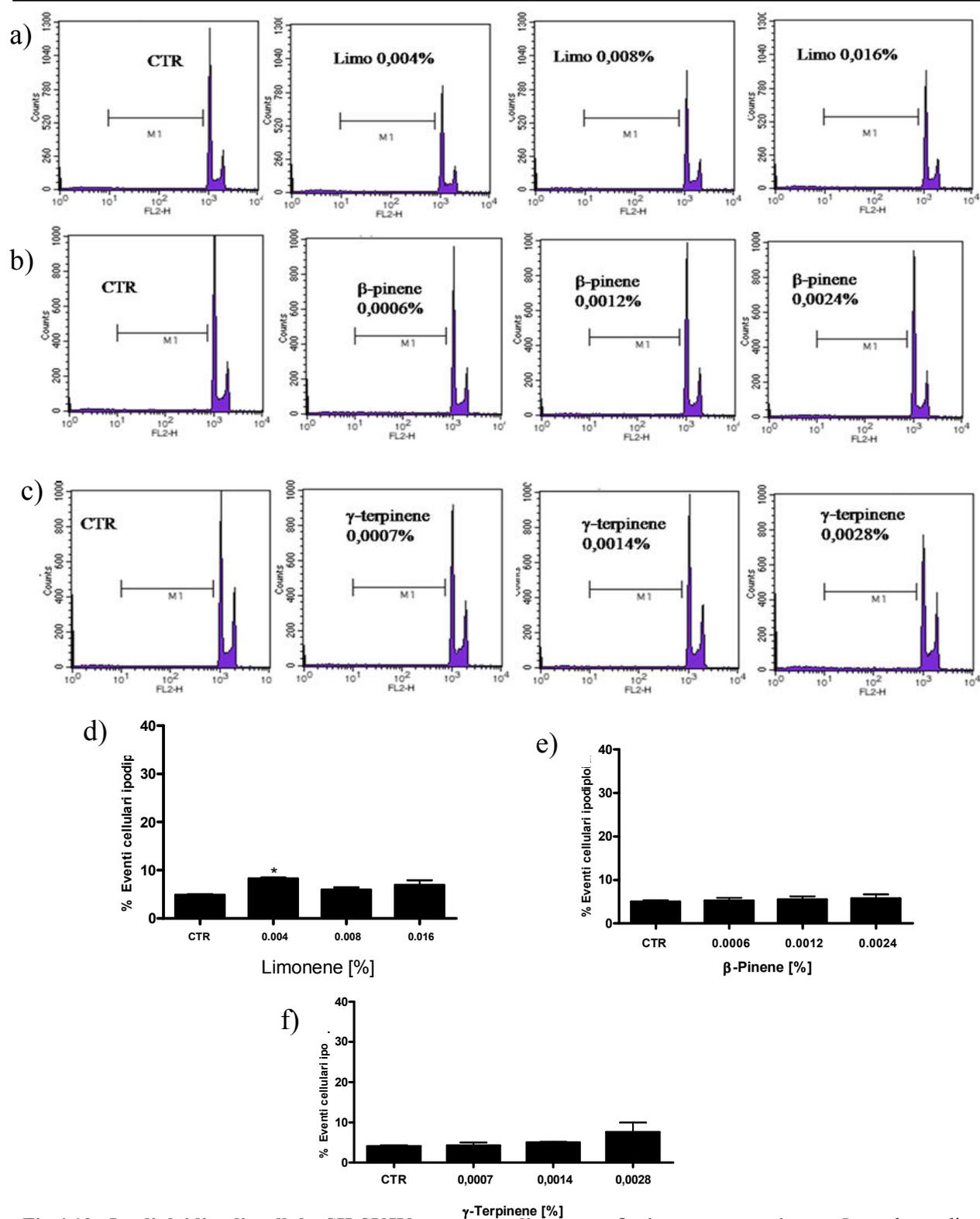


Fig.4.10. Ipodiploidia di cellule SH-SY5Y esposte a limonene, β -pinene e γ -terpinene. Le colture di neuroblastoma sono state esposte per 24 ore a limonene, β -pinene e γ -terpinene impiegati a concentrazioni equivalenti a quelle presenti nel BEO 0,01,0,02 e 0,04%. Solo l'esposizione al limonene 0,004% determina una percentuale di ipodiploidia che risulta statisticamente significativa ($P < 0,05$) rispetto alle colture controllo (a,d). Nessuna variazione significativa è stata osservata esponendo le colture cellulari a β -pinene e γ -terpinene. Gli istogrammi riportati in d,e e f rappresentano la media \pm errore standard di 2-3 esperimenti indipendenti (ANOVA seguito dal test di Tukey-Kramer per le comparazioni multiple).

4.3.3 Citotossicità dei terpeni ossigenati presenti nel BEO.

I terpeni ossigenati più rappresentati nel BEO sono il linalolo ed il linalile acetato che costituiscono, rispettivamente, il 9,83 e 30,03 % dell'intera essenza.

Linalolo e linalile acetato sono stati utilizzati alle concentrazioni corrispondenti al BEO 0,005%, 0,01%, 0,02% e 0,04%.

Le concentrazioni, espresse in termini di molarità sono comprese tra 28-224 μM per il linalolo e 137-1106 μM per il linalile acetato.

La figura 4.11 mostra i pannelli relativi alla distribuzione delle cellule SH-SY5Y nelle fasi del ciclo cellulare. Come riportato in figura, nessuna variazione significativa è stata osservata, rispetto alle colture controllo, esponendo le cellule ai singoli composti in esame.

Anche l'analisi dell' ipodiploidia, riportata in fig.4.12, mostra come non si osservi alcun effetto sulla percentuale di eventi ipodiploidi rispetto alle colture controllo, né con l'esposizione al linalolo, né con l'esposizione al linalile acetato.

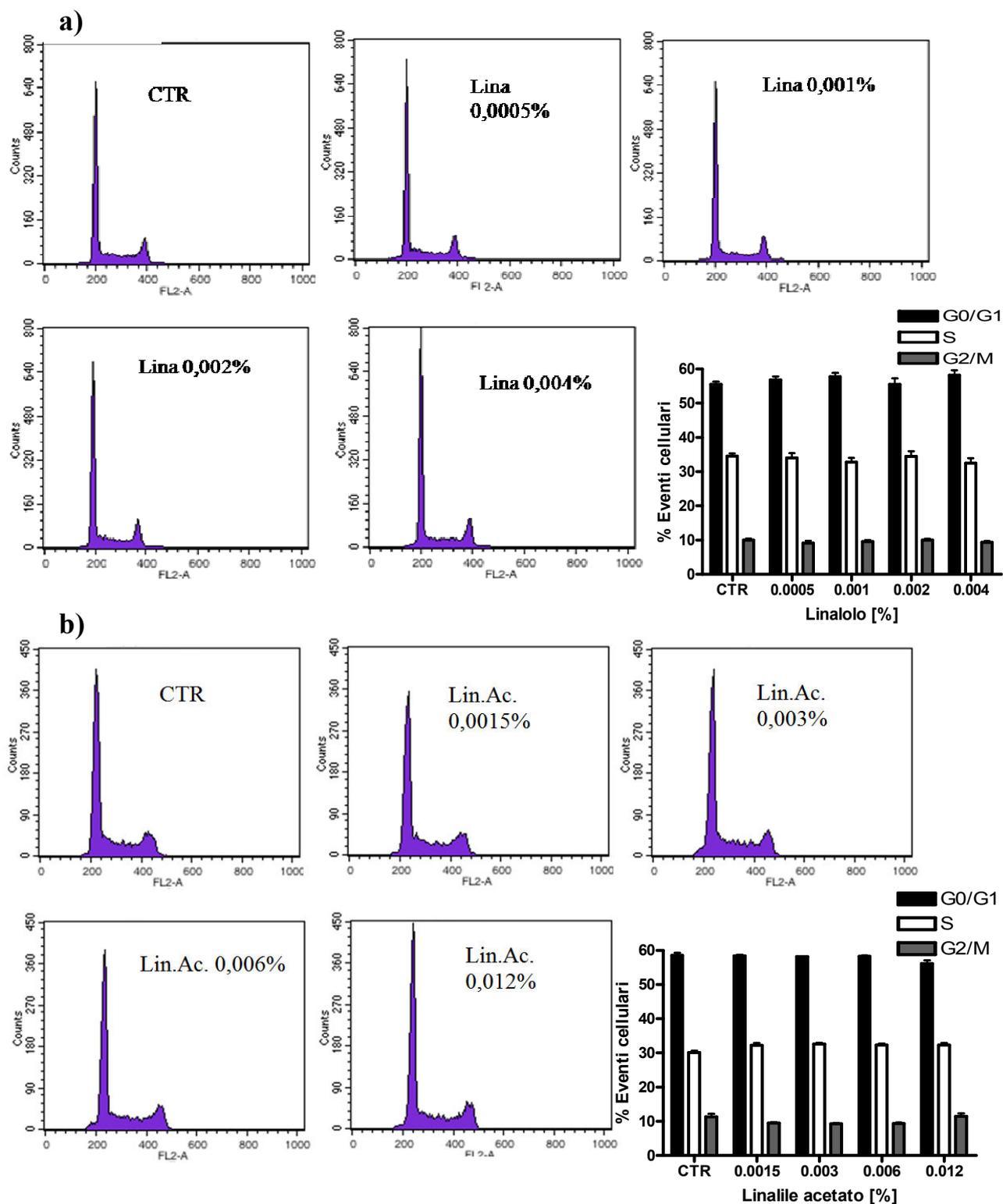


Fig.4.11. Analisi del ciclo cellulare in colture esposte al linalolo o al linalil acetato. Le colture SH-SY5Y sono state esposte per 24 ore al linalolo ed al linalil acetato impiegati a concentrazioni equivalenti a quelle presenti nel BEO 0,005-0,04%. Nessuna variazione significativa ($P > 0,05$) della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare è stata osservata in seguito ad esposizione a linalolo (a) e linalil acetato (b). Gli istogrammi riportano la media \pm errore standard di 3-sperimenti indipendenti.(ANOVA seguita dal Tukey-Kramer test per le comparazioni multiple)

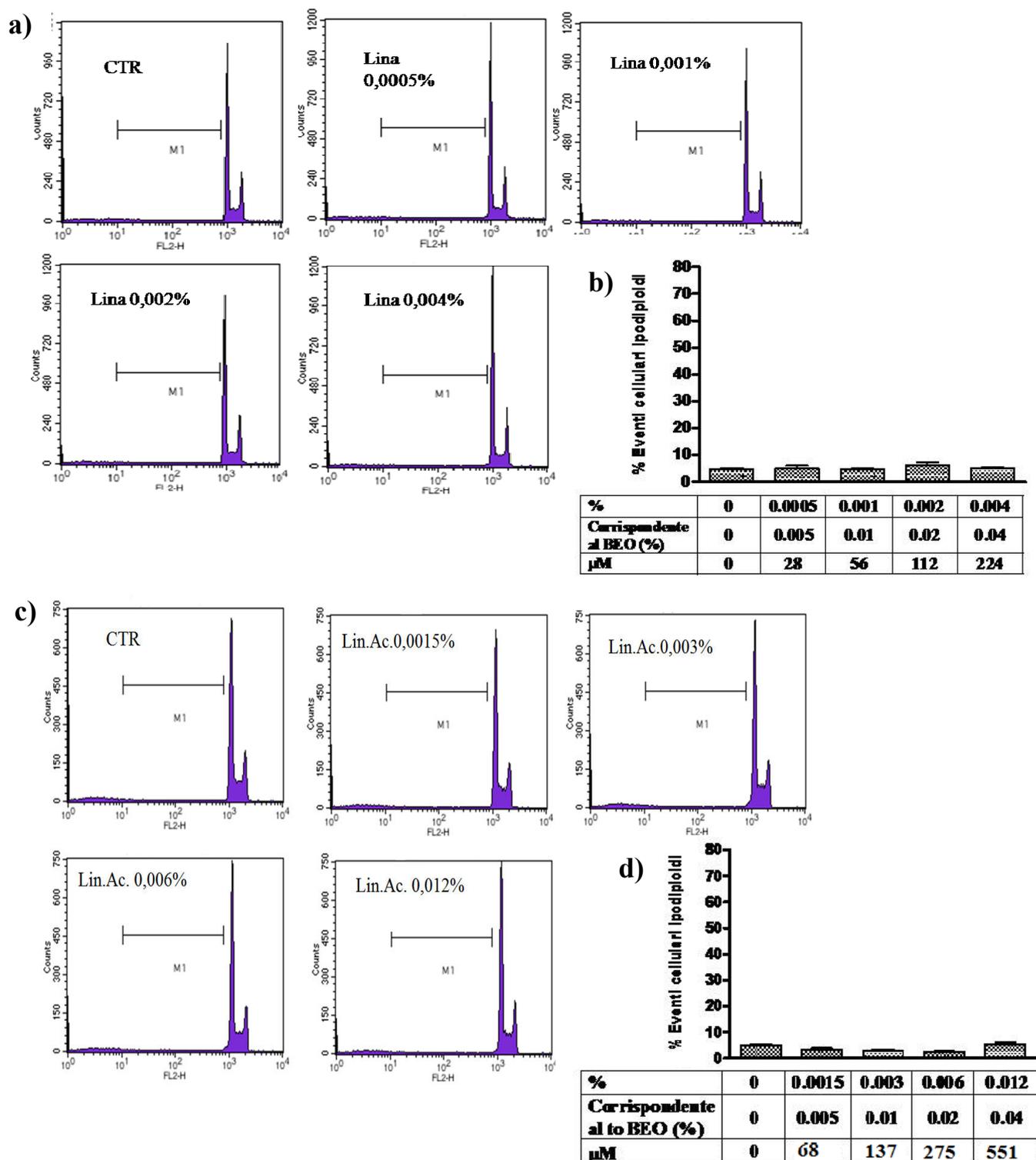


Fig.4.12. Analisi dell'ipodiploidia in colture SH-SY5Y esposte al linalolo o al linalile acetato. Le colture SH-SY5Y sono state esposte per 24 ore al linalolo ed al linalile acetato, impiegati a concentrazioni equivalenti a quelle presenti nel BEO 0,005-0,04%. In **a)** ed in **c)** sono riportati esempi tipici derivanti dall'analisi citofluorimetrica di cellule SH-SY5Y esposte al linalolo (**a)** o al linalile acetato (**c)**). Gli istogrammi a barre in **b)** e in **d)** rappresentano la media \pm errore standard di 3 esperimenti indipendenti. Rispetto alle colture controllo, il linalolo ed il linalile acetato non modificano la percentuale di eventi ipodiploidi ($P > 0,05$ ANOVA seguita dal test Tukey-kramer per le comparazioni multiple).

4.3.4. Sinergismo tra componenti del BEO.

I risultati ottenuti in seguito all'esposizione delle colture SH-SY5Y alle frazioni del BEO ed ai singoli componenti più rappresentati della frazione volatile e di quella non volatile dell'essenza, hanno suggerito che alla base della citotossicità osservata con il fitocomplesso, potesse esserci un effetto sinergico tra i costituenti.

Pertanto, le indagini successive sono state condotte impiegando miscele tra i costituenti più rappresentati nella frazione volatile dell'essenza.

Gli esperimenti sono stati condotti esponendo per 24 ore le colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y, a soluzioni contenenti limonene e linalolo e, successivamente, a soluzioni contenenti limonene e linalile acetato.

I composti sono stati impiegati alle concentrazioni equivalenti a quelle presenti nella concentrazione di BEO risultata citotossica (0,04%).

La citotossicità è stata valutata in termini di ipodiploidia cellulare.

La figura 4.13. (a-f) riporta i pannelli derivati dall'analisi citofluorimetrica delle colture SH-SY5Y esposte a limonene, linalolo e linalile acetato impiegati sia singolarmente che nelle due diverse associazioni.

L'esposizione delle colture cellulari all'associazione costituita da limonene 0,016% e linalile acetato 0,012%, produce un effetto sovrapponibile a quello del BEO fitocomplesso sull'ipodiploidia cellulare e sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare, mentre nessuna variazione è stata osservata esponendo le colture all'associazione limonene 0,016% e linalolo 0,004%.

L'associazione fra limonene e linalile acetato produce un significativo aumento degli eventi ipodiploidi se paragonato sia alle colture controllo che alla tossicità dei singoli componenti.

La percentuale di eventi ipodiploidi riportati nella regione designata dal *marker* M1, ottenuta in seguito all'esposizione al limonene e linalile acetato, risulta pari a $78,5\% \pm 3.3$, percentuale

questa, superiore ($P < 0,05$) alla percentuale di eventi ipodiploidi indotta dal BEO 0,04% ($67\% \pm 1.5$)

Anche la distribuzione delle fasi del ciclo cellulare delle colture esposte all'associazione tra limonene 0,016% e linalile acetato 0,012% (Fig.4.14) descrive un profilo che risulta sovrapponibile a quello del BEO. Infatti, l'esposizione delle colture SH-SY5Y all'associazione limonene + linalile acetato causa una riduzione del picco G0/G1 ed un accumulo in fase S che risultano statisticamente significative rispetto alle colture controllo.

Al pari del BEO fitocomplesso, si osserva una riduzione della percentuale di cellule in fase G2/M che risulta significativa ($P < 0,001$) rispetto alle colture controllo e rispetto all'effetto conseguente all'esposizione ai singoli costituenti.

Viceversa, nessuna variazione significativa nella distribuzione delle fasi del ciclo cellulare è stata osservata dall'analisi degli effetti dell'associazione tra limonene 0,016% e linalolo 0,004%.

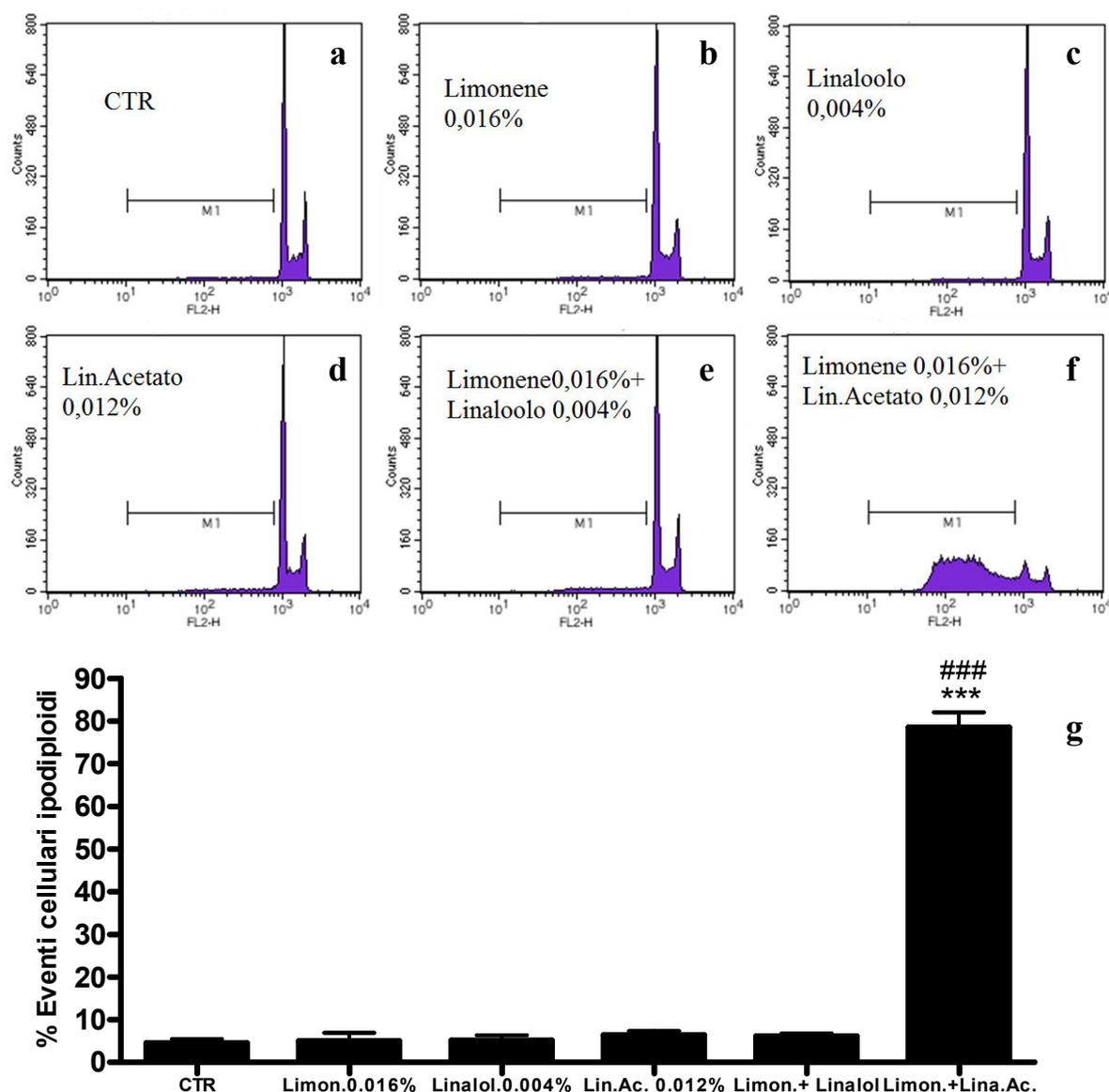


Fig.4.13 Analisi dell'ipodiploidia in cellule SH-SY5Y esposte a limonene+linalolo e limonene+ linalile acetato. Le colture di neuroblastoma umano sono state esposte al limonene, linalolo e linalile acetato, da soli o in combinazione. Ventiquattro ore dopo l'esposizione, l'ipodiploidia è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. In a-f sono indicati esempi tipici derivanti dall'acquisizione di cellule SH-SY5Y non trattate (a), esposte ai singoli componenti (b,c,d) ed esposte alle due associazioni (e,f). L'esposizione ai singoli costituenti non causa morte cellulare mentre l'esposizione all'associazione limonene + linalile acetato causa un aumento statisticamente significativo della percentuale di eventi ipodiploidi. Nel grafico a barre sono riportate le medie \pm errore standard di 6-12 valori ottenuti in 2-4 esperimenti indipendenti.

***e ### denotano $P < 0,001$ vs controllo e vs limonene e linalile acetato, rispettivamente. (ANOVA seguito dal Tukey-Kramer test per le comparazioni multiple.)

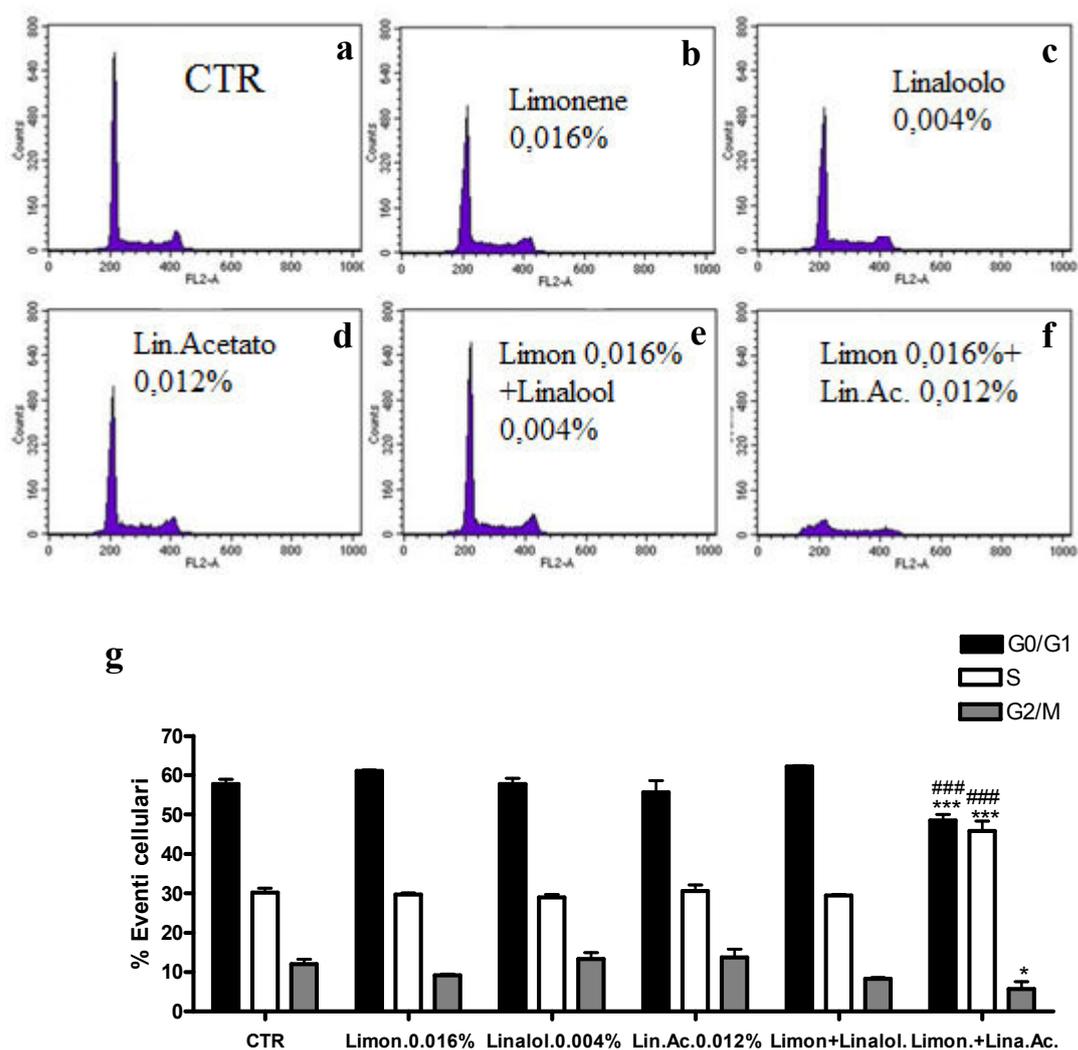


Fig.4.14 Distribuzione delle fasi del ciclo cellulare in colture SH-SY5Y esposte a limonene+linalolo e limonene+ linalile acetato. Le colture di neuroblastoma umano sono state esposte al limonene, linalolo e linalile acetato, da soli o in combinazione. Ventiquattro ore dopo l'esposizione, la distribuzione delle fasi del ciclo cellulare è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica. In a-f sono indicati esempi tipici derivanti dall'acquisizione di cellule SH-SY5Y non trattate (a), esposte ai singoli componenti (b,c,d) ed esposte alle due associazioni (e,f). L'esposizione ai singoli costituenti non modifica la distribuzione nelle varie fasi del ciclo mentre l'esposizione all'associazione limonene+linalile acetato una riduzione statisticamente significativa della percentuale di cellule in fase G0/G1, un accumulo statisticamente significativo in fase S ed una riduzione significativa della percentuale di cellule in fase G2/M. Nel grafico a barre (g) sono riportate le medie \pm errore standard di 6-12 valori ottenuti in 2-4 esperimenti indipendenti.

*denota $P < 0,05$ vs controllo; ***e ### denotano $P < 0,001$ vs controllo e vs limonene e linalile acetato, rispettivamente. (ANOVA seguito dal Tukey-Kramer test per le comparazioni multiple.)

4.4 Effetti citotossici del BEO in colture di cellule HeLa.

Esperimenti preliminari sono stati condotti su una linea cellulare tumorale di diversa derivazione.

Culture di cellule di tumore della cervice uterina sono state esposte al BEO alla concentrazione 0,04% per 24 ore (Fig 4.15).

Dalle immagini acquisite al microscopio a contrasto di fase, riportate in figura 5.8(a), le cellule HeLa esposte al BEO 0,04% appaiono completamente aver perso l'aderenza alla superficie di crescita come conseguenza dell'effetto tossico del BEO.

Il BEO 0,04% causa infatti una riduzione statisticamente significativa ($P < 0,0001$) della vitalità cellulare pari a circa l'80%, paragonabile a quanto osservato nelle colture di neuroblastoma (97%)

Anche il profilo che deriva dall'analisi biparametrica FDA/PI, sovrapponibile a quanto osservato negli esperimenti condotti nelle colture di neuroblastoma umano.

L'esposizione delle colture HeLa al BEO 0,04% induce un aumento statisticamente significativo ($P < 0,0001$ vs controllo) della percentuale ($81,9 \pm 7,2\%$) di cellule necrotiche (FDA⁻/PI⁺; Fig.4.14 c,d) e questo risulta paragonabile quello indotto dal BEO 0,04% nelle colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y ($84\% \pm 4,9$).

Tuttavia, la percentuale di ipodiploidia indotta dal BEO 0,04% nelle cellule HeLa ($9,79 \pm 1,8\%$), sebbene statisticamente significativa rispetto al controllo ($P < 0,05$), risulta significativamente inferiore a quella indotta dal BEO nelle colture di neuroblastoma ($67 \pm 1,4$).

Anche nel caso della distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo il BEO 0,04% ha fornito risultati differenti nelle cellule HeLa rispetto a quanto precedentemente ottenuto negli esperimenti condotti nelle colture di neuroblastoma.

Pur infatti essendo evidente una riduzione del numero di eventi considerati come cellule vitali nelle colture HeLa esposte al BEO 0,04%, la distribuzione di tali eventi nelle fasi del ciclo cellulare non risulta statisticamente differente ($P > 0,05$) rispetto colture controllo, suggerendo che il BEO non produce, nelle cellule HeLa, alcun effetto sul ciclo cellulare.

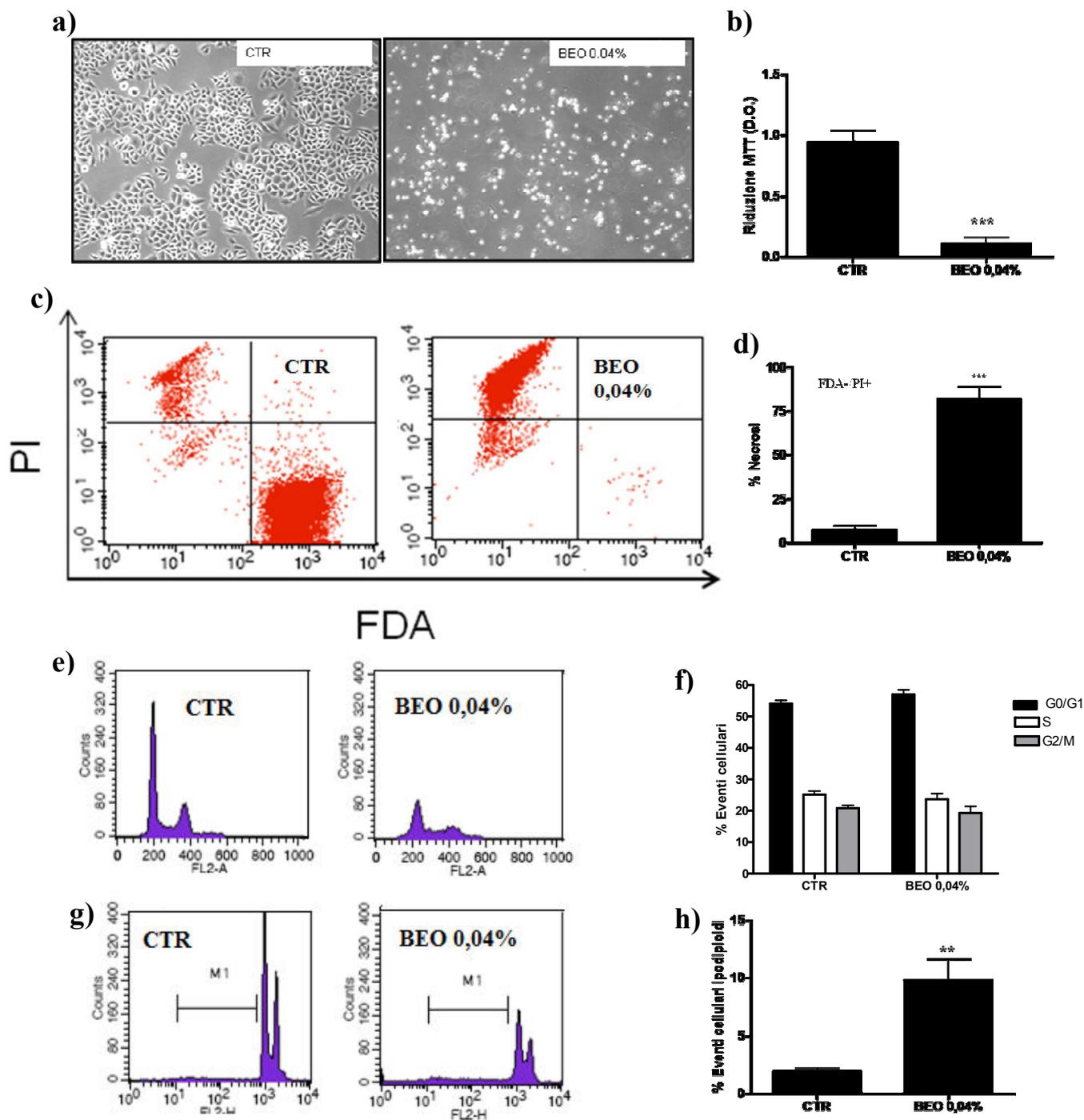


Fig.4.14. Effetti dell'esposizione per 24 ore delle colture HeLa al BEO 0,04%. Il trattamento con BEO determina effetti citotossici come documentato dalle immagini in microscopia a contrasto di fase (a), dal saggio di vitalità MTT (b) e dal test biparametrico di vitalità effettuato al citofluorimetro (c,d). Il BEO induce una riduzione statisticamente significativa della vitalità cellulare (a-b), un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule necrotiche (d) e di eventi ipodiploidi (f) mentre non determina alcuna variazione della distribuzione delle fasi del ciclo cellulare (e,f). Negli istogrammi in b, d, f ed h sono riportate le medie \pm errore standard di 3-6 esperimenti indipendenti (** e*** denota $P < 0,01$ e $P < 0,001$ ottenuti dal t-test).

5. Discussione

I risultati ottenuti nel presente lavoro hanno permesso di caratterizzare il profilo tossicologico del BEO. L'analisi dell'effetto tossico dei singoli costituenti dell'essenza ha inoltre permesso di identificare nelle miscele di alcuni dei componenti più rappresentati, limonene e linalile acetato, i componenti responsabili degli effetti tossici osservati.

Ad oggi, la letteratura riporta studi sulla citotossicità del BEO nei confronti di organismi patogeni comprendenti sia batteri (Mandalari et al., 2007; Fisher and Philips, 2006) che funghi (Romano et al., 2005).

Il BEO ha però dimostrato anche un potenziale neuroprotettivo, come recentemente riportato in un lavoro *in vitro* su cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y esposte a stimolo eccitotossico (Corasaniti et al., 2007); inoltre, Morrone e colleghi, hanno riportato la capacità del BEO di agire sul rilascio di neurotrasmettitori amminoacidici sia nel SNC di ratto che in preparazioni di sinaptosomi (Morrone et al., 2007).

Ad oggi, tuttavia, non sono riportati in letteratura studi riguardanti la citotossicità del BEO in colture cellulari umane sia normali che tumorali.

I risultati ottenuti nel presente studio dimostrano che il BEO esplica effetti citotossici sulla linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y quando impiegato a concentrazioni superiori allo 0,01% per 24 ore. A tali concentrazioni (0,03%-0,04%), il BEO è infatti in grado di produrre una riduzione significativa della vitalità cellulare che ben si correla all'incremento della mortalità.

Gi studi condotti mediante analisi citofluorimetrica hanno inoltre permesso di ottenere delle informazioni aggiuntive sul tipo di morte cellulare indotto dal BEO, suggerendo che la morte delle cellule di neuroblastoma in seguito all'esposizione al fitocomplesso proceda con un meccanismo di tipo necrotico o di necrosi secondaria.

Infatti, l'utilizzo di coloranti cellulari normalmente esclusi da cellule con membrana plasmatica integra, quali il PI ed il *trypan blue* ha rivelato la presenza, nelle cellule esposte al BEO, di alterazioni della membrana plasmatica.

La rottura della membrana plasmatica ed il rilascio di costituenti citoplasmatici (Majno and Joris, 1995), rappresenta uno degli eventi distintivi ed esclusivi della morte cellulare per necrosi, diversamente dall'apoptosi dove la membrana plasmatica è mantenuta integra anche nei piccoli corpi apoptotici.

Tuttavia, la morte cellulare non è sempre accompagnata dalle caratteristiche classiche dell'apoptosi o della necrosi (Cohen et al., 1992). Infatti, sono stati descritti esempi di processi di morte in cui lo schema dei cambiamenti morfologici e biochimici non è prettamente specifico dell'apoptosi o della necrosi, ma presenta le caratteristiche di entrambi i tipi di morte (Akagi et al., 1995; Catchpoole & Stewart, 1993).

Una tecnica di analisi citofluorimetrica molto utilizzata per la caratterizzazione del processo di morte è l'analisi del contenuto di DNA di una popolazione cellulare.

La fluorescenza emessa dalla colorazione di cellule permeabilizzate con molecole come il PI consente l'identificazione delle cellule vive, distribuite nelle fasi del ciclo cellulare, e delle cellule morte (Pollack & Ciancio, 1990)

In questo tipo di analisi, la morte cellulare per apoptosi è rilevabile per la presenza di un accumulo di cellule a sinistra del picco G0/G1 del ciclo cellulare indicato come picco sub-G1 (Darzynkiewicz et al., 1992) o come area sub-G1 (Yang et al., 2005), a seconda della scala di fluorescenza utilizzata. La riduzione della fluorescenza emessa dal PI deriva dalla riduzione della quantità di DNA delle cellule apoptotiche conseguente l'attivazione di specifiche endonucleasi che degradano il DNA in frammenti caratteristici di 180-220 bp (Walker et al., 1991). Questi frammenti di basso peso molecolare diffondono facilmente fuori dal nucleo e,

successivamente, nell'ambiente extracellulare a permeabilizzazione cellulare (Darzynkiewicz et al., 1992).

Nel nostro modello sperimentale, l'esposizione delle colture di neuroblastoma al BEO 0,03%-0,04%, ha prodotto l'accumulo di eventi ipodiploidi nella area sub-G1.

Tuttavia, poiché la degradazione aspecifica del materiale nucleare è un fenomeno che accade anche nella morte cellulare necrotica (Majino & Joris, 1995; Kerr & Harmon, 1991), gli eventi ipodiploidi osservati nelle nostre condizioni sperimentali, unitamente ai risultati ottenuti con i precedenti test, sono verosimilmente conseguenti ad un processo necrotico.

La deduzione che il tipo di morte indotto dal BEO sia di tipo necrotico è supportata dal fatto che gli olii essenziali, a causa del grande numero di costituenti, sembrano non avere specifici *target* cellulari (Carson et al., 2002). Poiché lipofili, essi attraversano la membrana citoplasmatica danneggiandola mediante la distruzione dei differenti strati polisaccaridici e degli acidi grassi.

Nei batteri, la permeabilizzazione delle membrane da parte degli olii essenziali, è associata alla perdita di ioni ed alla riduzione del potenziale di membrana, al collasso di pompe protoniche e alla deplezione del pool di ATP (Knoblock et al., 1989; Sikkema et al., 1994; Helander et al., 1998).

E' stato riportato che nei batteri gli oli essenziali possono coagulare il citoplasma (Gustafson et al., 1998) e danneggiare i lipidi e le proteine (Ulte et al., 2002).

Nelle cellule eucariotiche, invece, gli olii essenziali possono provocare la riduzione del potenziale di membrana mitocondriale agendo, di conseguenza, sul flusso di ioni Ca^{2+} (Novgorodov & Gudz, 1996), possono ridurre il pH intracellulare ed alterare la disponibilità di adenosina trifosfato (ATP).

L'alterazione della funzionalità mitocondriale potrebbe spiegare, nel nostro modello, la ridotta attività delle deidrogenasi mitocondriali causata dal BEO e rilevata come riduzione dell'assorbanza riscontrata con il saggio MTT.

Gli olii essenziali, inoltre, determinano un cambiamento nella fluidità delle membrane che risulta nel rilascio di radicali liberi, citocromo c, ioni Ca^{2+} e proteine, come avviene in situazioni di stress ossidativo (Bakkali et al., 2008).

Recentemente è stato riportato che il BEO promuove la produzione di specie reattive dell'ossigeno, come i singoletti dell'ossigeno $\text{}^1\text{O}_2$ (Ao et al., 2008), che inducono perossidazione e, di conseguenza, danno cellulare.

L'induzione di specie reattive dell'ossigeno da parte del BEO potrebbe causare una serie di reazioni che provocherebbero il danno cellulare.

Successivamente alla caratterizzazione del tipo di morte causato dall'esposizione delle colture a concentrazioni di BEO superiori a quelle neuroprotettive (Corasaniti et al., 2007), le indagini sono state volte all'identificazione dei principi responsabili.

Pertanto, sono state impiegate due frazioni del BEO, ovvero la frazione deprivata del bergaptene e la frazione deprivata dei monoterpeni idrocarburi e del bergaptene.

La frazione priva del bergaptene (BEO-BF), impiegata alle stesse concentrazioni presenti nel BEO fitocomplesso, ha dimostrato un profilo tossicologico sovrapponibile a quello del BEO. Abbiamo infatti riportato una riduzione della vitalità cellulare, l'induzione di morte e la presenza di una percentuale significativa di eventi ipodiploidi, quantitativamente sovrapponibili a quelle ottenute dopo esposizione all'intera essenza.

Tali indagini sperimentali hanno permesso di escludere il bergaptene (o 5-MOP) come principio responsabile dell'effetto tossico del BEO.

A supporto di tale ipotesi, l'esposizione al bergaptene (1.6-6.4 μM), a concentrazioni corrispondenti a quelle presenti nel fitocomplesso, non ha prodotto variazioni significative

rispetto alle colture controllo né a livello dell'ipodiploidia cellulare, né a livello di distribuzione cellulare nelle varie fasi del ciclo.

Il bergaptene è il costituente responsabile della fototossicità degli olii essenziali. Esso, in seguito a fotoattivazione, va incontro a reazioni di cicloadizione con le basi pirimidiniche formando degli addotti che inibiscono la trascrizione e la replicazione del DNA (Musajo et al., 1965; Vigny et al., 1985). Nel nostro modello sperimentale, l'esposizione al bergaptene non determina né morte né inibizione della proliferazione cellulare.

In letteratura è riportato che il 5-MOP e l'8-MOP sono impiegati in associazione ai raggi UVA (PUVA terapia) nel trattamento di patologie come la psoriasi e la vitiligine (Gasparro, 2000).

Tuttavia, sono stati condotti studi che documentano gli effetti del 5-MOP in associazione ai raggi UVA in cellule dermali normali umane, e gli effetti del 5-MOP in colture cellulari tumorali.

Recentemente è stato pubblicato un lavoro in cui cheratinociti umani (NCTC-2544) venivano irradiati in presenza di diverse concentrazioni di 5-MOP (10 μ M- 1.25 μ M) per 24, 48 e 72 ore (Viola et al., 2008). L'induzione di apoptosi dal parte del 5-MOP alla concentrazione 5 μ M in associazione con i raggi UVA, risulta significativa solo dopo 48 e 72 ore di esposizione. In un altro studio, condotto su cellule di tumore al fegato umane (J5), il 5-MOP determina la riduzione della vitalità cellulare, misurata col test di esclusione al *trypan blue*, dopo 24 e 48 ore quando impiegato a concentrazioni 25-50 mM, e tale riduzione aumenta all'aumentare del tempo di esposizione (Lee et al., 2003).

Nel nostro studio il 5-MOP è stato impiegato a concentrazioni 1.6, 3.2 e 6.4 μ M che sono nettamente inferiori rispetto a quelle riportate nel lavoro di Lee e colleghi. Questo potrebbe rendere conto dell'assenza di effetti tossici del 5-MOP nelle colture SH-SY5Y.

L'esclusione del bergaptene ha indirizzato le indagini successive tra i componenti della frazione volatile del BEO.

Un'indagine preliminare è stata effettuata esponendo le colture di neuroblastoma SH-SY5Y alla frazione deprivata del bergaptene e dei monoterpeni idrocarburi (BEO-BF/HF).

Il BEO-BF/HF, quando utilizzato alla concentrazione 0,02%, corrispondente al BEO 0,04% in termini di composti ossigenati presenti, causa la morte cellulare in maniera significativa ($P < 0,05$) rispetto alle colture controllo, tuttavia l'effetto tossico risulta minore rispetto al BEO. Tale dato suggerisce che i monoterpeni idrocarburi siano coinvolti nella tossicità indotta dal fitocomplesso.

Pertanto, sono stati condotti esperimenti al fine di valutare se gli effetti citotossici indotti dal BEO fossero riprodotti dai monoterpeni idrocarburi maggiormente rappresentati nell'olio essenziale. Tuttavia, i risultati ottenuti documentano come nessuno dei monoterpeni studiati, in particolare limonene, β -pinene e γ -terpinene, riproduca gli effetti del BEO.

In letteratura esistono molti dati relativi al limonene che documentano come esso espliciti attività antitumorale negli animali da esperimento (Elegbede et al., 1986; Maltzman et al., 1989; Haag et al., 1992, 1994), verosimilmente attraverso la sua capacità di interferire con il metabolismo del mevalonato (Elson, 1995) e con l'isoprenilazione delle proteine (Crowell et al., 1994; Kawata et al., 1994). Studi condotti nell'animale riportano che il limonene, il composto più abbondante del BEO (40%), previene l'insorgenza di tumori in diversi modelli sperimentali di cancro mammario, epatico, polmonare e cutaneo chimicamente indotti nei roditori (Crowell & Gould, 1994). Inoltre, è stato documentato che il limonene è in grado di indurre regressione del carcinoma mammario chimicamente indotto nel ratto (Ariazi & Gould, 1996).

Ji e collaboratori hanno dimostrato l'induzione di apoptosi mediata dal limonene in due linee cellulari di leucemia umana, K562 e HL60. Gli effetti del limonene, nelle linee cellulari, sono

stati indagati attraverso l'analisi della vitalità cellulare mediante la tecnica di esclusione del *trypan blue*. Gli esperimenti sono stati condotti esponendo le colture cellulari a concentrazioni di limonene comprese tra 0,1-0,8 mM per 48 ore.

Dallo studio è emerso che il limonene 0,1-0,8 mM induce una riduzione della vitalità cellulare in maniera concentrazione dipendente in entrambe le linee cellulari dopo 48 ore. Inoltre, l'esposizione delle colture al limonene 0,4 mM per 12-24-36-48-60 e 72 ore causa un incremento della mortalità cellulare proporzionale al tempo di esposizione con un andamento simile in entrambe le linee cellulari. Tale incremento risulta statisticamente significativo già dopo 24 ore ($P < 0,01$).

L'esposizione al limonene 0,4-0,8 mM, causa, inoltre, un incremento della percentuale di cellule positive alla marcatura con annessina V ed un incremento di cellule con frammentazione del materiale nucleare visualizzate con l'hoechst (Ji et al., 2006)

In un altro studio, condotto da Rolseth e collaboratori, è stato documentato che l'esposizione per 24 ore al limonene di cellule polmonari umane (CDD-19 Lu) risulta tossico a concentrazioni superiori a 0,3 mM, con IC_{50} pari a 0,41 mM (Rolseth et al., 2002).

Nelle nostre condizioni sperimentali, l'esposizione alla concentrazione massima di limonene, corrispondente a 0,988 mM, per 24 ore, non risulta essere tossico. Questa osservazione suggerisce che le nostre cellule siano meno suscettibili all'effetto tossico del limonene e che tale effetto sia strettamente dipendente dal modello sperimentale utilizzato.

I risultati ottenuti dall'esposizione al limonene, β -pinene e γ -terpinene, hanno dimostrato che nessuno dei monoterpeni idrocarburi impiegati singolarmente in colture di SH-SY5Y, riproduce l'effetto tossico osservato col BEO fitocomplesso.

I risultati ottenuti con la frazione BEO-BF/HF suggeriscono che i terpeni ossigenati non sono coinvolti nella tossicità mediata dal BEO. Gli studi successivi, condotti esponendo le colture cellulari ai monoterpeni ossigenati più rappresentati nel BEO, ovvero il linalolo e l'estere

corrispondente, il linalile acetato, hanno confermato l'assenza di effetti tossici dopo esposizione a tali terpeni ossigenati.

Nel complesso, i dati ottenuti nel presente studio suggeriscono che i responsabili degli effetti citotossici siano i monoterpeni idrocarburi ma, nessuno di essi riproduce gli effetti del BEO. Quest'ultima osservazione ha portato ad ipotizzare che composti diversi sinergizzino fra loro per determinare morte cellulare.

Linalolo e linalile acetato sono stati oggetto di diversi studi per le loro proprietà di promotori dell'assorbimento cutaneo.

Sorprendentemente però, nonostante il linalile acetato sia più lipofilo rispetto al linalolo, risulta essere meno assorbito (Cal & Sznitowska, 2003).

Come il limonene anche il linalolo, nelle nostre condizioni sperimentali, non ha prodotto variazioni significative dell'ipodiploidia cellulare rispetto alle colture controllo.

Le proprietà antiproliferative del linalolo sono state recentemente valutate in diverse linee cellulari mediante il saggio colorimetrico XTT (Cherng et al., 2007). Nel lavoro di Cherng e collaboratori, il linalolo risulta il composto più tossico rispetto ad alcuni composti fenolici come l'acido caffeico, con IC_{50} compresa tra 0,37 $\mu\text{g/mL}$ (2.4 μM) nelle cellule di carcinoma della cervice uterina (HeLa) e 21,7 $\mu\text{g/mL}$ (140,68 μM) nelle colture di tumore osseo (U₂OS).

La tossicità del linalolo è stata analizzata precedentemente anche in un altro lavoro condotto da Prashar e collaboratori (Prashar et al., 2004). Il linalolo è stato studiato come costituente responsabile della citotossicità indotta dall'olio essenziale di lavanda (*Lavandula Angustifolia*) in colture di cellule dermali umane (HMEC-1, HNDF e 153BR). L'esposizione delle colture cellulari a concentrazioni di olio essenziale di lavanda superiori a 0,125% per 1 ora, provoca morte cellulare come valutato mediante il saggio *neutral red* (NR). Questa molecola viene incorporata dalle cellule vitali nei lisosomi. La perdita della capacità delle cellule di assorbire

l'NR, rappresenta un indice di riduzione della vitalità, e risulta in un decremento dell'assorbanza.

Sempre nello stesso lavoro, oltre alla tossicità dell'olio essenziale di lavanda e del linalolo, è stata valutata la tossicità del linalile acetato. Linalolo e linalile acetato, che rappresentano rispettivamente il 35% ed il 51% dell'olio essenziale di lavanda, sono stati impiegati a concentrazioni equivalenti a quelle presenti nelle varie diluizioni utilizzate dell'olio essenziale.

In particolare, le concentrazioni di linalolo e linalile acetato riportate nel lavoro, sono comprese tra 0.005%-0.7% e 0.008%-1.02% rispettivamente. Dall'analisi comparativa degli effetti espliciti da olio di lavanda, linalolo e linalile acetato, il linalolo mostra una maggiore correlazione con l'olio essenziale di lavanda su tutte e tre le linee cellulari testate, risultando così il componente attivo responsabile della tossicità indotta dall'olio essenziale.

Nel nostro modello, le colture di SH-SY5Y, sono state esposte al linalolo per 24 ore a concentrazioni comprese 0,0005%-0,004%, equivalenti al BEO 0,005%-0,04%.

Probabilmente, l'assenza di effetti tossici del linalolo da noi riscontrata, potrebbe essere imputata ad una diversa suscettibilità delle SH-SY5Y al linalolo rispetto alle linee cellulari riportate in letteratura. Questa ipotesi è supportata dal fatto che le IC₅₀ del linalolo, nelle diverse colture tumorali, variano da 2,3 µM a 140 µM, a seconda della linea cellulare.

Inoltre, nelle cellule dermali normali umane (Prashar et al., 2004), l'effetto tossico del linalolo rilevabile dopo 1 ora di esposizione, si osserva ad una concentrazione pari a 4,9 mM (0,088%).

Si potrebbe pensare che nella linea cellulare da noi utilizzata sono necessarie concentrazioni ancora più elevate di linalolo o un maggiore tempo di esposizione delle colture alle concentrazioni in uso, per poter osservare un effetto tossico o antiproliferativo.

Anche l'esposizione al solo linalile acetato (0,0015-0,012%), non ha prodotto effetti tossici paragonabili a quelli osservati con il BEO fitocomplesso. La tossicità del linalile acetato è stata riportata in modelli sperimentali *in vivo* (Letizia et al., 2003) ed *in vitro*. In particolare, nel

lavoro di Prashar e collaboratori, il linalile acetato risulta più tossico rispetto all'olio essenziale di lavanda nelle colture di fibroblasti umani (HNDF). Questi risultati sono stati interpretati ipotizzando che l'attività del linalile acetato possa essere soppressa da qualche altro componente presente nell'olio essenziale. Una riduzione della vitalità cellulare è stata osservata esponendo le colture di fibroblasti alla concentrazione di linalile acetato pari a 0,016%, corrispondente alla concentrazione 0,031% dell'olio essenziale di lavanda.

Diversamente dall'olio essenziale di lavanda, dove linalolo e linalile acetato costituiscono il 35% e 51% rispettivamente, nel BEO linalolo ed il linalile acetato sono presenti, rispettivamente, nelle percentuali 9.83% e 30.03%. La massima concentrazione di linalile acetato impiegata negli esperimenti, è stata pari a 0,012%. L'esposizione per 24 ore a tale concentrazione non ha riprodotto l'effetto tossico del fitocomplesso. Anche in questo caso, probabilmente, le colture SH-SY5Y risultano più resistenti dei fibroblasti umani esposti per 1 ora al linalile acetato 0,016% (Prashar et al., 2004).

Le osservazioni sperimentali su linalolo e linalile acetato finora riportate, unitamente ai dati ottenuti dall'esposizione delle colture alla frazione diterpenata (BEO-BF/HF), hanno confermato l'esclusione del linalolo e del linalile acetato quali possibili principi responsabili dell'effetto tossico del fitocomplesso.

Nel BEO-BF/HF, infatti, la percentuale di linalolo sommata a quella del linalile acetato risulta pari all'80% che equivale al doppio della somma delle percentuali di questi composti nel fitocomplesso (40%).

Se il composto responsabile dell'effetto tossico del BEO fosse stato il linalolo o il linalile acetato, si sarebbe dovuto osservare lo stesso effetto del fitocomplesso negli esperimenti con la frazione BEO-BF/HF 0,02%.

A tale concentrazione, infatti, la percentuale di linalolo e linalile acetato, risulta corrispondente alla percentuale che tali composti hanno nella concentrazione tossica del BEO (0.04%).

I dati ottenuti con la frazione deterpenata hanno permesso di escludere anche un effetto sinergico tra linalolo e linalile acetato, suggerendo che l'azione citotossica del BEO sia esplicita da altre molecole in esso contenute che, attraverso meccanismi d'azione differente, determinano un effetto additivo o sinergico.

La maggior parte degli studi riportati in letteratura si riferisce ad indagini condotte sui costituenti più rappresentati ed abbondanti degli olii essenziali i quali, in genere, riflettono le proprietà biologiche delle intere essenze (Ipek et al., 2005).

La miristicina, ad esempio, contenuta nell'olio essenziale di noce moscata (*Myristica fragrans*), è il principio responsabile della protezione esplicita dall'olio essenziale nei confronti del danno al fegato causato da alcuni composti chimici attraverso un meccanismo che coinvolgerebbe l'inibizione del rilascio di TNF- α dai macrofagi e l'inibizione dell'apoptosi (Morita et al., 2003). La miristicina, inoltre, causa anche citotossicità in colture di SK-N-SH inducendo apoptosi (Lee et al., 2005).

Nel nostro modello, l'esposizione ai singoli costituenti del BEO, non ha riprodotto lo stesso effetto esplicito dall'intera essenza. Pertanto, studi successivi sono stati condotti impiegando miscele dei costituenti più rappresentati sulla base di un'ipotesi additiva o sinergica dei componenti.

I dati ottenuti dagli esperimenti condotti impiegando la frazione deprivata del bergaptene e quella deprivata del bergaptene e dei monoterpeni idrocarburi, hanno suggerito il possibile coinvolgimento del limonene, il componente più rappresentato nel BEO, in associazione con altri composti, come principio responsabile della citotossicità indotta dal BEO. Di conseguenza, le indagini sono state condotte esponendo le colture di neuroblastoma SH-SY5Y dapprima all'associazione limonene + linalolo e successivamente all'associazione limonene + linalile acetato.

La letteratura riporta diversi studi in cui sono stati valutati gli effetti prodotti dall'associazione di molecole di diversa derivazione. Recentemente, è stato osservato che la simultanea esposizione ad acido zoledronico e docetaxel aumenta la citotossicità del docetaxel inducendo un aumento dell'apoptosi attraverso un meccanismo che coinvolge l'espressione di MEK e Mcl-1 nella linea cellulare di tumore alla prostata LNCaP (Fabbri et al., 2008).

La combinazione tra l'antibiotico staurosporina e l'acetaminofene, potenzia l'apoptosi mediata dalla staurosporina in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y (Posadas et al., 2007).

I terpeni contenuti negli olii essenziali sono in grado di agire da promotori dell'assorbimento. Terpeni come il mentolo ed il cineolo si sono dimostrati in grado di facilitare l'assorbimento cutaneo del β -bloccante propanololo (Amnuakitt et al., 2005); mentolo e limonene promuovono l'assorbimento della melatonina (Kanikkannan et al., 2004)

L'assorbimento transdermico è facilitato anche dalla combinazione di terpeni e acidi grassi che, in maniera sinergica, promuovono il passaggio attraverso la pelle della zidovudina (Edris, 2007).

Nelle nostre condizioni sperimentali, l'associazione limonene+ linalolo, non ha prodotto lo stesso effetto citotossico osservato con il fitocomplesso. Il limonene, che da solo rappresenta il 40% dell'intera essenza, è stato impiegato alla concentrazione 0,016% (988 μ M), equivalente a quella presente nel BEO 0,04%. Il linalolo, invece, è stato impiegato alla concentrazione 0,004% (223 μ M).

L'associazione tra limonene e linalolo non ha prodotto variazioni significative della percentuale di eventi ipodiploidi rispetto alle colture controllo, nonostante il limonene fosse presente in elevata concentrazione.

L'esposizione delle colture di neuroblastoma a limonene (0,988 mM) + linalile acetato (0,55 mM), ha invece causato un effetto tossico, valutato mediante analisi dell'ipodiploidia,

maggiore rispetto al BEO 0,04%. Probabilmente l'azione di limonene e linalile acetato potrebbe essere soppressa da altri costituenti presenti nel BEO che risulta nell'induzione di una minore percentuale di eventi ipodiploidi da parte del fitocomplesso.

La tossicità dell'associazione limonene+linalile acetato si potrebbe spiegare considerando la proprietà di promotore dell'assorbimento del limonene (Krishnaiah et al., 2008) e considerando che il linalile acetato, nonostante sia lipofilo, è meno assorbito rispetto ad altri terpeni ad esempio il linalolo e il citronellolo (Cal and Sznitowska, 2003).

Questa assunzione attribuirebbe l'effetto citotossico, che si osserva dall'associazione limonene e linalile acetato, a quest'ultimo, ipotizzando che il limonene ne faciliti l'ingresso all'interno della cellula. E' stato riportato che la tossicità del linalile acetato possa essere dovuta alla presenza del gruppo funzionale acetato che risulta più tossico di un eventuale gruppo alcolico appartenente al linalolo (Prashar et al., 2004).

Il linalile acetato all'interno delle cellule SH-SY5Y, potrebbe essere de-esterificato causando l'accumulo di acido acetico risultando così tossico per la cellula.

Si potrebbe in alternativa ipotizzare che dalla de-esterificazione del linalile acetato si formino delle nuove specie molecolari dovute alla presenza del doppio legame altamente reattivo all'interno dell'anello della molecola del limonene (Feltham et al., 2000).

Questa assunzione è supportata da studi presenti in letteratura sulle proprietà anticancro di analoghi strutturali del limonene come l'alcool perillico.

L'alcool perillico (POH) induce apoptosi ed inibisce la proliferazione cellulare (Yuri et al., 2004; Samaila et al., 2004) attraverso la sua capacità di modulare processi che controllano la crescita cellulare ed il differenziamento (Azzoli et al. 2003, Clark et al. 2002).

L'alcool perillico può essere prodotto a partire dal limonene da reazioni di biotrasformazione che avvengono nei batteri (Duetz et al., 2003).

La reattività del doppio legame del limonene può causare, inoltre, reazioni chimiche con altri composti e generare sostanze come formaldeide o radicali (Wolkoff et al., 1997): queste specie molecolari risulterebbero così tossiche per le cellule.

In conclusione il presente lavoro di tesi riporta, per la prima volta, la caratterizzazione della citotossicità del BEO su una linea cellulare tumorale umana ed identifica, nella combinazione tra limonene e linalile acetato, i componenti responsabile di tale effetto citotossico.

Ulteriori studi sono necessari al fine di caratterizzare i meccanismi alla base della morte cellulare indotta dal BEO, nonché i meccanismi attraverso i quali limonene e linalile acetato sinergizzano per determinare effetti citotossici.

Inoltre, sarebbe interessante studiare gli effetti del BEO e della miscela limonene e linalile acetato in cellule tumorali di diversa derivazione .

Esperimenti preliminari sono stati condotti esponendo cellule di tumore alla cervice uterina (HeLa) alla concentrazione tossica del BEO (0,04%). Tali esperimenti mettono in evidenza come il BEO induca morte cellulare, presumibilmente di tipo necrotico, anche in questa linea cellulare.

Tuttavia, l'analisi citofluorimetrica eseguita per valutare gli effetti del BEO sul ciclo cellulare e sull'induzione di eventi ipodiploidi nelle cellule HeLa, ha prodotto risultati diversi rispetto a quelli ottenuti nelle cellule di neuroblastoma. Infatti, alla concentrazione 0,04% la percentuale di eventi ipodiploidi indotta dal BEO nelle SH-SY5Y è 67 ± 1.4 %, mentre nelle cellule HeLa è $9,89 \pm 1.8$ %; tale valore risulta nettamente inferiore rispetto a quanto osservato con le colture di neuroblastoma umano.

Si potrebbe ipotizzare che in questa linea cellulare, la citotossicità del BEO si espliciti attraverso meccanismi molecolari diversi da quelli coinvolti nella citotossicità dell'olio nelle colture di neuroblastoma. Tali meccanismi non condurrebbero nelle colture HeLa alla frammentazione del materiale nucleare rilevabile come accumulo di eventi ipodiploidi.

I risultati ottenuti suggeriscono future indagini per valutare gli effetti del limonene e del linalile acetato, alle concentrazioni corrispondenti a quelle presenti nel BEO 0,04%, sia singolarmente che in associazione, nelle colture di cellule HeLa, allo scopo di valutare se la citotossicità del BEO sia attribuibile, anche in questo caso, al sinergismo dei componenti, oppure se tale effetto sia dovuto all'azione di un singolo costituente.

Il diverso effetto del BEO sull'induzione di eventi ipodiploidi nelle due colture cellulari utilizzate non esclude, inoltre, che l'effetto tossico del fitocomplesso nelle HeLa possa derivare dall'azione di altri componenti presenti nel fitocomplesso.

Inoltre, tali studi potrebbero essere estesi a linee cellulari tumorali di diversa derivazione oltreché, a cellule di derivazione non tumorale.

L'impegno al proseguimento delle indagini deriva dai risultati interessanti ottenuti nel presente lavoro che ampliano le conoscenze relative alla capacità degli oli essenziali di esplicare attività antiproliferativa *in vitro*. Inoltre il presente lavoro offre nuovi spunti per lo studio di molecole con potenziale terapeutico che potrebbero risultare specifiche per il trattamento di alcune patologie tumorali.

6. Parte speciale:

Metodi di indagine sperimentale acquisiti durante lo stage formativo.

Nella parte finale del corso di dottorato di ricerca, è stato svolto uno stage formativo presso il Medical Research Council di Leicester, Inghilterra, che ha consentito l'acquisizione nuove tecniche di indagine dei processi che regolano la morte cellulare.

Durante tale periodo, è stato effettuato un lavoro di caratterizzazione del tipo di morte cellulare indotta dal 2-NVK (2-naphtylvinilketone), nella linea cellulare di leucemia dei linfociti T Jurkat (clone E.6.1).

Il lavoro è stato eseguito allo scopo di valutare gli effetti indotti dal 2-NVK nelle colture Jurkat sulla base di risultati ottenuti precedentemente in seguito all'esposizione di colture cellulari ottenute da pazienti affetti da leucemia cronica linfocitaria (CLL).

Il 2-NVK è un inibitore selettivo della chinasi Janus 3 (Jak3).

Jak3 insieme a Jak1, Jak2 e Tyk, fa parte di una famiglia di tirosin chinasi coinvolte nella via di trasduzione del segnale conseguente al legame di alcune citochine ai recettori di superficie cellulari.

Jak3 risulta espressa principalmente nelle cellule linfoidi mentre, mentre Jak1, Jak2 e Tyk sono presenti in tutti i tessuti (Briscoe et al., 1996).

L'attivazione di jak3 avviene esclusivamente in seguito all'attivazione di una classe di recettori per le citochine (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-11R, IL-13R) caratterizzati dalla presenza della subunità γ_c .

Mutazioni a livello del gene che codifica per la subunita γ_c recettoriale sono responsabili di patologie associate a deficienze del sistema immunitario (XSCID: *X-linked severe combined immunodeficiency disease*) (Noguchi et al., 1993).

Tuttavia, la scoperta che alcuni fenotipi SCID erano associabili a deficienze e mutazioni della Jak3 (Russell et al., 1995), ha suscitato l'interesse verso questa proteina quale possibile target per lo sviluppo di farmaci immunosoppressori da impiegare nel trattamento di pazienti che hanno subito trapianti di organi.

E' stato riportato che il 2-NVK inibisce selettivamente Jak 3 con un IC₅₀ pari a 6.8 µM nei test dell'attività con l'enzima.

Studi precedenti condotti nel laboratorio, avevano dimostrato che il 2-NVK induce apoptosi nelle cellule di leucemia cronica (CLL) quando impiegato a concentrazione 10 µM per 4 ore (Vouglar et al., 2008) risultante dall'aumento della percentuale di cellule che espongono residui di fosfatidilserina, dall'aumento delle cellule che avevano perso il potenziale di membrana mitocondriale e dal rilascio di citocromo c.

Sulla base di queste osservazioni, cellule di leucemia dei linfociti T Jurkat (clone E.6.1) sono state esposte al 2-NVK alle concentrazioni 10-30-100 µM per 1-2-4 ore.

I metodi impiegati per la caratterizzazione dl tipo di morte indotta dal 2-NVK sono stati:

- analisi citofluorimetrica dell'esposizione dei residui di fosfatidil serina;
- analisi citofluorimetrica della variazione del potenziale di membrana mitocondriale;
- valutazione dell'attivazione della caspasi-3; PARP;-7 e ;-8 mediante western blotting;

Analisi citofluorimetrica dell'esposizione dei residui di fosfatidil serina.

Uno degli eventi caratteristici delle prime fasi della morte cellulare apoptotica è l'esposizione nell'ambiente extracellulare dei residui di fosfatidil serina, un fosfolipide normalmente presente all'interno della membrana plasmatica. In seguito allo stimolo apoptotico, si attivano delle ammino-fosfolipide-translocasi che determinano la trans locazione della fsfatidil serina sulla superficie extracellulare della membrana plasmatica (Darzynkiewicz, Z., et al. 1992, 1997).

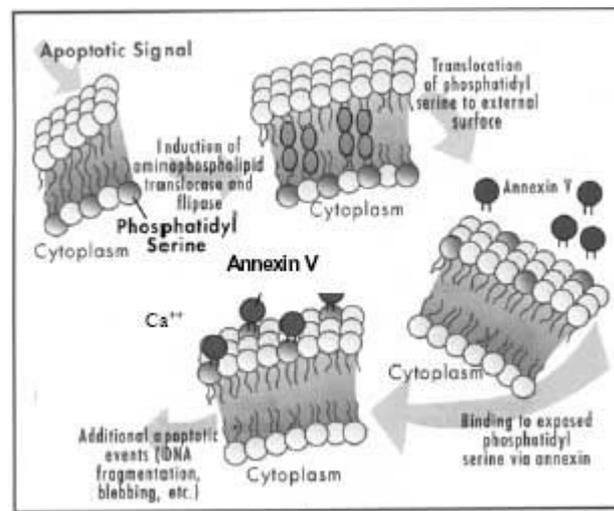


Fig.1 (Immagine tratta dal sito internet www.merckbioscience.co.uk)

La marcatura dei residui del fosfolipide è possibile grazie all'annessina una proteina che lega la fosfatidilserina con elevata affinità quando essa si trova all'esterno della membrana plasmatica. In analisi citofluorimetrica o in microscopia a fluorescenza, l'annessina è coniugata a molecole fluorescenti, solitamente fluoresceina isotiocianato (FITC), che emette nella regione del verde dello spettro visibile. La marcatura con annessina-FITC e ioduro di propidio, consente la distinzione delle cellule che si trovano nelle prime fasi dell'apoptosi da quelle che si trovano in apoptosi avanzata o in necrosi.

Le cellule che si trovano nelle fasi iniziali dell'apoptosi sono le cellule che legano l'annessina in quanto i residui di fosfatidilserina sono rivolti nell'ambiente extracellulare, ma poiché mantengono l'integrità della membrana plasmatica, non consentono l'ingresso del PI. Tali cellule sono quelle che risultano positive alla colorazione con annessina e negative a quella con il PI.

Le cellule che invece risultano positive alla colorazione con annessina V-FITC e PI sono cellule che espongono residui di fosfatidilserina ma presentano lesioni a livello della membrana

plasmatica che consente l'accesso del PI. Queste cellule vengono classificate come cellule in apoptosi avanzata o necrosi.

I risultati ottenuti dalla marcatura con annessinaV/PI delle cellule Jurkat esposte al 2-NVK sono riportati in figura 1.

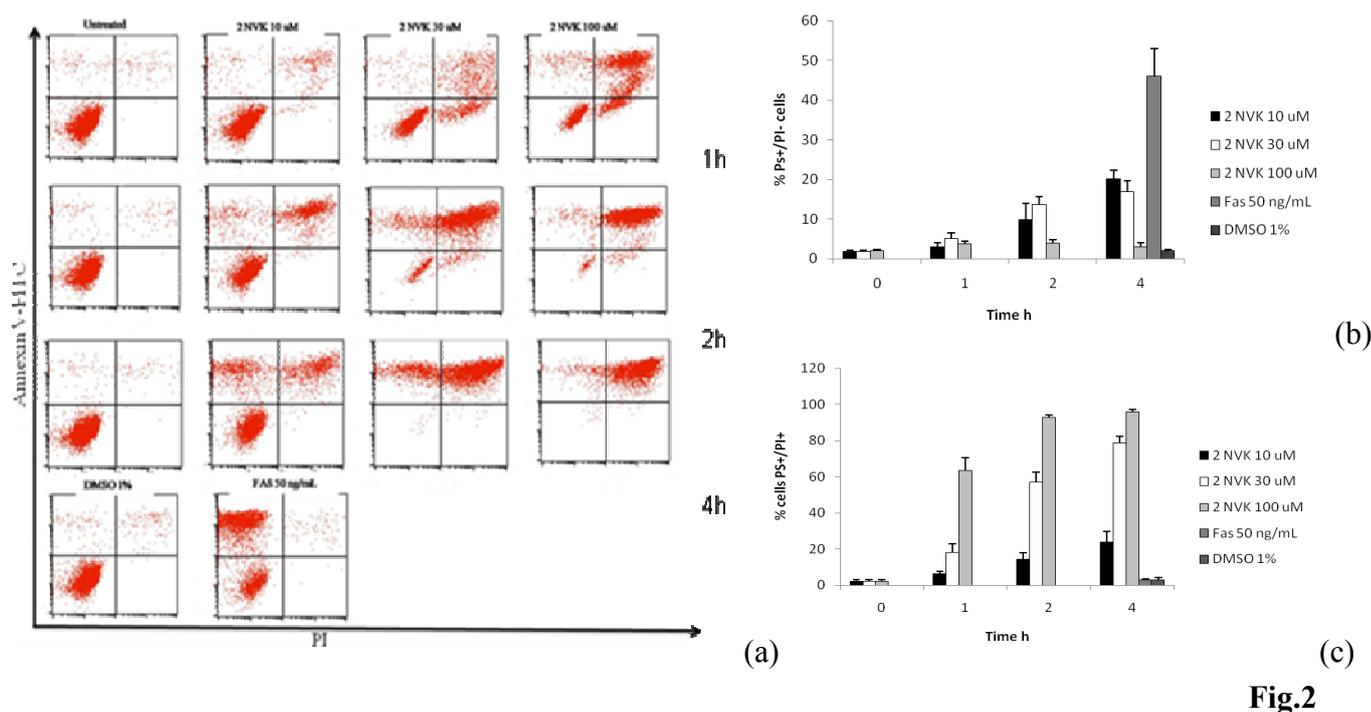


Fig.2

In figura 2a sono riportati i pannelli derivanti dalla marcatura delle cellule Jurkat con annessinaV-FITC (Bender,Austria) e ioduro di propidio. Gli istogrammi a barre indicati in figura, rappresentano la quantificazione percentuale delle cellule che risultano positive alla marcatura con annessina e negative alla marcatura con ioduro di propidio (PS+/PI-) (Fig.2 a) e le cellule positive ad entrambe le colorazioni (PS+/PI+)(Fig.2 c)

Dopo l'esposizione al 2-NVK a diverse concentrazioni ai tempi indicati, $0,5 \times 10^6$ cellule sono state marcate con annessina V coinugata con FITC in un buffer contenente calcio per 10' a temperatura ambiente, e successivamente colorate con ioduro di propidio (concentrazione finale 50 ng/mL). Le cellule sono state poste su ghiaccio ed acquisite al citofluorimetro.

Come risulta dai pannelli riportati in figura 1a, l'esposizione delle colture Jurkat al 2 NVK 10 μ M causa un aumento delle cellule positive alla marcatura con annessina e negative a quella con ioduro di propidio (PS⁺/PI⁻: quadrante in alto a destra) che rappresentano le cellule apoptotiche.

Tale aumento risulta proporzionale al tempo di esposizione delle colture (Fig.2 b), anche se l'effetto, dopo 4 ore di esposizione, non risulta sovrapponibile alla stimolazione con l'anticorpo anti-FAS, utilizzato come controllo positivo.

L'esposizione al 2-NVK 30 μ M, induce un moderato aumento delle cellule PS⁺/PI⁻, mentre induce un notevole aumento della percentuale di cellule positive alla marcatura con annessina ed a quella con ioduro di propidio (PS⁺/PI⁺ :quadrante in alto a destra) che rappresenta la percentuale di cellule necrotiche.

L'esposizione al 2-NVK 100 μ M causa un notevole aumento della percentuale di cellule positive alla marcatura con entrambi i fluorocromi visibile dopo 1 ora di esposizione delle colture cellulari.

Variatione del potenziale di membrana mitocondriale

Al fine di caratterizzare il tipo di morte cellulare indotta dal 2-NVK, è stata eseguita la tecnica citofluorimetrica per la determinazione delle variazioni del potenziale di membrana mitocondriale.

Al termine di ogni trattamento, $0,5 \times 10^6$ cellule sono state colorate con il fluorocromo tetrametil rodamina-etil-estere perclorato (TMRE) alla concentrazione finale di 50 nM per 10 minuti a 37°C e successivamente analizzate al citofluorimetro.

Il TMRE è una molecola che penetra attraverso la membrana cellulare e si accumula nei mitocondri seguendo il gradiente elettrochimico. La perdita del potenziale di membrana

determina la fuoriuscita del TMRE dai mitocondri con conseguente riduzione della fluorescenza emessa (Jayaraman, 2005).

I pannelli risultanti dall'analisi citofluorimetrica sono indicati in figura 3 unitamente alla quantificazione della percentuale di cellule che hanno perso il potenziale di membrana.

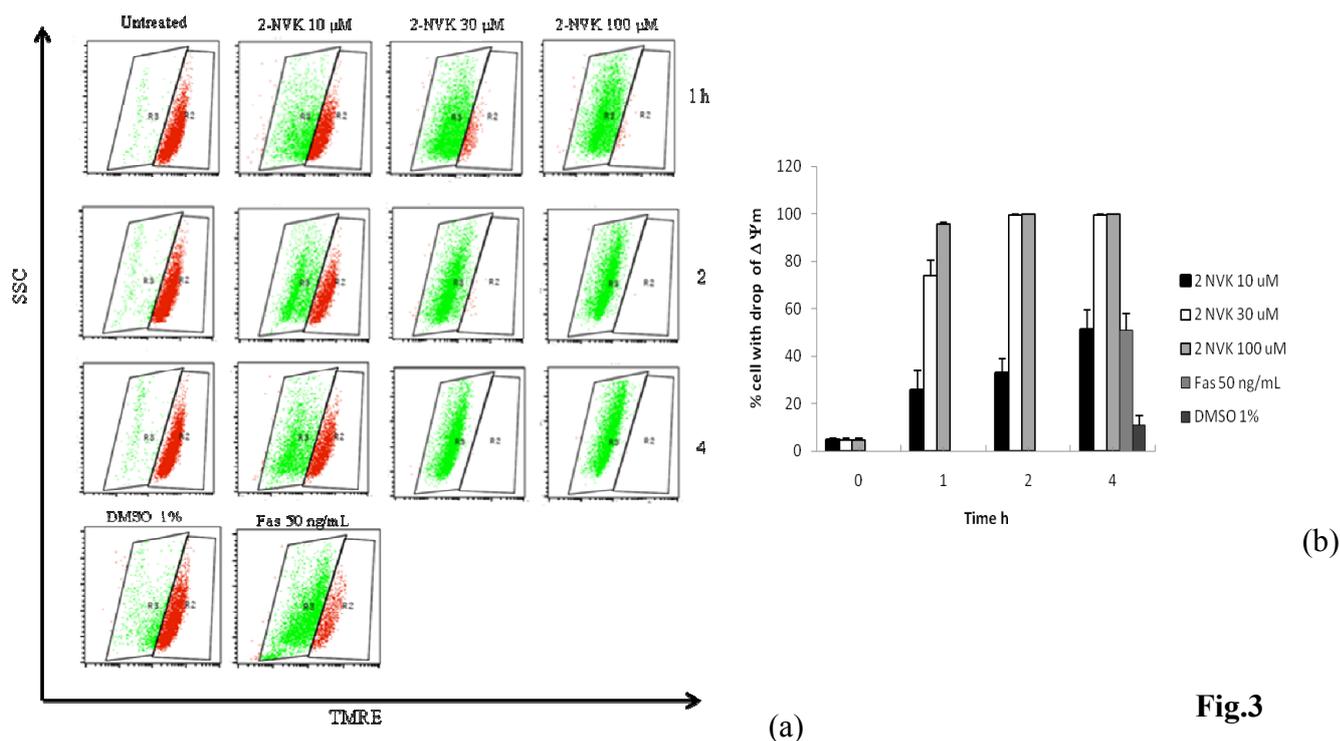


Fig.3

In figura 3a sono riportati i pannelli derivanti dall'acquisizione citofluorimetrica delle colture Jurkat esposte al 2-NVK alle diverse concentrazioni e ai tempi indicati.

La regione R2 indica le cellule che hanno mitocondri non depolarizzati e quindi caratterizzati da alti valori di fluorescenza del TMRE. La regione designata con la notazione R3, si riferisce alle cellule i cui mitocondri hanno subito depolarizzazione della membrana e che presentano valori di fluorescenza inferiori.

Come risulta dai pannelli e dalla quantificazione della percentuale delle cellule che hanno perso il potenziale di membrana mitocondriale, il 2-NVK 10 µM induce la depolarizzazione dei mitocondri proporzionale al tempo di esposizione delle colture producendo, dopo 4 ore di

esposizione, un effetto che risulta sovrapponibile a quello ottenuto dall'esposizione delle colture cellulari al anticorpo anti-FAS, mentre il 2-NVK 30 e 100 μM inducono un aumento della percentuale di cellule contenute nella regione R3 rilevabile dopo 1 ora di esposizione delle colture cellulari, suggerendo la rapida depolarizzazione della membrana mitocondriale.

Western blotting

Al termine del periodo di esposizione delle colture Jurkat al 2-NVK, 3×10^6 cellule sono state raccolte, lavate in PBS e risospese in un buffer di lisi (30 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glicerolo, 1% triton X-100), sonicate e conservate per la successiva analisi. Dopo la quantificazione delle proteine, effettuata mediante il dosaggio Bradford, 10 μg di proteine sono state caricate su gel di acrilamide (7-13%), elettrotrasferite su membrana di nitrocellulosa ed, successivamente, incubate con anticorpi diretti contro la caspasi-3,-7,-8 e contro il substrato della caspasi-3 poli-ADP-polimerasi (PARP). Al termine del periodo di incubazione con gli anticorpi primari, le membrane sono state lavate in TBS-Tween (Trisma base 10 mM, NaCl 150 mM e tween 20 0,1%) e successivamente incubate per 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano.

Al termine dell'ora di incubazione con i rispettivi anticorpi secondari, le membrane sono state lavate in TBS-Tween per 15 minuti.

La rivelazione della perossidasi è stata realizzata mediante determinazione chemiluminescente (ECL Western Blotting Detection Reagents RPN2106, Amersham) e il segnale è stato impresso su lastre fotografiche.

La figura 4 riporta i risultati derivata dall'analisi western blotting eseguita sui lisati delle cellule Jurkat esposte al 2-NVK.

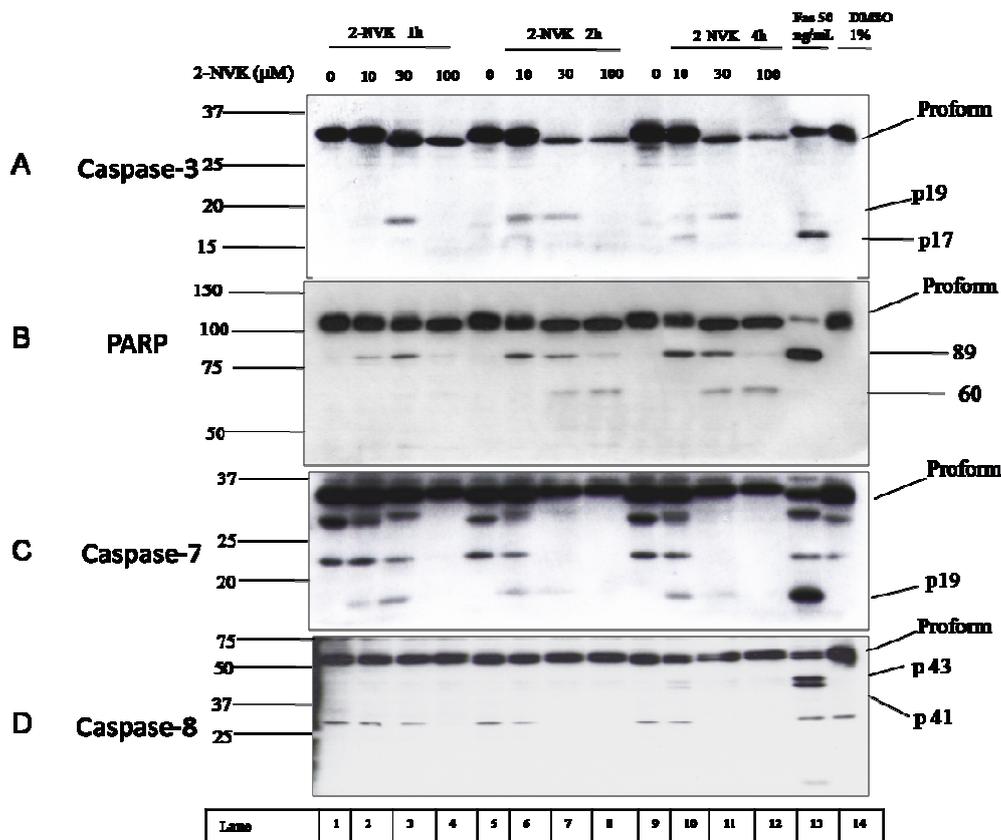


Fig.4

Come mostrato in figura 4, l'esposizione delle colture Jurkat al 2-NVK 10 µM causa l'attivazione della caspasi-3 risultante dall'espressione del frammento da 19 kda evidente dopo 2 ore di esposizione. Dopo 4 ore si osserva l'espressione del frammento da 17 kda (Fig. 4A lane 10), presente anche in seguito all'esposizione delle colture al ligando diretto contro FAS (Fig. 4A, lane 13).

L'attivazione della caspasi-3 trova riscontro anche dall'analisi del clivaggio di PARP. Dopo 4 ore di esposizione delle colture al 2-NVK 10 µM, si osserva la massima espressione del frammento da 89 kda conseguente al clivaggio di PARP da parte della caspasi-3 (Fig. 4B, lane 10).

Il 2 NVK 10 μ M induce attivazione della caspasi-7 visibile dopo 4 ore di esposizione delle colture (Fig. 4C, *lane* 10). La caspasi-7, normalmente è presente come una proteina dal peso molecolare di 35 kda. In presenza di stimoli apoptotici, la caspasi-7 è processata in un frammento di 32 kda ed in un frammento di 19 kda che rappresenta la subunità attiva.

L'attivazione della caspasi-3 risulta anche in seguito all'esposizione delle colture al 2-NVK 30 μ M visibile dopo 1 ora di, ma si osserva una riduzione dell'espressione del frammento dopo 4 ore di esposizione (Fig.4 A *lane* 11).Dopo 2 ore di esposizione, il 2NVK 30 μ M induce la degradazione di PARP in un frammento di 60kda che rimane presente anche dopo 4 ore (Fig3B, *lane* 7,11).

Inoltre non è stata osservata alcuna attivazione della caspasi-8, fatta eccezione di un debole frammento presente nell'esposizione delle colture al 2-NVK 10 μ M, visibile dopo 4 ore.

Il 2 NVK 100 μ M non induce né attivazione delle caspasi, ma induce la degradazione di PARP come risulta dalla presenza di un frammento del peso molecolare di 60kda (Fig. 3B *lane* 8,12).

In letteratura è stato riportato che l'esposizione delle cellule Jurkat a stimoli necrotici come perossido di idrogeno, induce la degradazione di PARP in frammenti del peso molecolare di 65kda (Gobeil, 2001).

Dall'analisi western blotting è emerso che l'esposizione delle colture Jurkat al 2-NVK 30 e 100 μ M induce una riduzione della proforma della caspasi-3, visibile dopo 2 e 4 ore di esposizione delle colture cellulari.

Poiché è stato riportato in letteratura che le calpaine sono responsabili del clivaggio della proforma della caspasi-3 in frammenti del peso di 30 kda (Blomgren et al., 2001;McGinnis et al., 1999), è stato indagato il ruolo delle calpaine nel processo di morte indotto dal 2-NVK 30-100 μ M utilizzando come modello sperimentale cellule HeLa overesprimenti l'inibitore endogeno delle calpaine, la calpastatina.

Sono stati condotti esperimenti in cui colture di cellule HeLa *wilde type* sono state esposte al 2-NVK 10,30 e 100 μM per 2 e 4 ore, e analizzati mediante western blotting per l'espressione della caspasi-3 e dell'attivazione della calpaina.

L'attività della calpaina è stata monitorata attraverso l'analisi mediante *western blotting* dei prodotti (SBDP 145/150 KDa) che derivano dal clivaggio di uno dei substrati specifici della calpaina: la proteina alfa- spectrina.

L'analisi della espressione della caspasi-3 e dell'attivazione della calpaina è stata successivamente eseguita nelle colture di cellule HeLa stabilmente trasdotte con vettori virali contenenti il gene che codifica per la calpastatina.

In particolare, gli esperimenti sono stati condotti su cellule trasdotte con un substrato che viene degradato in presenza di caspasi-3 attiva legato alla sequenza codificante il substrato fluorescente YFP (C3FRET-YFP) utilizzato come controllo dell'introduzione del vettore virale nelle cellule e due sequenze codificanti la calpastatina e il substrato fluorescente YFP (CLP-YFP) e GFP (MITO-CALP-GFP) precedentemente clonate in laboratorio (Munarizz et al., 2005; Bano et al., 2007)

Dopo l'introduzione del vettore virale, le cellule sono state sortate al citofluorimetro e mantenute in coltura e successivamente piastrate in piastre a 6 pozzetti ed esposte al 2-NVK 10, 30 e 100 μM per 4 ore.

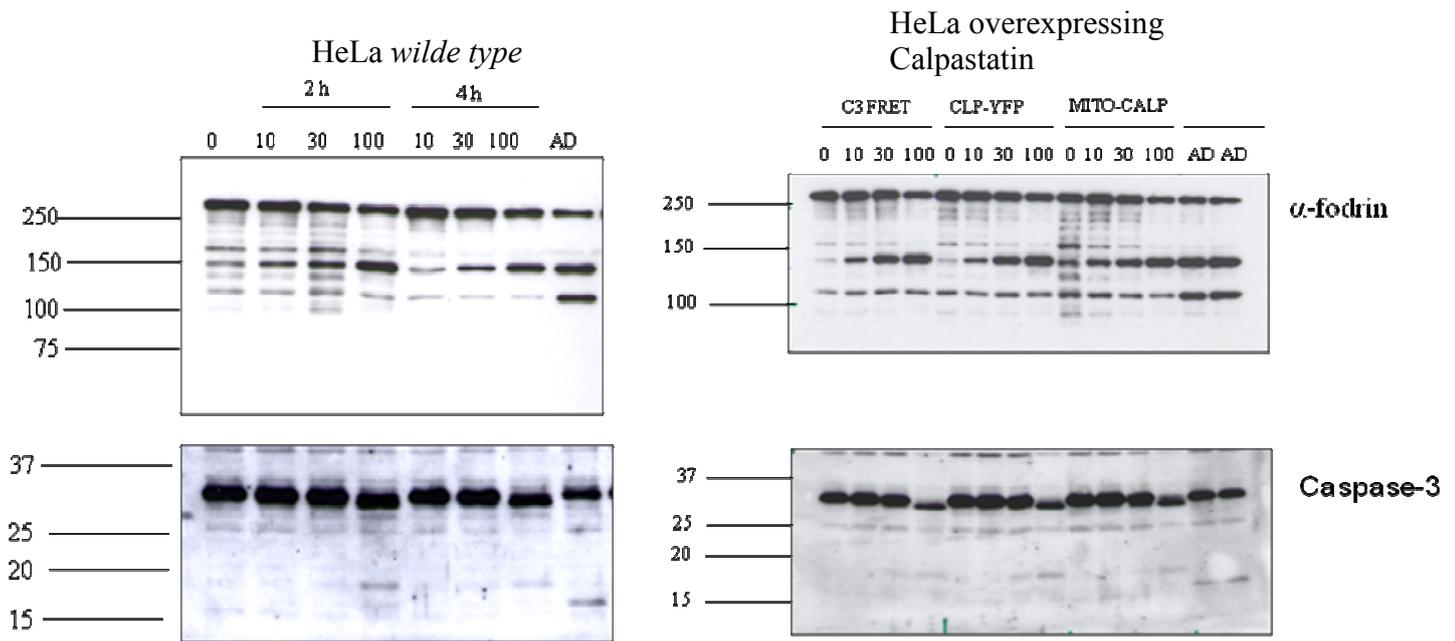


Fig.5

Come riportato in figura 5, l'esposizione delle colture HeLa wilde type al 2-NVK 10 μ M non causa attivazione della caspasi-3, mentre induce l'espressione del frammento di 150 kda, che indica l'attivazione della calpaina visibile dopo 2 ore di esposizione. Il 2-NVK 30 μ M induce l'espressione del frammento di 150 kda dopo 4 ore di esposizione, mentre non determina attivazione della caspasi-3.

L'inattivazione della caspasi-3, risulta anche dall'assenza di variazioni nell'espressione del frammento di 120 kda che deriva dal clivaggio della spectrina da parte della caspasi-3, rispetto alle colture controllo e rispetto al trattamento delle colture con actinomicina D (AD) utilizzata come controllo positivo dell'induzione di apoptosi nelle cellule HeLa.

Il 2-NVK 100 μ M induce, invece, l'aumento dell'espressione del frammento di 150 kda della spectrina indicando l'attivazione della calpaina, e induce anche l'attivazione della caspasi-3 come risulta dall'espressione del frammento 19 kda.

Tuttavia la sovra espressione dell'inibitore endogeno della calpaina non causa riduzione dell'espressione del frammento da 150 kda indotta dal 2-NVK 10-30-100 μ M nelle colture che sovra esprimono la sequenza C3FREET.

Entrambi i geni che codificano la calpastatina non si sono dimostrati in grado di revertire l'effetto indotto dal 2-NVK nelle colture HeLa.

Zimografia per la determinazione dell'attivazione delle calpaine

I risultati ottenuti dall'analisi western blotting hanno suggerito che, probabilmente, le calpaine non responsabili della degradazione della spectrina.

Esperimenti preliminari successivi, hanno consentito di identificare delle proteasi calcio dipendenti che non corrispondono infatti a calpaine.

E' stata eseguita una zimografia in cui, lisati cellulari ottenuti da cellule HeLa *wylde type*, sono stati caricati su gel di acrilamide copolimerizzata con caseina, substrato della calpaina (Roser et al., 1995).

In questa tecnica, i lisati cellulari, dopo essere stati caricati su gel, vengono sottoposti a corsa elettroforetica in buffer di corsa (125 mM Tris-base, 625 mM glicina, 5 mM EDTA ph 8 e 10mM di DTT)

Al termine della corsa, i gel vengono incubati per 16-18 ore in buffer contenente 50 mM Tris-HCl, 5 mM di CaCl_2 e 10 mM di mercaptoetanolo.

Durante l'incubazione, la caseina viene degradata laddove sono presenti calpaine attivate. In tali siti, si formeranno bande chiare dopo la colorazione dei gel con blu di coomassie.

In figura 5, sono riportate le immagini acquisite relative alla zimografia in cui i gel sono stati incubati in buffer contenete Ca^{++} e buffer contenente 5 mM di EDTA.

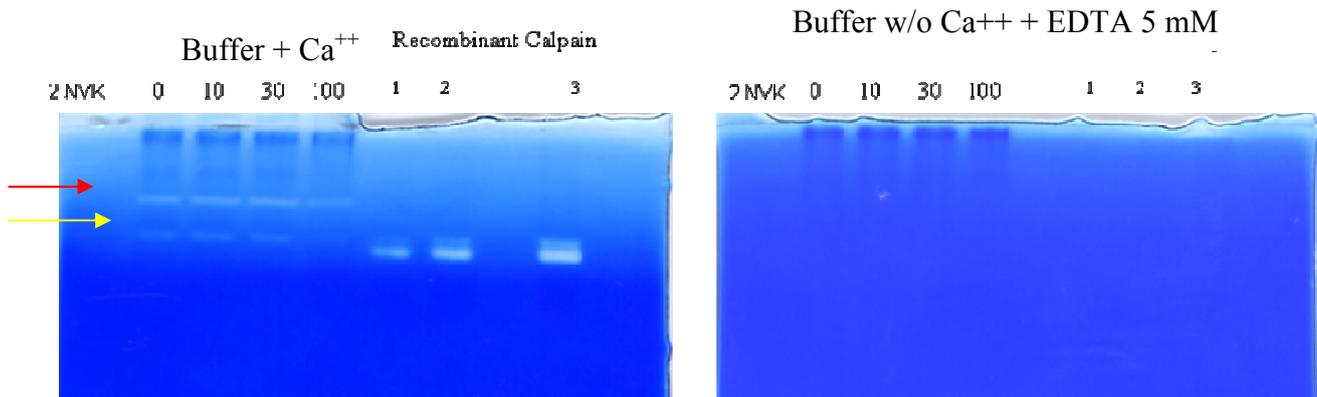


Fig.6

La figura 6 riporta le immagini relative alla zimografia eseguita su lisati di cellule HeLa esposte al 2-NVK 10,30 e 100 μM per 4 ore.

La zimografia ha consentito di identificare due bande con altezza differente.

Come si osserva dalle immagini riportate in Fig.5 a la banda superiore, evidenziata in rosso, risulta presente sia nelle cellule controllo che nelle colture HeLa esposte al 2-NVK, mentre la banda inferiore non permane nelle cellule esposte al 2-NVK 100 μM .

Tuttavia, l'altezza delle bande che risulta dal caricamento dei lisati cellulari sul gel non corrisponde a quella delle bande che si osserva dai pozzetti caricati con la calpaina ricombinante.

L'incubazione dei gel in buffer privo di calcio (Fig.5 b) non ha consentito la visualizzazione di bande indicando l'inattivazione di queste proteasi e la dipendenza dal calcio necessaria per la loro attivazione.

Tali proteine potrebbero riferirsi a calpaine mutante recanti sequenze amminoacidiche diverse da quelle specifiche per gli inibitori e, pertanto, non riconosciute da essi.

Bibliografia

AKAGI Y., ITO K., SAWADA S.(1995) Radiation-induced apoptosis and necrosis in Molt-4 cells: A study of dose-effect relationship and their modification . *Int J Radiat Biol* **64**: 47-56.

AMNUAIKIT C., IKEUCH I., OGAWARA K., HIGAKI K., KIMURA T., (2005) Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use. *Int J Pharmacol* **289**, 167-178.

ANSELMINO C., and CADET J., (1995) Photoreaction of 5-methoxypsoralen with thymidine. Isolation and characterization of a pyrone-side monoadduct involving the pyrimidine methyl group. *J. Photochem. photobiol. B* **27**, 167-175.

AO Y., SATOH K., SHIBANO K., KAWAHITO Y., SHIODA S. (2008) Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from rutaceae. *J Clin Biochem Nutr.*; **43**:6-12.

ARIAZI E.A., GOULD M.N. (1996) Identifying differential gene expression in monoterpene-treated mammary carcinomas using subtractive display. *J Biol Chem* **271**:29286-94.

AVERBECK, D. (1989) Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism. *Photochem. Photobiol.* **50**, 859-882.

AZZOLI C., MILLER V., NGM K., KRUG L.M., SPRIGGS D.R., TONG W.P., RIEDEL E.R., KRIS M.G. (2003) A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**:493-8.

BALFOUR J. AND MC TAVISH D. (1992). Transdermal estradiol. A review of its pharmacological profile, and therapeutic potential in the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Drugs Aging* **2**: 487-507.

BANO D, MUNARRIZ E, CHEN HL, ZIVIANI E, LIPPI G, YOUNG KW, NICOTERA P.(2007) The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death. *Ann N Y Acad Sci.* **1099**:451-5.

BARRY B. (1991).Lipid –protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *J Control Rel* **15**:237-248.

BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M. (2008) Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol* **46**:446-75

BISIGNANO G., MARINO A., REALE H., FURNERI M. P. & DUGO P. (2003). Attività antimicoplasmatica in vitro dell'essenza del bergamotto. In: "BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive". Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp. 183-184.

BLOMGREN K, ZHU C, WANG X, KARLSSON JO, LEVERIN AL, BAHR BA, MALLARD C, HAGBERG H.(2001) Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem.* **276**(13):10191-8.

BOUVIER, M., SZATKOWSKI, M., AMATO, A. AND ATTWELL, D. (1992) The glial cell glutammate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**, 471-474.

BRISCOE J, KOHLHUBER F, MÜLLER M.(1996) JAKs and STATs branch out. *Trends Cell Biol.* **6**(9):336-40

BUCHBAUER, G., JIROVETZ, L., JAGER, W., DIETRICH, H. AND PLANK, C. (1991) Aromatherapy: evidence for sedative effects of the essential oil of lavender after inhalation. *Z. Naturforsch* **46**, 1067-1072.

BUCHBAUER G, JIROVETZ L, JÄGER W, PLANK C, DIETRICH H.(1993).Fragrance compounds and essential oil with sedative effects upon inhalation. *J Pharm Sci.* **82**:660-4

BUTLER MS, NEWMAN DJ.(2008) Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholestemics and anticancer drug discovery. *Prog Drug Res.* **65**:1, 3-44.

CAL K. & SZNITOWSKA M. (2003). Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes- in vitro studies. *J. Control. Release* **93**: 369-376.

CAPASSO, F., DE PASQUALE, R., GRANDOLINI, G. AND MASCOLO, N. (2000) Farmacognosia. Farmaci naturali, loro preparazioni ed impiego terapeutico. Sprinter-Verlag, Milano, 2000.

CARSON C.F., MEE B.J.,RILEY T.V. (2002). Mechanism of action of *Malaleuca Alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus Aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1914-1920.

CATCHPOOLE DR, STEWART BW.(1993). Etoposide-induced cytotoxic in human T-cell leukemic lines: delayed loss of membrane permeability rather than DNA fragmentation as an indicator of programmed cell death. *Cancer Res* **53**:4287-96.

CHEN X., YANO Y., HASUMA T., YOSHIMATA T., YINNA W., OTANI S. (1999). Inhibition of farnesyl protein transferase and p21ras membrane association by d-limonene in human pancreas tumor cells in vitro. *Chin Med Sci J* **14**: 138-144.

CHERNG J.M., SHIEH D.E., CHIANG W., CHANG M.Y. & CHIANG L.C. (2007). Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71** : 1500-1504.

CLARK G., MATHIEU M-C., OWEENS M.A., DRESSLER I.G., EUDEYI.,TORMEY D.C., OSBORNE C.K., GILCHRIST K.W., MANSOUR F.G., ABELOFF M.D., MCGUIREW.L. (1992) Prognostic significance of S-phase fraction in good-risk, node negative breast cancer patient. *J. Clin. Oncol.* **10**, 428-432.

CLARK S.S., PERMAN S.M., SAHIN M.B., JENKINS G.J., ELEGBEDE J.A. (2002) Antileukemia activity of perillyl alcohol (POH): uncoupling apoptosis from G0/G1 arrest suggests that the primary effect of POH on Bcr/Abl-transformed cells is to induce growth arrest. *Leukemia* **16**:213-22.

COHEN GM., SU X-M.,SNOWDEN RT.,DINSDALE D., SKILLETER DN.(1992)Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J.***286**:331-334.

CONCONI, M.T., MONTESI, F. AND PARNIGOTTO, P.P. (1998) Antiproliferative Activity and Phototoxicity of some Methyl derivatives of 5-Methoxypsoralen and 5-Methoxyangelicin. *Pharmacol. Toxicol.* **82**, 193-198.

CORASANITI M.T., MAIUOLO J., MAIDA S., FRATTO V.,NAVARRA M., RUSSO R., AMANTEA D., MORRONE L.A. & BAGETTA G. (2007). Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA induced cell death in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **151**: 518-52.

CRISPO, F. AND DUGO, G. (2003) Il bergamotto: coltivazione, tecnologie di estrazione, aspetti storici, economici, e legislativi. In: “ BERGAMOTTO 98-Stato dell’arte e prospettive”. Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp.163-178.

CROWELL PL, CHANG RR, REN ZB, ELSON CE, GOULD MN. (1991) Selective inhibition of isoprenylation of 21-26-kDa proteins by the anticarcinogen d-limonene and its metabolites. *J Biol Chem.* **15**;266(26):17679-85.

CROWELL, P.L., REN, Z., LIN, S., VEDEJS, E. AND GOULD, M.N. (1994) Structure-activity relationship among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochem. Pharmacol.* **47** (8), 1405-1415.

CROWELL, P.L. & GOULD, M.N. (1994). Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene. *CRC Crit. Rev. Oncog.* **5**, 1-22.

CRUZ, P., CHEN, S.C., BAYOUMI, A.M., SOON, S.L., AFTERGUT, K., SEXTON, S.A., MC-CALL, C.O. AND GOLDSTEIN, M.K. (2004) A catalog of dermatology utilies: a measure of the burden of skin diseases. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **9**,160-168.

DALL'ACQUA, F. (1986) Furocoumarin photochemistry and main biological implications. *Curr. Probl. Dermatol.* **15**, 137-163.

DARZYNCKIEWICZ Z., BRUNO S., DEL BINO G., GORCZYCA W., HOTZ MA., LASSOTA P., TRAGANOS F.(1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13:795-808.

DE MASI, A. (2003) Riscoperta di un manufatto: dal bergamotto una tabacchiera. In "BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive". Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp. 239-240.

DEL TORO-ARREOLA S., FLORES-TORRALES E., TORRES-LONZANO C. ET AL. (2005).Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with limphoma. *Int Immunopharmacol* **5**: 829-838.

DURING, T., GERST, F., HANSEL, W., WULFF, H. AND KOPPENHOFER, E. (2000) Effects of three alkoxyypsoralens on voltage gated ion channels in Ranvier nodes. *Gen. Physiol. Biophys.* **19**, 345-364.

DUETZ W.A., BOUWMEESTER H., VAN BEILEN J.B., WITHOLT B. (2003) Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**:269-77.

HEDLEY DW, CLARK GM, CORNELISSE CJ, KILLANDER D, KUTE T, MERKEL D.(1993) DNA Cytometry Consensus Conference. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* **28**:55-9.

EDRIS AE.(2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.* **21**(4):308-23.

ELEGBEDE J.A., ELSON C.E., TANNER M., QURESHIA. AND GOULD M.N. (1986) Regression of rat primary mammary tumors following dietary d-limonene. *J.Natl. Cancer Inst.* **76**:323-325.

ELISABETSKY, E., BRUM, L.F. & SOUZA, D.O. (1999). Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomed.* **6**, 107-113.

ELSON C.E., MALTZMANN T.H., BOSTON J.L., TANNER M.A. AND GOULD M.N. (1988). Anticarcinogenic activity of d-limonene during the initiation and promotion/progression stages of DAMBA-induced rat mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* **9**:331-332.

ELSON, C.E. (1995) Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. *J. Nutr.* **125**, 1666S-1672S.

EPA (Environmental Protection Agency) (1991). Alpha_{2u} globulin association with chemically induced renal toxicity and neoplasia in the male rat. Prepared for the Risk Assessment Forum of the U.S. EPA, Washington, DC, EPA/625/3-91/019F

EUDEY T.LYNN (1996) Statistical considerations in DNA flow cytometry. *Statistical Science* **11**, 320-334.

FABBRI F, BRIGLIADORI G, CARLONI S, ULIVI P, VANNINI I, TESEI A, SILVESTRINI R, AMADORI D, ZOLI W. (2008) Zoledronic acid increases docetaxel cytotoxicity through pMEK and Mcl-1 inhibition in a hormone-sensitive prostate carcinoma cell line. *J Transl med*, 8: 6-43

FELTHAM E.J., ALMOND M.J., MARSTON G., LY V.P., WILTSHIRE K.S. (2000) Reactions of alkenes with ozone in the gas phase: a matrix-isolation study of secondary ozonides and carbonyl-containing reaction products. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, . **56**:2605-16.

FERNO M., BALDETORP B., BORG A., OLSSON H., SIGURDSSON H., and KILLANDER D.(1992). Flow cytometric DNA index and S-phase fraction in breast cancer in relation to other prognostic variables and clinical outcome. *Acta Oncologica* **31**, 157-165.

FINSTERER, J. (2002) Earl Grey tea intoxication. *Lancet* **359**, 1484.

FISHER K. & PHILIPS C.A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J. Appl. Microbiol.* **101**: 1232-1240.

FORD R.A., DOMEYER B., EASTERDAY O., MAIER K., MIDDLETON J. (2000). Criteria for development of a database for safety evaluation of fragrance ingredients. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **31**: 166-181.

FORLOT, P. (1998) Perspectives de la bergamotte dans le domaine pharmaceutique. *Essenze derivati agrumari* **1**, 45-56.

FORLOT, P. (2000) Toxicological & Pharmacological properties of bergapten. *Essenze Derivati Agrumari* **70**, 147-153.

FORLOT, P. (2003) Cosmesi e usi cosmetici dell'essenza di bergamotto. In "BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive". Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp.45-52.

FRUGONI, S., AND CILIBERTO, M. (1996) Attività antibatterica degli oli essenziali. *Microbiologia medica* **11**, 244-245.

GASPARRO F.P. (2000) The role of PUVA in the treatment of psoriasis. Photobiology issues related to skin cancer incidence *Am J Clin Dermatol* **1**:337-48.

GELB, M.H., TAMANOI, F., YOKOYAMA, K., GHOMASHCHI, F.M ESSION, K. AND GOULD, N. (1995) The inhibition of protein prenyltransferases by oxygenated metabolites of limonene and perillyl alcohol. *Cancer Letters* **91**, 169-175.

GHELARDINI C, GALEOTTI N, SALVATORE G, MAZZANTI G.(1999) Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Med.* **65**:700-3

GOBEIL S, BOUCHER CC, NADEAU D, POIRIER GG.(2001) Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ.***8**(6):588-94

GOLDSTEIN LJ, O'NEILL A, SPARANO JA, PEREZ EA, SHULMAN LN, MARTINO S, DAVIDSON NE.(2008). Concurrent doxorubicin plus docetaxel is not more effective than concurrent doxorubicin plus cyclophosphamide in operable breast cancer with 0 to 3 positive axillary nodes: North American Breast Cancer Intergroup Trial E 2197. *J Clin Oncol.* Sep 1;26:4092-9.

GREIF N.(1967) Cutaneous safety of fragrance material as measured by the maximization test. *American perfumer and Cosmetics* **82**: 54-57.

GUPTA, A.K. AND ANDERSON, T.F. (1987). Psoralen photochemotherapy. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **17**, 703-734.

GUSTAFSON J.E., LIEW Y.C., CHEW S., MARKHAM J.L., BELL H.C., WILLYE S.G., WARMINGTON J.R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia Coli*. *Lett Appl Microbiol* **26**; 194-198.

GUY R.H. (1996). Current status and future prospects of transdermal drug delivery. *Pharm Res.* **13**: 1765-1769.

HAAG J.D., GOULD M.N. (1994) Mammary carcinoma regression induced by perillyl alcohol, a hydroxylated analog of limonene. *Cancer Chemother Pharmacol*, **34**:477-83.

HAAG J.D., LINDSTROM M.J., GOULD M.N. (1992) Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res*, **52**:4021-6.

HAMBERGER, A.C., CHIANG,G.H., NYLEN, E.S., SCHEFF, S.W. AND COTMAN, C.W. (1979). Glutamate as a CNS transmitter: evaluation of glucose and glutamine as precursors for the synthesis of preferentially released glutamate. *Brain Res.* **168**, 513-530.

HELANDER I.M., ALAKOMI H.L., LATVA-KALA K., MATTILA-SANDHOLM T., POL I., SMID E.J., GORRIS L.G.M., VON WRIGHT A.(1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. *J Agric Food Chem* **46**: 3590-3595.

HOMBURGER F., TREGER A. AND BOGER E.(1971) Inhibition of subcutaneous and intravenous benzo(st)pentaphene carcinogenesis by sweet orange oil and d-limonene. *Oncology* **25**,1-10.

IPEK E., ZEYTINOGLU H., OKAY S., TUYLU B.A., KURKCUOGLU M., HUNSU CAN BASER K., (2005) Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chem* **93**: 551-556.

ISHIHARA H, MARTIN BL, BRAUTIGAN DL, KARAKI H, OZAKI H, KATO Y, FUSEYANI N, WATABE S, HASHIMOTO K, UEMURA D, et al.(1989). Calyculin A and okadaic acid: inhibitor of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun*; **159**(3):871-7.

ITANI WS, EL-BANNA SH, HASSAN SB, LARSSON RL, BAZARBACHI A, GALI-MUHTASIB HU.(2008).Anti colon cancer components from lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: Mechanistic basis. *Cancer Biol Ther* **7**.

JAYARAMAN S.(2005) Flow cytometric determination of mitochondrial membranepotential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreaticbeta cell lines: Comparison of tetramethylrhodamineethylester(TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580)*Journal of Immunological Methods* **306** 68–79

JENNER P.M., HAGAN E.C., TAYLOR J.M., COOK E.L., FITZHUGH O.G. (1964). Food flavorings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicol.* **2**:327-343.

JI J., ZHANG L., WU Y.Y., ZHU X.Y., LV S.Q., SUN X.Z. (2006) Induction of apoptosis by d-limonene is mediated by a caspase-dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, **47**: 2617-24.

JIRI R., PARJIA T., DAS B. (1999) d-Limonene chemoprevention of hepatocarcinogenesis in AKR mice: inhibition of c-jun and c-myc. *Oncol Rep* **6**: 1123-1127.

JORDAN V.C., PARKER C.J., MARROW M. (1993). Update: Breast cancer treatment and prevention with antiestrogens in the 1990s. *Endocr. Rev.* **1**;82-85.

KAJI I., TATSUTA M., IISHI H., BABA M., INOUE A., KASUGAI H. (2001). Inhibition by d-limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21 ras plasma membrane association. *Int J Cancer* **93**: 441-444.

KANIKKANNAN N., ANDEGAS., BURTON S., BABU R., SINGH M. (2004) Formulation and *in vitro* evaluation of transdermal patches of melatonin. *Drug Dev Ind Pharm* **30**: 205-212.

KAWATA, S., NAGASE, T., YAMASAKY, E., ISHIGURO, H. MATSUZAWA, Y. (1994) Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by prevastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br. J. Cancer* **69**, 1015-1020.

KEANE, T.E., PETROS, J.A., VELIMIROVICH, B., YUE, K.T. AND GRAHAM, S.D. (1994) Methoxypsoralen phototherapy of transitional cell carcinoma. *Urology* **44**, 842-846.

KERR J.F.R. AND HARMON B.V.(1991). Definition and incidence of apoptosis:An historical perspective. In: Apoptosis: The molecular Basis of Cell Death. *Curr Comm Cell & Mol Biol*, **3**:5-29, Tomei LD, Cope FO(eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbour,NY.

KOTO R, IMAMURA M, WATANABE C, OBAYASHI S, SHIRAIISHI M, SASAKI Y, AZUMA H (2006) Linalyl acetate as a major ingredient of lavender essential oil relaxes the rabbit vascular smooth muscle through dephosphorylation of myosin light chain. *J Cardiovasc Pharmacol*, **48**:850-6

KNOBLOCK K., PAULI A., IBERL B., WEIGAND H., WEIS N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essen oil Res.* **1**: 119-128.

KRISHNAIAH Y.S., RAJU V., SHIVA KUMAR M., RAMA B., RAGHUMURTHY V., RAMANA MURTHY K.V. (2008) Studies on optimizing in vitro transdermal permeation of ondansetron hydrochloride using nerodilol, carvone, and limonene as penetration enhancers. *Pharm Dev Technol*, **13**:177-85.

KVAMME, E., SCHOUSBOE, A., HERTZ, L., TORGNER, I.A. AND SVENNEBY, G. (1985) Developmental change of endogenous glutammate and gamma-glutamyl transferase in cultured cerebral cortical interneurons and cerebellar granule cells, and in mouse cerebral cortex and cerebellum in vivo. *Neurochem. Res.* **10**, 993-1008.

LEE, Y.M., WU, T.H., CHEN, S.F. AND CHUNG, J.C. (2003) Effect of 5-methoxypsoralen (5-MOP) on cell apoptosis and cell cycle in human hepatocellular carcinoma cell line. *Toxicol. in vitro* **17**, 279-87.

LEE B., KIM J., JUNG J., CHOI J.W., HAN E.S., LEE S.H., KO K.H., RYU J.H. (2005) Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Toxicol Lett.* **157**, 49-56.

LETIZIA C.S., COCCHIARA J., LALKO J., API A.M. (2003). Fragrance material review on linalyl acetate. *Food Chem Toxicol* **41**: 965-976.

LU XG, FENG BA, ZHAN LB, YU ZH.(2003) D-limonene induces apoptosis of gastric cancer cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi (Chin J Oncol)* **25**:325-327.

LU XG, ZHAN LB, FENG BA, QU MY, YU LH, XIE JH.(2004). Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol* **10**: 2140-2144.

MAJNO G, JORIS I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* **146**:3-15

MALTZMANN, T.H., HURT, L.M., ELSON, C.E., TANNER, M.A. AND GOULD, M.N. (1989) The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by d-limonene and orange oil. *Carcinogenesis* **10**, 781-783.

MANDALARI G., BENNETT R.N, BISIGNANO G., TROMBETTA D., SAIJA A., FAULDS C.B., GASSON M.J. & NARBAD A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *J. Appl. Microbiol.* **103**: 2056-2064.

MAUVIARD, F., PEVET, P. AND FORLOT, P. (1991) 5-Methoxypsoralen enhances plasma melatonin concentrations in the male rat : non-noradrenergic-mediated stimulation and lack of effect in pinealectomized animals. *J. Pineal Res.* **11** , 35-41.

MAUVIARD, F., RAYNAUD, F., GEOFFRIAU, M., CLAUSTRAT, B. AND PEVET, P. (1995) 5-Methoxypsoralen inhibits 6-hydroxylation of melatonin in the rat. *Biol. Signals* **4**, 32-41.

McNEELY, W. AND GOA, K.L. (1998). 5-Methoxypsoralen. A review of its effects in psoriasis and vitiligo. *Drugs* **56**, 667-690.

MENGEAUD V, ORTONNE JP.(1996) PUVA (5-methoxypsoralen plus UVA) enhances melanogenesis and modulates expression of melanogenic proteins in cultured melanocytes

J Invest Dermatol. **107**:57-62.

MENGEAUD, V. AND ORTONNE, J.P. (1994) Regulation of melanogenesis induced by 5-methoxypsoralen without ultraviolet light in murine melanoma cells. *Pigment Cell Res.* **7**, 245-254.

MOLLACE V, RAGUSA S, SACCO I, MUSCOLI C, SCULCO F, VISALLI V, PALMA E, MUSCOLI S, MONDELLO L, DUGO P, ROTIROTI D, ROMEO F (2008). The protective effect of bergamot oil extract on lecithine-like oxyLDL receptor-1 expression in balloon injury-related neointima formation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* **13**:120-9. Epub 2008 Apr 15

MONDELLO, L., STAGNO D'ALCONTRES, I., DEL DUCE, R. AND CRISPO, F. (1993) On the genuineness of Citrus essential oil. Part XL. The composition of the coumarins and psoralens of calabrian bergamot essential oil (*Citrus bergamia*, Risso). *Flavour and fragrance Journal* **8**, 17-24.

MONDELLO, L., VERZERA, A., PREVITI, P., CRISPO, F. AND DUGO, G. (1998) Multidimensional capillary GC-GC for the analysis of complex samples. Enantiomeric distribution of monoterpene hydrocarbons, monoterpene alcohols, and linalyl acetate of Bergamot oils. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4275-4282.

MORRONE L.A., ROMBOLA' L., PELLE C., CORASANITI M.T., ZAPPETTINI S., PAUDICE P., BONANNO G. & BAGETTA G. (2007). The essential oil of bergamot enhances the levels of amino acid neurotransmitters in the hippocampus of rat: Implication of monoterpene hydrocarbons. *Pharmacol. Res.* **55**: 255-262.

MOSMANN T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **65**:55-63

MOTOYOSHI K., TOYOSHIMA Y., SATO M., YOSHIMURA M. (1979). Comparative studies on the irritancy of oil san synthetic to the skin of rabbit, guinea pig, rat, miniature swine and man. *Cosmetics and Toiletries* **94**: 41-48.

MUNARRIZ E, BANO D, SAYAN AE, ROSSI M, MELINO G, NICOTERA P.(2005)
Calpain cleavage regulates the protein stability of p73.
Biochem Biophys Res Commun.; **333**(3):954-60

MUSAJO, L., RODIGHIERO, G. AND DALL'ACQUA, F. (1965) Evidences of a photoreaction of the photosensitizing furocoumarins with DNA and with pyrimidine nucleosides and nucleotides. *Experientia* **21**, 24-29.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP) (1990). Toxicology and Carcinogenesis Studies of d-Limonene (CAS No 5989-27-5) in F344/N Rats and B6C3F Mice (Gavage Studies) NIH Publication No 90-2802, NTP TR 347.

NOGUCHI M, YI H, ROSENBLATT HM, FILIPOVICH AH, ADELSTEIN S, MODI WS, MCBRIDE OW, LEONARD WJ.(2008) Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73: 147-157. 1993.
J Immunol. **181**(9):5817-27

NOVGORODOV S.A., GUDZ T.I. (1996) Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *J Bioenerg Biomembr* **28**:139-46.

ORIVE G., HERNANDEZ R., GASCON A., DOMINGUEZ-GIL A., PEDRAZ J. (2003). Drug delivery in biotechnology: present and future. *Current Opin Biotech* **14**: 659-664.

PARJA T AND DAS B. (2003). Involvement of YY1 and its correlation with c-myc in NDEA induced hepatocarcinogenesis, its prevention by d-limonene. *Mol Biol Rep* **30**: 41-46.

PARRISH, J.A., FITZPATRICK, T.B., TANENBAUM, L. AND PATHAK M.A. (1974) Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **291**, 1207-1211.

PATHAK, M.A. AND FITZPATRICK, T.B. (1992) The evolution of photochemistry with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photochem. Photobiol. B.* **14**, 3-22.

PATHAK, M.A., FITZPATRICK, T.B. AND MOSHER, D.B. (2003) Efficacia del metossipsoralene 8 o MOP-8, metossipsoralene 5 (bergaptene o MOP-5) e trimetilpsoralene 4,5,8 (TMP) nella ripigmentazione in pazienti con vitiligine vulgaris. In “BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive”. Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp.85-95.

PEANA A.T., D'AQUILA P.S., PANIN F., SERRA G., PIPPIA P. AND MORETTI M.D.L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytom* **9**: 721-726.

PEYRON, J. L. (2003) L'uso dell'essenza di bergamotto in profumeria oggi e nella storia. In “BERGAMOTTO 98-Stato dell'arte e prospettive”. Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp.31-44.

POLLACK A, CIANCIO G.(1990). Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. *Methods Cell Biol.* **33**:19-24.

POSADAS I., VELLECCO V., SANTOS P., PRIETO-LLORET J., CEÑA V. (2007) Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol* **150**:577-85.

PRASHAR A., LOCKE I.C. and EVANS C.S.(2004). Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif* **37**:221-229

RAVIZZA R, GARIBOLDI MB, MOLTENI R, MONTI E. (2008) Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep.* **20**:625-30

RE L, BAROCCI S, SONNINO S, MENCARELLI A, VIVANI C, PAOLUCCI G, SCARPANTONIO A, RINALDI L, MOSCA E.(2000) Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction *Pharmacol Res.* **42**:177-82.

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc) (1974a). Report on Human Maximization Studies. RIFM report number 1801. May 31.(RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA)

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc) (1974a). Report on Human Maximization Studies. RIFM report number 1801. August 19.(RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA)

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc) (1982a). Report on Human Maximization Studies. RIFM report number 1801. April 27.(RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA)

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc) (1982b). Report on Human Maximization Studies. RIFM report number 1801. April 30.(RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA)

RIFM (Research Institute for Fragrance Materials, Inc) (1982c). Report on Human Maximization Studies. RIFM report number 1801. September 14.(RIFM, Woodcliff Lake, NJ, USA)

ROLSETH V., DJURHUUS R., SVARDAL A.M. (2002) Additive toxicity of limonene and 50% oxygen and the role of glutathione in detoxification in human lung cells. *Toxicology.* **170**:75-88

ROMANO L., BATTAGLIA F., MASUCCI L., SANGUINETTI M.,POSTERARO B., PLOTTI G., ZANETTI S. & FADDA G. (2005). *In vitro* activity of bergamot natural essence and furocoumarin-free and distilled extracts, and their associations with boric acid, against clinical yeast isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 110-114.

RUSSELL SM, TAYEBI N, NAKAJIMA H, RIEDY MC, ROBERTS JL, AMAN MJ, MIGONE TS, NOGUCHI M, MARKERT ML, BUCKLEY RH, O'SHEA JJ, LEONARD WJ.(1995) Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development *Science*. **270**(5237):797-800

SAMAILA D., TOY B., WANG R., ELEGBEDE A. (2004) Monoterpenes enhanced the sensitivity of head and neck cancer cells to radiations treatment *in vitro*. *Anticancer Res* **24**: 3089-3095.

SCHAFER,W.R. AND RINE, J. (1992) Protein prenylation: genes, enzymes, targets and functions. *Ann. Rev. Genetics* **30**, 209-237.

SIKKEMA J., DE BONT J.A.M., POOLMAN B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Bio Chem* **269**: 8022-8028.

SILVA BRUM L. F., ELISABETSKY E. & SOUZA D. (2001a). Effects of linalool on [3H] MK801 and [3H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytother. Res.* **15**: 422-425.

SILVA BRUM L. F., EMANUELLI T., SOUZA D. & ELISABETSY E. (2001b). Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. *Neurochem. Res.* **26**: 191-194.

SOUETRE, E., SALVATI, E., BELUGOU, J.L. de GALEANI, B., KREBS, B., ORTONNE, J.P. AND DAR COURT, G. (1987) 5-Methoxypsoralen increases the plasma melatonin levels in humans. *J. Invest. Dermatol.* **89**, 152-155.

SOUETRE, E., SALVATI, E., BELUGOU, J.L., ROBERT, P., BRUNET, G. AND DAR COURT, G. (1988) Antidepressant effect of 5-methoxypsoralen: a preliminary report. *Psychopharmacol.* **95**, 430-431.

SPINELLI, R. (2003) Il bergamotto in gastronomia. In “ BERGAMOTTO 98-Stato dell’arte e prospettive”. Atti del Congresso Internazionale 30 novembre-2 dicembre 1998, Reggio Calabria, Italia. Laruffa Editore srl, Reggio Calabria, 2003; pp. 233-238.

SRIVASTAVA S.K., JHA A., AGARWAL S.K., MUKHERJEE R., & BURMAN A.C. (2007). Synthesis and structure-activity relationships of potent antitumor active quinoline and naphthyridine derivatives. *Anticancer Agents Med Chem.* **7**: 685-709.

STATTI, G. A., CONFORTI, F., SACCHETTI, G., MUZZOLI, M., AGRIMONTI, C. AND MENICHINI, F. (2004) Chemical and biological diversity of bergamot (*Citrus bergamia*) in relation to environmental factors. *Fitoterapia* **75**, 212-216.

STERN RS; PUVA FOLLOW UP STUDY.(2001) The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol.* **44**:755-61.

SRIVASTAVA S.K., JHA A., AGARWAL S.K., MUKHERJEE R., & BURMAN A.C. (2007). Synthesis and structure-activity relationships of potent antitumor active quinoline and naphthyridine derivatives. *Anticancer Agents Med Chem.* **7**: 685-709.

SWEENEY T.M. AND DOWNING D.T. (1970) The role of the lipids in the epidermal barrier to water diffusion. *J Invest Dermatol* **55**:135-140.

TAKAYAMA K., KIKUCHI K., OBATA T., OKABE H., MACHIDA Y., NAGAI T. (1991) Terpenes as percutaneous absorption promoters S.T.P. *Pharm Sci.* **1**:83-88.

TANEW, A., ORTEL, B., RAPPERSBERG, K. AND HONIGSMANN, H. (1988) 5-Methoxypsoralen (bergapten) for photochemotherapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **18**, 333-338.

TOKURA, Y., YAGI, J., EDELSON, R.L. AND GASPARRO, F.P. (1991) Inhibitory effect of 8-methoxypsoralen plus ultraviolet-A on interleukin-1 production by murine keratinocytes. *Photochem. Photobiol.* **53**, 517-523.

TREFFEL, P., HUMBERT, P., MAKKI, B., FAIRRE, B. AND AGACHE, P. (1991) Use of a surface recovery technique to evaluate percutaneous absorption of 5-methoxypsoralen in humans. *Arch. Dermatol. Res.* **283**, 487-489.

ULTE A., BENNIK M.H., MOEZELAR R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **68**; 1561-1568.

VADDI H.K., HO P.C. & CHAN S.Y. (2002). Terpenes in propylene glycol as skin-penetration enhancers: permeation and partition of haloperidol, Fourier transform infrared spectroscopy, and differential scanning calorimetry. *J. Pharm. Sci.* **91**: 1639-1651.

VERZERA, A., LACONICA, G., MONDELLO, L., TROZZI, A. AND DUGO, G. (1996) The composition of bergamot oil. *Perfum Flav.* **21**, 19-35.

VERZERA, A., TROZZI, A., GAZEA, F., RICCIARELLO, G. AND COTRONEO, A. (2003) Effects of rootstock on the composition of bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 206-210.

VIGNY, P., GABORIAU, F., VOITURIEZ, L. AND CADET, J. (1985) Chemical structure of psoralen nucleic acid photoadducts. *Biochimie* **67**, 317-325.

VIGUSHIN, D.M., POON, G.K., BODDY, A., ENGLISH, J., HALBERT, G.W., PAGONIS, C., JARMAN, M. AND COOMBES, R.C. (1998) Phase I and pharmacokinetic of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **42**, 111-117.

VOGLER M, DINSDALE D, SUN XM, YOUNG KW, BUTTERWORTH M, NICOTERA P, DYER MJ, COHEN GM. A novel paradigm for rapid ABT-737-induced apoptosis involving outer mitochondrial membrane rupture in primary leukemia and lymphoma cells.(2008) *Cell Death Differ.* **15**(5):820-30

WALKER P.R., SMITH C., YONDALE T., LEBLANC J., WHITFIELD JF., SIKORSKA M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* **52**:1078-1085.

WILLIAMS A. AND BARRY B. (1991). Terpenes and lipid lipid –protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. *Pharm Res* **8**: 17-24.

YANG YP, KUO HS, TSAI HD, PENG YC, LIN YL. (2005) The p53-dependent apoptotic pathway of breast cancer cells (BC-M1) induced by the bis-type bioreductive compound aziridinylnaphthoquinone *Breast Cancer Res.* **7**:R19-27

YURI T., DANBARA N., TSUJITA-KJUTOKU M., KIYOZUKA Y., SENZAKI H., TSUBURA A. (2004) Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Breast Cancer Res Treat* **84**: 251-260.

ZHAO K. AND SINGH J.(1998) Mechanisms of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes eugenol, D-limonene and menthone. *J Control Release* **55**:253-260.

Produzione Scientifica

Comunicazioni a congressi

NAVARRA, M., MAIUOLO, J., RUSSO, R., MAIDA S., ROTIROTI, D., BAGETTA, G. AND CORASANITI, M.T. “Neuroprotection by bergamot essential oil in vitro: implication of monoterpene hydrocarbons”. VIII workshop on apoptosis in biology and medicine: plasticity in pain and death. 25–26 Maggio 2005 Parghelia (VV).

NAVARRA, M., MAIUOLO, J., RUSSO, R., MAIDA, S., ROTIROTI, D., BAGETTA, G. AND CORASANITI, M.T (2005). “Neuroprotection by bergamot essential oil in vitro: implication of monoterpene hydrocarbons”. XXXII Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Napoli, 1-4 Giugno.

MAIUOLO, J., MAIDA, S., NAVARRA, M., BAGETTA, G. AND CORASANITI, M.T. (2006). “Mechanism underlying neuroprotection afforded by bergamot essential oil (BEO) against NMDA-induced cell death in vitro”. IX workshop on apoptosis in biology and medicine: neuroinflammation in neuronal death and repair. 13-16 Settembre Parghelia (VV) Abstract book pp 28-29.

MAIDA S., FRATTO V., NAVARRA M., BAGETTA G. AND CORASANITI M.T. (2007) Evidence to implicate Phospho-Akt (P-AKT) in the mechanism underlying neuroprotection afforded by bergamot essential oil against excitotoxicity in vitro. XXXIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Cagliari 6-9 Giugno 2007.

MAIDA S., CIOCIARO A., SAKURADA S., SAKURADA T., ROTIROTI D., BAGETTA G., CORASANITI M.T. (2008) Evaluation of cytotoxicity of bergamot essential oil and of its major constituents in human neuroblastoma cell cultures: Components of phytocomplex synergize to cause cell death. XI Workshop on apoptosis in biology and medicine: 12-14 Settembre Educational Building Tohoku Pharmaceutical University Sendai, Japan P19 Abstract book.

Pubblicazioni

CORASANITI M.T., MAIUOLO J., MAIDA S., FRATTO V., NAVARRA M., RUSSO R., AMANTEA D., MORRONE L.A., and BAGETTA G. (2007). Cell signalling pathways in the mechanism of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death *in vitro*. *British Journal of Pharmacology* **151** (4), 518-529.

DE BARTOLO L., MORELLI S., GIORNO L., CAMPANA C., RENDE M., SALERNO S., MAIDA S., DRIOLI E. (2006) Polyethersulfone membrane biohybrid system using pig hepatocytes: Effect of Diclofenac on cell biotransformation and synthetic functions. *Journal of Membrane Science* **278** , 133-143