



Università della Calabria

Dottorato di ricerca in

“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare”

XXIII Ciclo

**Profilo tossicologico dell’Olio Essenziale di Bergamotto
(*Citrus Bergamia, Risso*) *in vitro* e caratterizzazione dei
meccanismi coinvolti.**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14 Farmacologia

Coordinatore

Chiar.mo Prof.
Giacinto Bagetta

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa
Maria Tiziana Corasaniti

Dottoranda

Dott.ssa Antonella Ciociaro

Anno Accademico 2010/2011

Indice

Sommario.....	4
1. Introduzione.....	7
1.1 L'olio essenziale di Bergamotto.....	7
1.2 Effetti farmacologici del BEO in modelli sperimentali animali.....	11
1.2.1 Effetti farmacologici dei principali costituenti del BEO.....	19
1.3 Approcci terapeutici per la cura del cancro.....	23
1.4 Meccanismi di resistenza ai farmaci antineoplastici.....	34
1.4.1 Coinvolgimento della via PI3K/Akt nella tumorigenesi e chemioresistenza.....	38
2. Scopo della tesi.....	42
3. Materiali e metodi.....	44
3.1 Reagenti.....	44
3.2 Colture cellulari e trattamenti.....	45
3.3 Studi di citotossicità.....	47
3.3.1 Analisi citofluorimetrica.....	47
3.3.1.1 Test di vitalità FDA/PI.....	50
3.3.1.2 Analisi della granulosità (SSC) e delle dimensioni cellulari (FSC).....	52
3.3.1.3 Analisi dell'ipodiploidia cellulare (sub-G _{0/1}).....	53
3.3.2 Test di esclusione del <i>Trypan Blue</i>	54
3.3.3 Saggio MTT.....	55
3.4 Valutazione del potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$) e della morfologia dei mitocondri...56	
3.5 Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).....	58
3.6 Analisi in microscopia a fluorescenza delle proteine del citoscheletro.....	60
3.7 Preparazione dei lisati cellulari.....	61
3.8 Analisi Western-blot.....	62
3.9 Analisi statistica dei dati.....	63
4. Risultati.....	64
4.1 Riduzione della vitalità cellulare e alterazioni delle caratteristiche morfologiche indotte dal BEO in colture di neuroblastoma umano, SH-SY5Y.....	64

4.2 Il trattamento con BEO induce alterazioni della morfologia e del potenziale mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) in colture di neuroblastoma umano, SH-SY5Y.....	78
4.3 Le alterazioni mitocondriali e la morte cellulare indotte dal BEO in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y, non sono associate allo stress ossidativo.....	81
4.4 L'esposizione di colture SH-SY5Y a concentrazioni citotossiche di BEO (0,02-0,03%) induce attivazione di proteasi associate alla morte cellulare.....	83
4.5 Il BEO determina la riduzione dei livelli della chinasi Akt, in cellule SH-SY5Y.....	92
4.6 La caduta del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) precede la morte cellulare e le alterazioni delle caratteristiche morfologiche indotte dal BEO in colture di leucemia mieloide cronica, K-562.....	96
4.7 Effetti indotti dal BEO in colture di fibroblasti di cute umana, Hs 605.Sk.....	102
5. Discussione.....	106
6. Parte speciale.....	125
7. Bibliografia.....	136

Sommario

L'utilizzo di prodotti contenenti estratti vegetali, compresi gli oli essenziali, è ampiamente diffuso nell'industria cosmetica, alimentare e farmaceutica; tuttavia, i meccanismi alla base dei loro effetti risultano spesso non caratterizzati.

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, di leucemia mieloida cronica, K-562, ed in cellule con fenotipo normale, in particolare, colture di fibroblasti di cute umana, Hs 605.Sk. Lo studio è stato rivolto alla caratterizzazione della citotossicità indotta dal BEO e all'identificazione dei meccanismi implicati.

I risultati ottenuti dimostrano che l'olio essenziale di bergamotto (BEO) riduce la vitalità cellulare in colture SH-SY5Y e K-562 quando impiegato a concentrazioni superiori allo 0,01%. Tale effetto risulta concentrazione- e tempo-dipendente. In tali linee cellulari, a seguito del trattamento con il BEO, alcune cellule presentano un fenotipo necrotico, altre le caratteristiche dell'apoptosi.

La morte cellulare non si associa ad aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS); compatibilmente con un meccanismo di morte ROS-indipendente, l'antiossidante N-acetil-cisteina non previene gli effetti sulla vitalità cellulare indotti dal BEO. In tali condizioni sperimentali, la morte cellulare è preceduta da un rapido collasso del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$). Nelle cellule SH-SY5Y, oltre ad un'alterazione della morfologia mitocondriale, il BEO induce una riorganizzazione delle proteine del citoscheletro, perdita dell'integrità di membrana e riduzione del volume cellulare. Il danno cellula-

re interessa anche il nucleo ed una percentuale significativa di cellule presenta ipodiploidia.

L'esposizione delle cellule SH-SY5Y a concentrazioni citotossiche di BEO induce attivazione della caspasi 3 e clivaggio di PARP; in particolare, il pattern di quest'ultimo, non è compatibile con la sola attivazione della caspasi 3, suggerendo l'attivazione di altre famiglie di proteasi. Tuttavia, l'inibizione farmacologica delle calpaine e delle catepsine mediante pretrattamento con MDL 28170 ed E-64d, rispettivamente, non previene la morte delle cellule SH-SY5Y indotta dal BEO, mentre una parziale protezione è conferita dall'inibitore delle caspasi, Z-VAD-fmk, che riduce in maniera significativa la percentuale di cellule apoptotiche lasciando inalterata la percentuale di cellule che vanno incontro a morte per necrosi.

Concentrazioni citotossiche di BEO interferiscono anche con i meccanismi di sopravvivenza cellulare come suggerito dalla riduzione della fosforilazione della chinasi Akt. Inoltre, l'aumento dell'attività proteolitica indotta dal BEO determina degradazione di Akt e riduzione dei suoi livelli intracellulari.

L'esposizione al BEO di colture di fibroblasti di cute umana, Hs 605.Sk, documenta un profilo tossicologico differente rispetto a quello osservato in colture SH-SY5Y e K-562. La morte cellulare, valutata dopo 24 ore di esposizione al fitocomplesso, presenta prevalentemente le caratteristiche della necrosi; inoltre, essa si osserva solo con concentrazioni superiori allo 0,02%, indicando una minore sensibilità dei fibroblasti agli effetti citotossici del BEO rispetto alle cellule tumorali.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che il BEO riduce la vitalità di cellule in proliferazione attivando diverse vie di morte. La comprensione dei meccanismi attraverso i

quali i diversi costituenti del BEO interagiscono per indurre necrosi ed apoptosi potrebbe essere utilmente sfruttata in chemioterapia antitumorale dove spesso l'inefficacia dei trattamenti farmacologici è riconducibile ai difetti dell'apoptosi presenti nelle cellulari tumorali.

Inoltre, considerando il diffuso impiego del BEO in aromaterapia e la carenza di studi tossicologici, i risultati ottenuti nel presente studio suggeriscono che i prodotti a base di tale olio essenziale debbano essere utilizzati con cautela e, comunque, a diluizioni appropriate, soprattutto quando impiegati mediante applicazione diretta sulla cute e per periodi prolungati.

1. Introduzione

1.1 L'olio essenziale di Bergamotto.

Il bergamotto (*Citrus bergamia*, *Risso*) è un agrume appartenente alla famiglia delle *Rutaceae*, genere *Citrus*, che cresce prevalentemente in una limitata area della costa Calabrese (Fig. 1.1).

La specie coltivata in Calabria è la *Vulgaris* distinta in tre cultivar sulla base delle caratteristiche morfologiche sia della pianta che del frutto ovvero: *Femminello*, *Castagnaro* e *Fantastico*.

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



Fig. 1.1) Citrus bergamia

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 condizioni microclimatiche favorevoli al suo sviluppo.

La crescita della pianta e la resa in olio essenziale sono favorite in terreni argilloso-calcarei (con un pH compreso tra 6,5 e 7,5), meglio se ubicati in zone collinari e ben soleggiate. Le temperature ottimali per la crescita, favorita da frequenti irrigazioni, sono comprese tra i 13-30°C.

Dalle parti più esterne del frutto (esocarpo ed epicarpo) ed in parte dal mesocarpo viene ottenuto l'olio essenziale di bergamotto. Il processo estrattivo viene effettuato per spremitura a freddo, in accordo con quanto previsto dalla Farmacopea Ufficiale Italiana (1991).

L'olio essenziale si presenta come un liquido limpido di colore giallo-verde, costituito da una frazione volatile (circa il 93-96%) ed un residuo non volatile (4-7%).

Attraverso l'analisi quali-quantitativa dell'olio è emerso che la frazione volatile è composta da idrocarburi monoterpenici e sesquiterpenici (limonene, α - e β -pinene, β -mircene, γ -terpinene, terpinolene, sabinene, β -bisabolene) e derivati ossigenati (linalolo, nerale, geraniale, acetato di linalile, acetato di nerile, acetato di geranile) mentre la frazione non volatile contiene cere, flavoni polimetossilati, cumarine e psoraleni come il bergaptene (5-metossipsoralene) e la bergamottina (5-geranilossipsoralene) (Dugo et al., 2000; Mondello et al., 1993).

A causa delle richieste di mercato imposte dall'industria cosmetica, gli oli essenziali, vengono privati di costituenti come il bergaptene e i monoterpeni idrocarburi; il primo è responsabile delle reazioni di fototossicità dell'olio (Zaynoun et al., 1977), mentre i monoterpeni idrocarburi, oltre che risultare irritanti per la cute (Karlberg et al., 1992), sono mole-

cole particolarmente instabili in quanto vanno incontro a processi di ossidazione (Karlberg et al., 1992; Neuenschwander et al., 2010) e possono alterare le proprietà organolettiche degli oli essenziali.

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 (Verzera et al., 2003).

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

Accanto a queste considerazioni, l'analisi che probabilmente più delle altre fornisce informazioni valide per la determinazione della qualità e della genuinità dell'olio, 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.

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).

L'analisi della distribuzione enantiomerica dei costituenti del BEO, inoltre, permette 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).

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 debbano essere obbligatoriamente consegnate al Consorzio di Reggio Calabria (art. 2; art. 3) e che l'essenza venga 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.

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).

1.2 Effetti farmacologici del BEO in modelli sperimentali animali

Negli ultimi anni, sono stati condotti diversi studi sperimentali che hanno permesso di ampliare le conoscenze relative alle proprietà terapeutiche dell'olio essenziale di bergamotto, già impiegato da moltissimi anni in medicina popolare come antisettico ed antielmintico.

Molti componenti degli oli essenziali sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) ed entrare nel sistema nervoso centrale (SNC) dopo inalazione, applicazione transdermica, somministrazione intraperitoneale (i.p.), sottocutanea (s.c.) o somministrazione orale. Per queste ragioni gli oli essenziali, come quello di bergamotto, trovano applicazione in aromaterapia, una medicina complementare molto diffusa nei paesi industrializzati. Benché non siano del tutto comprese le basi razionali degli effetti esercitati, l'aromaterapia è ritenuta un valido approccio terapeutico per migliorare l'umore, lenire l'ansia da stress, la depressione ed il dolore cronico (Brooker et al., 1997; Perry & Perry, 2006).

Numerosi dati sono stati raccolti a supporto degli effetti esercitati dal BEO a livello del SNC di ratto. In particolare, attraverso tecniche di elettroencefalografia (EEG) sviluppate per monitorare aree discrete del SNC e correlare cambiamenti comportamentali a variazioni dello spettro EEG (vedi Bagetta et al., 1988), è stato riscontrato che la somministrazione sistemica di dosi crescenti (100, 250, 500 $\mu\text{l}/\text{Kg}$, i.p.) di BEO causa una sequenza di effetti sedativi e stimolanti, correlati alla dose. Un aumento della locomozione e dell'atteggiamento esplorativo, correlato ad un aumento delle bande ad alta frequenza dello spettro EEG, si osserva in seguito alla somministrazione di 250 $\mu\text{l}/\text{Kg}$, mentre dosi più basse sono associate ad una protratta immobilità e all'aumento delle bande a bassa frequenza (Rombolà et al., 2009). Questi effetti sono attribuibili a componenti presenti nella

frazione volatile dell'olio dal momento che la frazione priva di bergaptene determina effetti sovrapponibili a quelli precedentemente descritti.

Ulteriori dati a supporto degli effetti esercitati dal BEO a livello del SNC derivano dalle osservazioni fatte da Saiyudthong e Marsden (2011) che descrivono l'effetto ansiolitico indotto dal fitocomplesso, nel ratto. In particolare, è stato dimostrato che l'inalazione di BEO (1-5%) riduce le risposte comportamentali associate allo stress con un effetto sovrapponibile a quello indotto dalla somministrazione di diazepam (1 mg/kg, i.p.). Anche le risposte ormonali indotte dallo stress vengono modificate dall'inalazione di BEO (2.5%), come dimostrato dalla significativa riduzione dei livelli ematici di corticosterone (Saiyudthong & Marsden, 2011).

Recenti evidenze sperimentali ottenute sia *in vitro* che *in vivo*, nel ratto, hanno dimostrato la capacità del BEO di modulare la trasmissione sinaptica. L'olio essenziale somministrato per via sistemica o microinfuso nell'ippocampo, modifica le concentrazioni sinaptiche di neurotrasmettitori eccitatori e inibitori (Morrone et al., 2007).

In particolare, attraverso tecniche di microdialisi cerebrale, è stato riscontrato che la somministrazione sistemica di BEO aumenta i livelli extracellulari di glicina, aspartato e taurina nell'ippocampo con un meccanismo calcio (Ca^{2+})-dipendente. In esperimenti condotti utilizzando un fluido cerebrospinale artificiale privo di Ca^{2+} , infatti, non si osserva tale rilascio, suggerendo che il fitocomplesso possa influenzare i meccanismi esocitotici di rilascio dei neurotrasmettitori (Morrone et al., 2007).

Negli stessi studi è stato dimostrato che la somministrazione focale dell'olio diluito 1:1, microinfuso attraverso sonde per microdialisi impiantate a livello ippocampale, incrementa significativamente i livelli extracellulari di glutammato (GLU) e determina un trend

all'aumento dei livelli extracellulari di acido γ -ammino-butirrico (GABA), con un meccanismo Ca^{2+} -dipendente, come osservato dopo somministrazione sistemica.

Diversamente, la microinfusione di BEO non diluito determina un aumento dei livelli extracellulari di tutti gli aminoacidi studiati, con un meccanismo Ca^{2+} -indipendente.

I meccanismi implicati nel rilascio di neurotrasmettitori indotto dal BEO sono stati indagati *in vitro*, impiegando preparazioni di sinaptosomi ottenuti dall'ippocampo di ratto.

Il sistema sperimentale adottato, lavorando in superfusione, assicura che ogni composto rilasciato venga rimosso e che non possa interagire con eventuali bersagli presinaptici presenti sulla membrana esterna dei sinaptosomi (trasportatori o recettori presinaptici) (Raiteri et al., 1984). I suddetti bersagli non vengono occupati da ligandi, a meno che appropriati ligandi non siano aggiunti al mezzo di superfusione.

In queste condizioni sperimentali è stato seguito il rilascio mediato dal BEO di glutammato endogeno e dell'analogo, non metabolizzabile, $^3\text{H-D}$ -aspartato. I risultati ottenuti hanno dimostrato che il BEO determina un rilascio concentrazione-dipendente dei due aminoacidi. Il rilascio di $^3\text{H-D}$ -aspartato indotto da basse diluizioni (1:3000) di BEO è Ca^{2+} -indipendente e sensibile all'azione del DL-TBOA, un inibitore selettivo dei trasportatori degli aminoacidi eccitatori (Shimamoto et al., 1998). Ciò suggerisce come i trasportatori lavorino con un meccanismo inverso dopo l'esposizione al fitocomplesso per mediare il rilascio di glutammato.

Impiegando alte diluizioni di BEO (1:10000), al contrario, solo il 50% del rilascio di $^3\text{H-D}$ -aspartato è prevenuto dal DL-TBOA mentre il rilascio della restante parte è sensibile all'omissione del Ca^{2+} , in linea con l'ipotesi che basse concentrazioni del fitocomplesso

determinano un rilascio esocitotico di glutammato nell'ippocampo di ratto (Morrone et al., 2007).

Le evidenze sperimentali ottenute *in vivo* ed *in vitro* (Morrone et al., 2007) permettono di trarre le stesse conclusioni circa il meccanismo di rilascio di aminoacidi eccitatori indotto dal BEO che risulta di tipo esocitotico per le basse concentrazioni del fitocomplesso, possibilmente dovuto alla stimolazione di recettori presinaptici presenti sulle terminazioni nervose, mentre alte concentrazioni di BEO determinano un rilascio carrier-mediato ed indipendente dall'esocitosi (Attwell et al., 1993; Levi & Raiteri, 1993).

Sebbene il/i costituenti responsabili degli effetti osservati non siano stati ancora individuati, evidenze sperimentali ottenute mediante l'impiego di specifiche frazioni dell'essenza naturale suggeriscono che questo o questi debbano essere ricercati fra i terpeni presenti nella frazione volatile dell'olio. Infatti, mentre la frazione deprivata di bergaptene produce effetti sovrapponibili a quelli indotti dal fitocomplesso, l'utilizzo della frazione deterpenata non modifica il rilascio di aminoacidi eccitatori (Morrone et al., 2007).

Altri dati interessanti circa le proprietà terapeutiche del BEO derivano dall'impiego del fitocomplesso in un modello di ischemia cerebrale focale sperimentalmente indotta nel ratto (Amantea et al., 2009). L'ischemia cerebrale determina un aumento dei livelli extracellulari di neurotrasmettitori eccitatori in conseguenza di un aumentato rilascio dalle terminazioni nervose, della riduzione dell'attività dei trasportatori deputati al recupero degli stessi dallo spazio sinaptico e, successivamente, dell'inversione della direzione del trasporto da essi operato (Rossi et al., 2000). Inoltre, l'aumento dei radicali liberi (specie reattive dell'ossigeno, ROS) i quali ossidano i trasportatori del glutammato, riducendone l'attività, contribuisce alla diminuita efficienza dei meccanismi di ricaptazione del neurotrasmettore

nelle fasi successive ad un evento ischemico (Trotti et al., 1998). La concentrazione sinaptica di tali aminoacidi raggiunge, quindi, livelli patologici che contribuiscono al danno neuronale causato dall'insulto ischemico.

E' stato recentemente documentato che la somministrazione intraperitoneale di BEO riduce, in maniera dose-dipendente, il volume di infarto conseguente ad ischemia cerebrale sperimentalmente indotta nel ratto mediante occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo) (Amantea et al., 2009). Nelle stesse condizioni sperimentali, l'impiego di tecniche di microdialisi ha documentato che il BEO previene l'aumento dei livelli extracellulari degli aminoacidi a carattere eccitatorio, glutammato ed aspartato, che si osserva nella penombra ischemica subito dopo l'occlusione dell'arteria cerebrale media (MCA). Tali effetti sono osservati a dosi di BEO (0.5 ml/kg i.p.) che, in condizioni basali, non modificano i livelli extracellulari di neurotrasmettitori nella corteccia fronto-parietale (Amantea et al., 2005). Ulteriori studi sono necessari al fine di stabilire se tale effetto sia legato ad un'azione scavenger e antiossidante del BEO (Corasaniti et al., 2007) che previene il danno ossidativo dei trasportatori del glutammato o ad una normalizzazione dell'attività e/o della direzione del trasporto degli stessi (Morrone et al., 2007).

Nello stesso modello sperimentale, oltre a prevenire l'aumento dei livelli extracellulari di glutammato ed aspartato che si verifica nella penombra ischemica subito dopo l'MCAo, il BEO aumenta la fosforilazione della chinasi Akt e di uno dei suoi principali substrati, GSK-3 β , che risulta altrimenti ridotta nella corteccia cerebrale a distanza di 24 ore dall'insulto ischemico. Questo effetto è specifico, dal momento che il pretrattamento con BEO non altera i livelli di fosforilazione della fosfatasi PTEN, tipicamente ridotta in corso di ischemia (Amantea et al., 2009).

La fosforilazione ed attivazione della chinasi Akt è un fenomeno funzionale alla sopravvivenza cellulare. Akt fosforila ed inattiva proteine coinvolte nella morte cellulare tra cui Bad, caspasi-9 e GSK-3 β , prevenendo, quindi, il rilascio di citocromo c dai mitocondri e l'attivazione della caspasi 3 (Brazil & Hammings, 2001; Cardone et al., 1998; Grimes & Jope 2001). La capacità del BEO di aumentare la fosforilazione e, quindi, l'attività di Akt, è di particolare interesse dal momento che la neuroprotezione nei confronti del danno ischemico cerebrale conferita da fattori neurotrofici ed ormoni (IGF-1, estrogeni, eritropoietina) è stata correlata all'aumento dei livelli di fosforilazione della chinasi Akt (Amantea et al., 2005; Fukunaga & Kawano, 2003; Zhao et al., 2005).

Gli esperimenti condotti *in vitro* corroborano le evidenze ottenute *in vivo* circa l'azione neuroprotettiva del BEO. E' stato, infatti, dimostrato che, in colture cellulari di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, esposte all'eccitotossina N-metil-D-aspartato (NMDA), il pre-trattamento con BEO (0,005-0,01%) protegge dalla morte cellulare attraverso un meccanismo che è dipendente dalla fosforilazione ed attivazione della chinasi Akt (Corasaniti et al., 2007). L'effetto neuroprotettivo del BEO è, infatti, revertito dall'LY294002, un inibitore della fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3K) (Vlahos et al., 1994).

Sulla stessa linea cellulare l'effetto del BEO sulla chinasi Akt è stato confermato in condizioni di deprivazione da siero. I livelli di fosforilazione della chinasi, ridotti dall'assenza di fattori trofici nel mezzo, sono ripristinati dal trattamento con il fitocomplesso che non altera, invece, il grado di fosforilazione nella popolazione controllo (Corasaniti et al., 2007).

L'aromaterapia viene impiegata per lenire i dolori neuromuscolari (Ferrel-Torry & Glick, 1993) oltre che nel migliorare l'umore dei pazienti affetti da cancro (Wilkinson et al., 2007). Studi recenti documentano che il BEO esplica effetti antinocicettivi in modelli ani-

mali di dolore (Bagetta et al., 2010; Sakurada et al., 2009, 2011), fornendo una base razionale al diffuso impiego dell'olio essenziale in aromaterapia.

La somministrazione sottocutanea di capsaicina, principio attivo contenuto nelle bacche di piante del genere *Capsicum*, induce nei topini risposte nocicettive simili a quelle ottenute dalla somministrazione intraplantare di formalina (Sakurada et al., 1992). Lo stimolo nocicettivo prodotto dall'iniezione intraplantare di capsaicina, che induce l'animale a leccare e mordicchiare la parte interessata, è immediato e di breve durata (5 min) e può essere ridotto dall'applicazione locale o dalla somministrazione sistemica di morfina (Sakurada et al., 1994).

È noto che la capsaicina agisce stimolando in maniera pressochè esclusiva le fibre afferenti di tipo C attraverso l'interazione con i recettori vanilloidi di tipo I (TRPV-1) (Di Marzo et al., 2002; Szallasi et al., 2007). In questo modello sperimentale di dolore, l'iniezione intraplantare, ipsilaterale, di BEO (5, 10, 20 µg) produce un significativo effetto antinocicettivo; al contrario, l'iniezione controlaterale al sito di iniezione della capsaicina, non produce alcun effetto antinocicettivo, escludendo un'azione sistemica del BEO, a favore dell'effetto analgesico locale.

Altri oli essenziali, come quelli estratti da *Salvia sclarea*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula hybrida reydovan* e *Lavandula angustifolia*, riproducono gli effetti antinocicettivi del BEO nel test della capsaicina; l'azione è probabilmente ascrivibile ad uno o più componenti di natura monoterpénica essendo tutte le essenze impiegate particolarmente ricche di linalolo e/o acetato di linalile (Sakurada et al., 2009). Successivamente, infatti, è stato dimostrato che il linalolo (2.5, 5, 10 µg) e l'acetato di linalile (10, 20 µg), come il BEO (10, 20 µg),

riducono in maniera statisticamente significativa la risposta nocicettiva indotta dalla somministrazione intraplantare di capsaicina nei topini (Sakurada et al., 2011).

L'effetto antinocicettivo rilevato con il test della capsaicina può essere mediato dall'interazione dei costituenti del BEO di natura terpenica con i recettori oppioidi periferici. Ad avvalorare questa ipotesi, l'evidenza che l'effetto antinocicettivo del linalolo, somministrato per via sottocutanea, è ridotto dal pretrattamento con l'antagonista dei recettori oppioidi, naloxone (Peana et al., 2004).

Il coinvolgimento del sistema oppioide nell'azione analgesica del BEO è stato dimostrato con la somministrazione di naloxone (2.0-8.0 mg/kg, i.p.) 10 min prima dell'iniezione intraplantare di BEO o linalolo e 20 min prima dell'iniezione intraplantare, ipsilaterale, della capsaicina. In tali esperimenti, il naloxone ha revertito l'effetto analgesico del BEO e del linalolo (Sakurada et al., 2011). Inoltre, è stato documentato che dosi inattive di BEO (5 µg i.p.) o linalolo (1,25 µg i.p.) potenziano l'effetto antinocicettivo indotto dalla morfina (1 mg/Kg, i.p. o 100 pmol per via intratecale) e che tale effetto è revertito dal (Sakurada et al., 2011).

È noto che il dolore neuropatico è resistente al trattamento con gli oppiacei; pertanto, né la somministrazione sistemica, né quella intratecale di oppiacei riducono la sintomatologia in modelli sperimentali di dolore neuropatico nel ratto (Mao et al., 1995; Ossipov et al., 1995). Recentemente, è stato documentato che il BEO (1 ml/Kg s.c.) (Bagetta et al., 2010) ed il linalolo (100 mg/Kg s.c.) (Berliocchi et al., 2009) attenuano significativamente l'allodinia meccanica nel modello sperimentale di dolore neuropatico indotto dalla legatura del nervo spinale nel topo. Tale effetto è da attribuire, solo in parte, all'azione antiinfiammatoria del linalolo (Berliocchi et al., 2009).

Altre evidenze sperimentali sulle proprietà dell'olio essenziale di bergamotto derivano dal lavoro condotto da Mollace e collaboratori che hanno evidenziato l'azione protettiva esplicata dalla frazione non-volatile del BEO (BEO-NVF), in un modello di angioplastica sperimentale nel ratto (Mollace et al., 2008). In tale modello, il danno meccanico a carico dell'endotelio vasale causa proliferazione delle cellule della muscolatura liscia vasale e formazione di un tessuto neointimale; inoltre, questo processo è associato a stress ossidativo e ad aumento dell'espressione del recettore LOX-1 per le lipoproteine a bassa densità (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.

1.2.1 Effetti farmacologici dei principali costituenti del BEO

Gran parte della letteratura relativa agli oli essenziali ed ai loro costituenti ne evidenzia le proprietà antisettiche e antimicrobiche, gli effetti benefici nella prevenzione delle patologie cardiovascolari e l'attività antiproliferativa che potrebbe essere sfruttata nella cura dei tumori (Chen et al., 2011; Edris, 2007).

I costituenti quantitativamente più rilevanti nell'olio essenziale di bergamotto sono i composti di natura terpenica quali il linalolo, l'acetato di linalile e il limonene, presenti nella frazione volatile dell'olio e il bergaptene, principale costituente del residuo non volatile.

Relativamente al linalolo, monoterpene che rappresenta circa il 10% dell'essenza, studi presenti in letteratura documentano le proprietà anticonvulsivanti di questo composto in modelli animali di epilessia sperimentalmente indotta (Elisabetsky et al., 1999) e la capacità di modulare la trasmissione glutammatergica (Brum et al., 2001).

È stato osservato un effetto antiproliferativo del linalolo in alcune linee cellulari di carcinoma umano alla cervice, pelle, stomaco, polmone ed ossa (Cherng et al., 2007). È stato, inoltre, dimostrato come il linalolo, da solo, inibisca moderatamente la proliferazione di cellule di adenocarcinoma mammario MCF-7 (fenotipo *wild type*) e del fenotipo MDR (multi drug resistance) (MCF-7 AdrR), potenziando 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 ridurre i livelli di Bcl-xL (Ravizza et al., 2008).

Studi più recenti hanno dimostrato le proprietà antiproliferative di tale sostanza in linee cellulari di leucemia con fenotipo *wild type* per la proteina p53 (Gu et al., 2010).

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. L'effetto "*penetration enhancer*" del linalolo è dovuto all'orientamento della molecola all'interno del doppio strato lipidico di membrana ed è tale da favorire sia il proprio assorbimento, sia quello di altri principi attivi come, ad esempio, l'aloiperidolo (Vaddi et al., 2002).

Studi di assorbimento condotti *in vitro* hanno rivelato come l'acetato di linalile, che rappresenta circa il 30% dell'essenza di bergamotto, pur essendo un composto più lipofilo del linalolo, è tra i due quello meno assorbito (Cal & Sznitowska, 2003).

L'acetato di linalile è stato al centro di uno studio che ne ha documentato l'effetto miorilassante sulla muscolatura liscia dell'arteria carotide di coniglio, pre-contratta da fenilefrina. In particolare, è stato dimostrato che l'effetto dell'acetato di linalile è in parte ascrivibile al nitrossido (NO) e, in parte, all'azione diretta del terpene sulla fosfatasi della catena leggera della miosina (Koto et al., 2006).

Da studi recenti è emerso che l'acetato di linalile, in associazione con altri costituenti degli oli essenziali, quali terpineolo e canfora, esercita un'azione antiproliferativa in linee cellulari di cancro al colon, HCT-116 (Itani, 2008). In particolare, è stato osservato che la morte cellulare per apoptosi segue la via mitocondriale nelle cellule HCT-116 ($p53^{+/+}$), con un meccanismo caspasi-dipendente, mentre, la morte cellulare nelle colture HCT-116 ($p53^{-/-}$), nonostante la presenza degli eventi caratteristici dell'apoptosi quali il rilascio del citocromo-c e il clivaggio di PARP, è caspasi-indipendente (Itani et al., 2008).

Il limonene, monoterpene idrocarburo monociclico, costituisce circa il 38% dell'intera essenza di bergamotto. Numerosi studi, condotti impiegando modelli sperimentali animali, hanno evidenziato l'azione preventiva di tale sostanza nell'insorgenza di tumori a livello della ghiandola mammaria, del polmone, dello stomaco e della pelle, indotti da idrocarburi policiclici aromatici e da nitrosammine (Elegbede et al., 1986; Elson et al., 1988; Homburger et al., 1971).

Studi successivi hanno documentato l'attività antiproliferativa del limonene *in vitro* e *in vivo*.

L'azione proapoptotica del limonene è stata evidenziata in modelli di xenotrapianto di cellule di tumore gastrico nel topo e *in vitro* nella linea tumorale BGC-823, con un'efficacia potenziata dal 5-fluorouracile (Lu et al., 2003; 2004).

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

Tale modificazione post-trascrizionale comporta l'aggiunta di gruppi funzionali su un residuo di cisteina all'estremità carbossi-terminale di molte proteine delle cellule eucarioti-

che (Schafer & Rine, 1992). I donatori specifici dei gruppi isoprenilici sono il farnesil-pirofosfato (FPP) ed il geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP), entrambi metaboliti della via del mevalonato (Gelb et al., 1995). Gli enzimi che catalizzano le reazioni di isoprenilazione sono rispettivamente la farnesil-transferasi e la geranylgeranyl-transferasi.

Proteine come Ras e p21 subiscono tale modificazione post-trascrizionale il cui risultato è quello di favorire la crescita cellulare, dunque la progressione neoplastica. E' stato postulato che gli effetti antitumorali del limonene e dei suoi metaboliti siano dovuti alla capacità di bloccare l'isoprenilazione proteica o di inibire la sintesi di farnesil-pirofosfato e geranylgeranyl-pirofosfato, interferendo con la via del mevalonato oppure attraverso l'inibizione degli enzimi farnesil-transferasi e geranylgeranyl-transferasi (Gelb et al., 1995).

Il bergaptene è il principale componente del residuo non volatile del BEO. Si tratta di uno psoralene responsabile di fototossicità cutanea in seguito ad applicazione topica ed esposizione alle radiazioni UVA, (320-400 nm) (Zaynoun et al., 1977).

E' stato proposto che gli psoraleni favoriscono l'abbronzatura poiché stimolano la melanogenesi, come dimostrato 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).

Le sostanze fotodinamiche dell'olio di bergamotto risultano rilevanti, inoltre, nella cura di alcune patologie importanti come la psoriasi e la vitiligine; agli inizi degli anni '70, infatti, fu introdotta la "PUVA-terapia" utilizzando 8-metossipsoralene (8-MOP) e raggi UVA per il trattamento della psoriasi (Parrish et al., 1974).

L'azione antiproliferativa del bergaptene è stata recentemente studiata in colture di carcinoma mammario, MCF-7. I risultati ottenuti dimostrano che, alla concentrazione 6µM, il

bergaptene determina una modesta riduzione della vitalità cellulare, pari a circa il 20%; l'effetto è significativo solo dopo esposizione ai raggi UVA delle cellule MCF-7 precedentemente trattate con il bergaptene (Panno et al., 2010).

1.3 Approcci terapeutici per la cura del cancro

La più datata ed accettata definizione di *neoplasia* risale al 1952 quando l'oncologo Willis la descrisse come massa anomala di tessuto la cui crescita è eccessiva e scoordinata rispetto a quella del tessuto normale. Il termine *cancro* è utilizzato per descrivere un quadro patologico in cui le cellule di un organismo si dividono senza controllo invadendo altri tessuti, anche lontani da quello di origine, servendosi principalmente del sistema linfatico.

Secondo recenti indagini statistiche condotte dal National Cancer Institute (U.S. National Institute of Health), più di 1.500.000 nuovi casi di cancro vengono diagnosticati ogni anno solo negli Stati Uniti (Howlader et al., 2010) dove tale patologia è la seconda causa di morte (Jemal et al., 2008). Dalle stesse indagini epidemiologiche emerge che dal 2004 al 2008 l'età media per la diagnosi del cancro è di 66 anni e che il rischio d'insorgenza dei tumori è influenzato dal sesso, maggiore per i soggetti di sesso maschile, oltre che dall'etnia di appartenenza (Fig. 1.2).

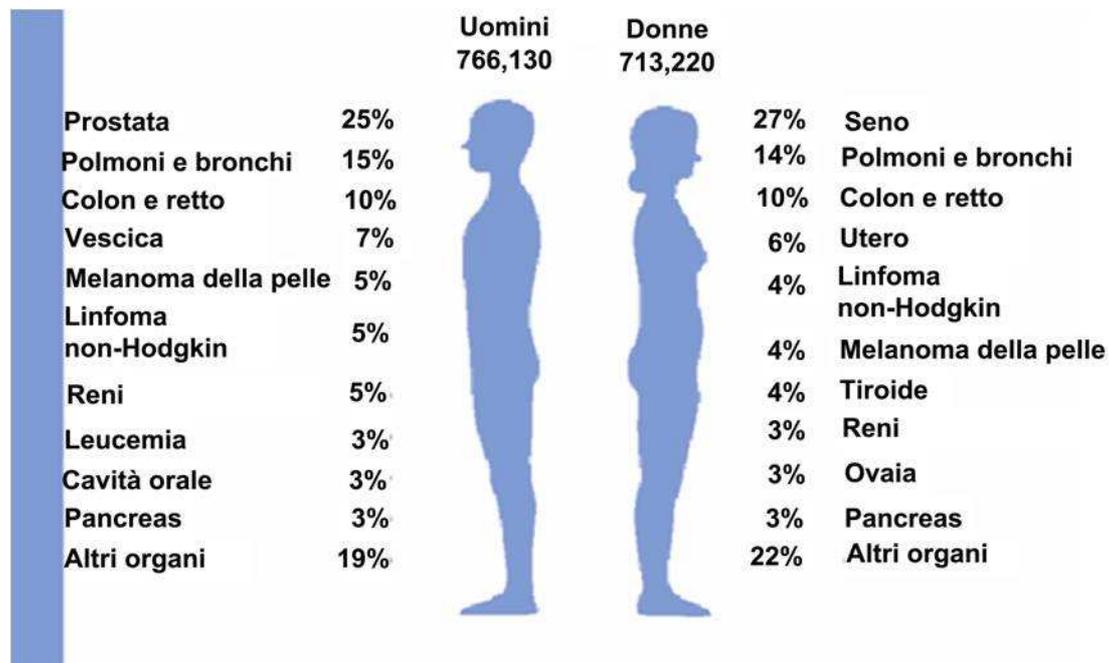


Fig. 1.2) Incidenza del cancro nel 2009. American Cancer Society

L'eziologia della patologia è multifattoriale, condizionata da componenti genetiche, ambientali, biologiche e dallo stile di vita che nel complesso costituiscono i fattori di rischio per lo sviluppo del cancro.

Oltre alla pratica chirurgica, si ricorre a diversi approcci terapeutici per la cura del cancro, alcuni in fase di sperimentazione clinica, come la terapia genica. Frequente è il ricorso alla radioterapia (Lawrence et al 2008), pre o post-operatoria, alla terapia biologica, anche nota come immunoterapia e alla chemioterapia.

Il successo delle strategie terapeutiche in ambito oncologico, il cui scopo è quello di neutralizzare selettivamente le masse di tessuto anomalo e contrastarne i meccanismi di resistenza, è fortemente dipendente dalla sensibilità ai processi che conducono alla morte cellulare (Ricci & Zong, 2006).

Sono state descritte quattro categorie di dinamiche cellulari che conducono a morte. Si tratta dei fenomeni conosciuti come *apoptosi*, *autofagia*, *necrosi* e *catastrofe mitotica* (Okada & Mak, 2004). L'arresto permanente della crescita cellulare o *senescenza* è altresì considerato come un meccanismo di morte cellulare (Dimri, 2005) (Fig. 1.3)

Tale classificazione si basa sulle caratteristiche biochimiche e morfologiche individuate nelle cellule. Due dei fenomeni elencati, l'apoptosi e l'autofagia, sono considerati tipi di morte "programmata" (Danial & Korsmeyer, 2004, Lum et al., 2005) ad indicare uno stretto controllo genico, al contrario, la catastrofe mitotica e la necrosi vengono considerate risposte passive ad un insulto cellulare aberrante, benché evidenze sperimentali suggeriscano che anche queste ultime due siano forme di morte controllata (Castedo et al., 2004, Zong & Thompson, 2006).

Anomalie nei meccanismi di regolazione di ciascuno di questi fenomeni sono state implicate nella genesi dei tumori.

Il principio razionale che guidò lo sviluppo dei farmaci usati in chemioterapia, il cui utilizzo ebbe inizio negli anni '40 (Gilman & Philips, 1946), è costituito dalla particolare sensibilità delle cellule in rapida divisione ai danni al DNA ed alla compromissione dei meccanismi che consentono la mitosi. Questo portò all'utilizzo di molecole come il cisplatino e derivati, gli agenti alchilanti come la nitrosurea o la ciclofosfamide, gli analoghi strutturali dei precursori nucleotidici (5-fluorouracile, citarabina, gemcitabina), nonché gli inibitori della topoisomerasi (etoposide, doxorubicina, irinotecano) (Jamieson & Lippard, 1999; Schwartz & Waxman, 2001). L'effetto determinato dalla prolungata e ripetuta esposizione a questi farmaci dei fenotipi sensibili è la morte cellulare per apoptosi con conseguente riduzione delle dimensioni della massa tumorale. Oltre a dover affrontare il problema della

scarsa selettività di queste sostanze, che frequentemente aggrediscono altri tessuti, in cui le cellule sono attivamente proliferanti, come l'epitelio gastrointestinale, il tessuto ematopoietico ecc., occorre contrastare i meccanismi cellulari che fisiologicamente si attivano in risposta ad uno stimolo lesivo o che normalmente si oppongono alla morte cellulare.

Proteine anti-apoptotiche come quelle appartenenti alla famiglia di Bcl-2 sono overesprese in vari tipi di cancro e strategie mirate alla loro modulazione sono attualmente in fase di sperimentazione (Makin & Dive 2001). Tali proteine agiscono principalmente a livello mitocondriale, regolandone la permeabilità di membrana e impedendo il rilascio di fattori pro-apoptotici (Korsmeyer, 1999). Tra le molecole in fase avanzata di sperimentazione clinica, oblimersen (Genasense® ,Genta Inc., Berkeley H., NJ) è un oligonucleotide antisense resistente alle nucleasi che inibisce l'espressione di Bcl-2. Questo farmaco si è rivelato valido in combinazione con il docetaxel nella cura del cancro prostatico ormone-resistente (Tolcher et al., 2005).

I membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2 condividono un sito di legame, ad alta affinità, per il dominio BH-3 dei membri pro-apoptotici, attraverso il quale ne prevengono l'attivazione e l'esecuzione della cascata di eventi che conduce a morte cellulare (Schwartz & Hockenbery 2006). Queste evidenze hanno stimolato la sintesi di peptidi contenenti un dominio BH3 per antagonizzare l'attività anti-apoptotica delle proteine correlate a Bcl-2. Tali molecole, identificate con l'acronimo SAHB (stabilized alpha-helix of BCL-2 domains), sono in grado di attraversare le membrane cellulari, sono caratterizzate da elevata resistenza alle proteasi ed instaurano legami ad alta affinità con i membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, consentendo l'esecuzione della morte programmata (Walensky et al., 2004). Molecole appartenenti a questa categoria sono in fase di sperimentazione clinica;

fra queste, GX15-070 conosciuto anche come Obatoclox e sviluppato dalla GeminX (Montreal, Canada). Tale composto ha dimostrato una modesta attività terapeutica nella cura di tumori della linea bianca del sangue; tuttavia, la sua scarsa tossicità lo ha candidato per nuovi studi in associazione con altri chemioterapici (O'Brien et al., 2009).

Risultati meno entusiasmanti sono stati ottenuti dagli approcci mirati all'attivazione della via estrinseca dell'apoptosi, mediante l'impiego del fattore di necrosi tumorale (TNF) o del ligando di FAS, a causa degli importanti effetti collaterali indotti (Hersh et al., 1991; Ogasawara et al., 1993). Al contrario, evidenze sperimentali ottenute in modelli di xenotrapianto nei roditori e nei primati hanno sottolineato l'efficacia e la scarsa tossicità dell'utilizzo di TRAIL, anche noto come Apo2L, un agonista di recettori dei membri della famiglia del fattore di necrosi tumorale (TNFR), in grado di attivare il processo apoptotico (Ashkenazi et al., 1999). Tali evidenze hanno portato all'avvio della sperimentazione clinica di TRAIL ricombinante e di anticorpi attivanti i recettori di morte come DR5 (Chuntharapai et al., 2001; Ichikawa et al., 2001). In particolare, risultati soddisfacenti sono stati ottenuti, sia *in vitro* che *in vivo*, dalla combinazione della radioterapia e chemioterapia con TRAIL grazie alla sensibilizzazione dei fenotipi resistenti (Chinnaiyan et al., 2000).

E' stata valutata anche la possibilità di attivare direttamente le caspasi. Tali proteasi, contenenti un residuo nucleofilo di cisteina, partecipano al clivaggio di proteine riconoscendo una specifica sequenza in corrispondenza di residui di aspartato e intervengono sia nella via estrinseca che in quella intrinseca dell'apoptosi (Thornberry & Lazebnik, 1998). Sono stati realizzati vettori ad adenovirus per l'introduzione della caspasi-9 modificata (iCaspasi-9), la cui espressione nelle cellule bersaglio è controllata da un promotore responsivo a-

gli androgeni. In questo sistema, la somministrazione di un farmaco attivante produce l'auto-proteolisi ed attivazione della proteina, seguita da apoptosi (Xie et al., 2001).

Mutazioni a carico del proto-oncogene p53 sono state individuate in più del 50% dei tumori (Hollstein et al., 1996) ed alcuni modelli sperimentali *in vivo* hanno correlato l'assenza di p53 ad una forte incidenza nello sviluppo precoce di neoplasie (Donehower et al., 1992). Tali mutazioni, inoltre, contribuiscono allo sviluppo di resistenza dei tumori ai chemioterapici per insensibilità all'apoptosi dipendente da p53 (Donehower et al., 1992; Vogelstein et al., 2000). Quello di ripristinare i livelli e le funzioni di p53 wild-type è uno degli obiettivi principali nell'elaborazione di strategie terapeutiche per la cura del cancro (Wang et al., 2003). A tale scopo è stata testata la terapia genica per il rilascio di p53 all'interno di cellule tumorali mediante l'utilizzo di vettori ad adenovirus in pazienti con cancro polmonare e cancro ovarico. Tale approccio è ben tollerato dai pazienti con un'efficacia variabile e favorita dalla combinazione con la radio/chemioterapia (Higuchi et al., 2003; Schuler et al., 2001). Altre strategie mirano a stabilizzare i livelli di p53 mediante l'impiego di piccoli peptidi contenenti la sequenza ammino-terminale della proteina. Questi sono in grado di ostacolare il legame tra p53 e MDM2 (*mouse double minute 2*) prevenendone la degradazione mediata dal proteosoma (Kanovsky et al., 2001). Diverse tecniche sono state anche introdotte per ripristinare la capacità di legame al DNA e l'attività trascrizionale per la forma mutata di p53. Tra le molecole candidate per i trials clinici troviamo CP-31398 (Bykov et al., 2002) che risulta efficace in diverse linee cellulari contenenti forme mutate di p53 (Takimoto et al., 2002).

L'evidenza che, in diversi tipi di tumore, le vie che mediano l'apoptosi siano compromesse induce a ricercare strategie terapeutiche che abbiano come bersaglio l'attivazione di mec-

canismi di morte alternativi, quali la necrosi. Approcci riconosciuti in grado di attivare questa via di morte nelle cellule tumorali sono il trattamento fotodinamico (PDT), gli agenti alchilanti il DNA, molecole come il β -lapachone e l'onochiolo (Bai et al., 2003; Li et al., 2007; Salomon et al., 2000; Tagliarino et al., 2001). La terapia fotodinamica è stata sviluppata per colpire selettivamente i tessuti interessati senza danneggiare quelli circostanti attraverso la somministrazione di molecole fotosensibilizzanti, come la porfirina, direttamente nelle cellule bersaglio. Dopo l'esposizione alla sorgente luminosa la massiccia produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) determina morte cellulare di tipo necrotico per perdita dell'integrità di membrana (Hsieh et al., 2003; Miccoli et al., 1998).

Le molecole che agiscono danneggiando il DNA con un'azione diretta sono quelle maggiormente utilizzate ed efficaci in chemioterapia (Chabner & Longo, 2006). In risposta a questo tipo di danno, la poli-(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) viene attivata per favorire i processi di riparazione e la sopravvivenza cellulare. Questo il razionale per lo sviluppo e la sperimentazione clinica di molecole in grado di inibire l'attività di tale enzima per potenziare l'effetto terapeutico dei farmaci che agiscono danneggiando il DNA (Ratnam & Low, 2007).

Circostanze che, al contrario, determinano l'iperattivazione di PARP comportano la deplezione citosolica del cofattore NAD^+ (nicotinammide adenina dinucleotide) con conseguente morte di tipo necrotico causata da un irreversibile deficit energetico (Ha & Snyder, 1999). Quest'ultima condizione può essere sfruttata per indurre la morte selettiva delle cellule tumorali che dipendono fortemente da tale cofattore per soddisfare il proprio fabbisogno energetico, attraverso la glicolisi (Zong et al., 2004). È stato, infatti, dimostrato che l'attivazione di PARP-1 in cellule incapaci di attuare il processo apoptotico come quelle

Bak/Bax-deficienti, in condizioni che inducono stress del reticolo endoplasmatico, conduce a necrosi come meccanismo alternativo di morte. Ciò costituisce un approccio alternativo promettente per contrastare la resistenza di alcuni tipi di tumore insensibili all'apoptosi (Janssen et al., 2009).

La *catastrofe mitotica* è un evento per cui le cellule vanno incontro a morte in fase di divisione cellulare a causa di anomalie dei punti di controllo del ciclo cellulare che comportano un'aberrante mitosi e lo sviluppo di aneuploidia. Generalmente non è strettamente considerata come un meccanismo di morte ma un fenomeno che predispone alla morte cellulare (Weaver & Cleveland, 2005). Cellule che sfuggono alla catastrofe mitotica, in seguito ad anomalie nel processo di divisione cellulare, riproducendosi determinano la possibilità di sviluppo di popolazioni aneuploidi e costituiscono un rischio per la cancerogenesi (Nigg, 2001).

Questo tipo di morte condivide alcune caratteristiche con l'apoptosi, come la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e l'attivazione delle caspasi, ma risulta profondamente diversa da questa sotto altri aspetti (Castedo et al., 2004; Roninson et al., 2001). Infatti, le manipolazioni atte a impedire l'esecuzione dell'apoptosi, come la sovraespressione di Bcl-2 in linee cellulari prive di p53 trattate con etoposide o l'inibizione farmacologica delle caspasi, non riescono a prevenire la morte di queste cellule che appaiono di grandi dimensioni e multinucleate (Lock & Stribinskiene, 1996; Nabha et al., 2002).

Agenti come il paclitaxel e gli alcaloidi della vinca che interferiscono con l'assemblaggio della tubulina e con la stabilità dei microtubuli, prevenendo l'interazione tra il fuso mitotico e i centrosomi, sono in grado di indurre *catastrofe mitotica* (Roninson et al., 2001). Tali farmaci determinano importanti effetti collaterali, tra cui neuropatia periferica, dovuti alle

alterazioni delle funzioni biologiche cellulari conseguenti al danno ai microtubuli. Un nuovo approccio in grado di minimizzare gli effetti collaterali dovuti all'attivazione della catastrofe mitotica quale meccanismo di morte si basa sullo sviluppo di molecole che agiscono selettivamente su proteine coinvolte esclusivamente nell'esecuzione della mitosi come la proteina Eg5, appartenente alla famiglia delle *kinesin spindle proteins* (KSP) e coinvolta nella separazione dei poli del fuso mitotico. (Weaver & Cleveland, 2005). Alcuni di questi farmaci (SB-715992, ispinesib) sono in fase di sperimentazione clinica anche in associazione con altri chemioterapici (Sakowicz et al., 2004).

L'inibizione delle chinasi che regolano i checkpoints del ciclo cellulare è stata proposta come meccanismo atto a favorire la chemio-sensibilizzazione. Le mutazioni a carico del proto-oncogene p53 rendono inattivo il controllo sulla fase G1 del ciclo cellulare e comportano il perpetrarsi e l'accumulo di danni al DNA e la progressione dei tumori dovuta all'incapacità di attuare il processo apoptotico. UCN-01 (7-idrossi-staurosporina), un analogo della staurosporina, attualmente in fase di sperimentazione clinica anche in associazione con altri chemioterapici, agisce inibendo la chinasi Chk1, proteina funzionale alla progressione del ciclo cellulare (Graves et al., 2000, Kummar et al., 2010).

Anche la *senescenza*, o invecchiamento cellulare, viene considerata da molti ricercatori come un meccanismo di morte nel contesto della terapia contro il cancro; si tratta di un evento fisiologico che comporta il blocco irreversibile in fase G1 del ciclo cellulare (Dimri, 2005). Questo fenomeno è stimolato dall'attivazione di ras/raf, dal proto oncogene p53 e dall'accorciamento dei telomeri (Cosme-Blanco et al., 2007; McGlynn et al., 2009). La senescenza cellulare associata all'accorciamento dei telomeri è anche detta *senescenza replicativa* mentre quella indotta da eventi stressogeni è anche nota come *senescenza prematura*

(Bodnar et al., 1998; Gorbunova et al., 2002). Alcune delle caratteristiche morfologiche delle cellule senescenti sono l'espansione del compartimento lisosomiale, l'aumento della granularità, l'aumento dell'espressione e dell'attività della β -galattosidasi (SA- β -gal) (Kurz et al., 2000, Lundberg et al., 2000), caratteristiche condivise, almeno in parte, da altri eventi che conducono a morte cellulare come, in particolari condizioni, l'autofagia (Gerland et al., 2003).

L'induzione della senescenza dopo la somministrazione di farmaci è stata studiata come meccanismo antitumorale in diversi modelli *in vitro* ed *in vivo* e, nonostante gli eventi intracellulari associati a tale fenomeno non siano del tutto noti, diversi farmaci strutturalmente non correlati, ma accomunati dalla capacità di danneggiare direttamente il DNA o di causare stress ossidativo, sono in grado di indurlo. Tra questi l'inibitore della topoisomerasi I, camptotecina, l'inibitore della topoisomerasi II, adriamicina, le radiazioni γ , l'antimetabolita citarabina. Al contrario, agenti che non provocano un danno diretto al DNA come il tassolo o gli alcaloidi della vinca, non determinano un fenotipo senescente (Roberson et al., 2005).

Negli anni settanta fu ipotizzata, per la prima volta, una correlazione negativa tra il processo autofagico ed il cancro, quando diversi studi rivelarono un ridotto turnover proteico negli stadi precoci della cancerogenesi (Gunn et al., 1977), per garantire la rapida crescita cellulare. La proteina pro-autofagica beclin-1, risulta poco espressa in un numero rilevante di tumori (Aita et al., 1999; Liang et al., 1999). L'induzione di tale proteina in una linea cellulare di tumore mammario (MCF-7) inibisce la tumorigenesi da xenotrapianto nel topo attraverso l'attivazione dell'autofagia (Liang et al., 1999).

Nell'ambito della terapia antitumorale, l'efficacia di diversi trattamenti è legata all'induzione di autofagia. Alcune molecole, come i derivati della rapamicina, il triossido di arsenico e la temozolomide, sono particolarmente promettenti per contrastare i tumori resistenti all'apoptosi (Bjornsti & Houghton, 2004; Kanzawa et al., 2005; Paglin et al., 2001).

La rapamicina e i suoi analoghi inibiscono la chinasi mTOR attivando il processo autofagico (Bjornsti & Houghton 2004). In questo contesto, il silencing di beclin-1 attenua la tossicità della rapamicina nelle linee tumorali sensibili, sottolineando come proprio l'autofagia sia il principale meccanismo della sua attività antitumorale (Iwamaru et al., 2007). *Clinical trials* di fase I e II sono attualmente in corso per testare la validità degli inibitori di mTOR in ambito oncologico (Reardon et al., 2006).

La sperimentazione clinica è in fase di avvio anche per il triossido di arsenico mentre è stata comprovata l'efficacia in pazienti con glioblastoma della temozolomide, che agisce mediando la formazione di O⁶-metilguanina e provocando un errato accoppiamento delle basi azotate del DNA in fase di replicazione (Kanzawa et al., 2004).

Tra le potenziali cause di chemioresistenza, oltre ai polimorfismi genetici, si ritrovano: la somministrazione di dosi inadeguate di farmaco, un'alterata farmacocinetica o una scarsa penetrazione del farmaco nella massa tumorale, condizione questa causata da una scarsa vascolarizzazione del tessuto o dalla localizzazione del tumore in regioni difficilmente accessibili per via delle barriere naturali (Huang & Temple, 2008; Minchinton & Tannock, 2006).

Dalle evidenze sperimentali ottenute emerge che, ad aggravare il quadro clinico e la prognosi dei soggetti oncologici, spesso si instaurano forme di resistenza crociata ai farmaci. Il fenomeno della *multidrug resistance* (MDR) si verifica quando cellule sottoposte a trattamento con chemioterapici diventano resistenti ad altri strutturalmente non correlati. Questo tipo di fenomeno è spesso associato all'aumento dell'espressione della glicoproteina-P, una proteina transmembrana di 170 kDa (Roninson et al., 1986), responsabile del trasporto attivo di numerosi chemioterapici, oltre che di substrati fisiologici, dal compartimento citoplasmatico all'ambiente extracellulare. Il gene che codifica per questa proteina, *MDR-1*, è overespresso in un gran numero di tumori come il neuroblastoma, il rhabdomyosarcoma, linfoma di Hodgkin, il mieloma, il carcinoma mammario, del colon e del rene che sviluppano forme di resistenza crociata a farmaci come gli alcaloidi della vinca, i tassani, l'epidodofillotossina, le antracicline. Sebbene sia stato osservato che l'esposizione ai chemioterapici è spesso associata all'aumento dell'espressione del gene *MDR-1*, tuttavia, rimane oggetto di discussione se questo fenomeno sia strettamente legato all'instaurarsi della resistenza o solo espressione di un fenotipo più aggressivo (Pinedo & Giaccone, 1995; Weinstein et al., 1991).

Meccanismi di resistenza crociata sono stati riscontrati in altre linee cellulari in cui la glicoproteina-P non risulta overespressa. Questi differenti fenotipi sono chiamati *MDR non dipendenti dalla glicoproteina-P*.

Circa un decennio addietro è stato identificato il gene *MRP*, overespresso o amplificato in un cospicuo numero di linee tumorali resistenti alla doxorubicina. Questo codifica per una proteina che, similmente alla glicoproteina-P, è localizzata nella membrana cellulare (Cole et al., 1992).

Successivamente è stato identificato un nuovo gene potenzialmente responsabile di altre forme di resistenza crociata, non determinate da *MDR-1*. La sua overespressione è stata riscontrata nella selezione di cloni resistenti all'antraciclina (Scheper et al., 1993). La proteina codificata da tale gene è la LRP (*lung-resistance protein*), riconosciuta dall'anticorpo monoclonale LRP56. Questa non appartiene alla famiglia delle "ATP-binding cassette" come la glicoproteina-P e MRP e la sua localizzazione è prevalentemente intracellulare (Scheffer et al., 1995). L'overespressione di questa proteina è più frequente in quelle forme di tumore che manifestano una resistenza intrinseca ai chemioterapici (Izquierdo et al., 1996).

Un ridotto *uptake* cellulare è alla base della resistenza al metotressato che si avvale di sistemi di trasporto ad alta affinità per raggiungere i bersagli intracellulari. La perdita o la ridotta attività di questi sistemi comporta la riduzione dei livelli intracellulari del farmaco e della sua efficacia (Drori et al., 2000).

Una ridotta attivazione metabolica è un meccanismo di resistenza determinante per quelle sostanze introdotte sotto forma di pro-farmaco, come nel caso dell'agente alchilante ciclofosfamide, il quale viene convertito a livello epatico nel suo metabolita attivo ad opera del

citocromo P450 (Rekha & Sladek, 1997). Un simile meccanismo di resistenza è stato anche individuato per l'irinotecano, un analogo delle camptotecine il cui meccanismo d'azione è ascrivibile all'inibizione della DNA topoisomerasi I. Tale molecola necessita di essere convertita dalle carbossilesterasi nel metabolita attivo SN-38 per esplicare la sua attività antitumorale (Charasson et al., 2004).

Le alterazioni dei *targets* molecolari sono rilevanti in diverse forme di resistenza innata o acquisita. Un esempio di tale fenomeno è la resistenza ai tassani. Il paclitaxel agisce inibendo le dinamiche dei microtubuli attraverso il legame alla β III-tubulina inducendo morte di tipo apoptotico (Zhou & Giannakakou, 2005). Un'alterata espressione delle isoforme della β -tubulina si riscontra in diversi tipi di cancro e potrebbe essere la causa della resistenza a farmaci in ambito clinico (Kavallaris et al., 2001).

Un altro tipo di resistenza crociata non dipendente dalla glicoproteina-P è quella dovuta ad alterazioni della funzionalità della DNA topoisomerasi II. Tale enzima nucleare è essenziale per la catalisi di processi quali la duplicazione e la del DNA ed è bersaglio di chemioterapici quali le antracicline, l'actinomicina D, le epipodofillotossine (Valkov & Sullivan, 1997). I farmaci coinvolti nella resistenza crociata dovuta ad alterazioni di questo enzima sono gli stessi coinvolti nella multi-resistenza dipendente da glicoproteina-P, ad eccezione degli alcaloidi della *Vinca* e dei tassani (Liu et al., 1989). Le forme di resistenza che s'instaurano per via della ridotta espressione o funzionalità dell'enzima si riscontrano sia in linee cellulari selezionate che non selezionate, ad indicare come tali alterazioni siano alla base di forme di resistenza multipla più generalizzate, rispetto a quelle dovute ad alterazioni dei trasportatori (Giaccone, 1994).

Negli anni sono stati condotti numerosi *trials* clinici per valutare l'efficacia di molecole in grado di revertire la resistenza crociata dipendente dalla glicoproteina-P. Sebbene i meccanismi attraverso cui questo fenomeno avviene siano molteplici e complessi, tutte le sostanze che revertono tale tipo di farmacoresistenza, tra cui la nifedipina, il tamoxifene, l'amiodarone, sono substrato della glicoproteina-P e competono con il chemioterapico per l'estrusione dalla cellula. La prima molecola ad essere stata identificata per questa capacità è il verapamil che, sfortunatamente, è efficace nel revertire *in vitro* la resistenza ai farmaci a concentrazioni che *in vivo* determinano cardiotoxicità. Tuttavia, in importanti *trials* clinici condotti in pazienti con mieloma multiplo refrattari alla terapia, cancro polmonare e carcinoma mammario l'impiego di questi farmaci per revertire la resistenza ai chemioterapici è risultato fallimentare (Dalton et al., 1995; Milroy, 1993).

1.4.1 Coinvolgimento della via PI3K/Akt nella tumorigenesi e chemioresistenza.

La via fosfatidil-inositolo 3 kinasi(PI3K)/Akt, attivata in risposta a stimoli fisiologici o citotossici ed implicata nella regolazione di numerosi processi cellulari, dalla trascrizione alla proliferazione ed alla crescita cellulare (Datta et al., 1999), è una delle principali vie biochimiche responsabili della sopravvivenza cellulare.

La PI3K è un enzima eterodimerico, appartenente alla famiglia delle serine/treonine chinasi, formato da una subunità catalitica (p110) e da una subunità regolatoria (p85) (Wymann et al., 2003). La proteina attiva fosforila i fosfoinositoli di membrana in posizione 3'-OH dell'anello inositolico formando il fosfatidilinositolo 3-4 bisfosfato (PI-3,4-P2) ed il fosfatidilinositolo 2,4,5, trisfosfato (PIP3). Quest'ultimo rappresenta il sito di convergenza tra la chinasi Akt, anche denominata proteina chinasi B (PKB), e la PDK1 (PIP3-dependent pro-

tein kinase-1) che ne media la fosforilazione in treonina-308. La completa attivazione di Akt è dovuta alla successiva fosforilazione in serina-473 mediata complesso mTOR-riCTOR (m-TORC2, *mammalian target of rapamycin complex 2*) (Sarbasov et al., 2005) o dalla chinasi DNA-dipendente (DNA-PK) (Feng et al., 2004). Il principale meccanismo intracellulare di inattivazione della via PI3K/Akt è mediato dalla fosfatasi PTEN che antagonizza l'attività della fosfatidil inositolo 3-chinasi (di Cristofano et al., 1998).

Nei mammiferi esistono tre isoforme della proteina Akt ognuna delle quali è codificata da un distinto locus genico: Akt-1, Akt-2 ed Akt-3. Mentre Akt-1 è espressa in modo ubiquitario, ad eccezione di rene e milza (Coffer & Woodgett, 1991), l'espressione di Akt-2 è limitata agli organi intestinali, sessuali, ai muscoli ed al tessuto riproduttivo (Konishi et al., 1994). Akt-3, invece, è espressa maggiormente nel testicolo, nel cervello e, a livelli ridotti, nel tessuto muscolare e negli organi intestinali (Nakatani et al., 1999).

La principale funzione degli enzimi fosfatidil-inositolo 3 chinasi (PI3Ks) di classe I è correlata all'omeostasi del glucosio, al metabolismo, alla proliferazione e alla sopravvivenza cellulare. Tra gli effetti mediati dalla via dei fosfoinositidi vi è la modulazione della progressione del ciclo cellulare (Liang & Slingerland, 2003). Akt stimola la crescita cellulare e la sintesi proteica attivando mTOR che fosforila le chinasi della proteina ribosomiale S6 (S6K1/2) (Huang & Houghton, 2003). Conseguenza di questo evento sono la biogenesi ribosomiale e la traslazione dell'RNA messaggero. Inoltre, Akt influenza la proliferazione cellulare inattivando gli inibitori del ciclo cellulare come p21 e p27 (Fujita et al., 2002; Rossig et al., 2001) e attivando proteine che mediano la progressione del ciclo cellulare, attraverso la fosforilazione ed inattivazione della glicogeno sintasi chinasi-3 β (GSK-3 β) (Diehl et al. 1998). Akt è anche implicata nel controllo dell'apoptosi. Tale controllo avvie-

ne attraverso l'inibizione dei fattori pro-apoptotici (ligando di Fas, Bim e Bad) e la degradazione dell'onco-soppressore p53 (Engelman et al., 2006).

Un numero rilevante di evidenze sperimentali documenta il ruolo svolto dalla via dei fosfoinositidi, ed in particolare dalla chinasi Akt, non solo nel promuovere la sopravvivenza cellulare e, dunque, la progressione tumorale, ma anche nel determinare resistenza dei tumori ad una vasta gamma di chemioterapici (Fig. 1.4). L'iperattivazione della chinasi è spesso ascrivibile ad alterazioni di PI3K o della fosfatasi PTEN. È stato riscontrato che i segnali che attivano la via PI3K/Akt sono amplificati in diversi tipi di tumore (Forbes et al., 2010; Kim et al., 2008, Mizoguchi et al., 2004). Inoltre, diversi modelli animali hanno dimostrato la diretta correlazione tra iperattivazione di Akt e tumorigenesi (Trotman et al., 2007; Wang et al., 2003)

È stato anche dimostrato che la costitutiva attivazione di Akt è legata alla resistenza di cellule di tumore del polmone alla radioterapia (Brognard et al., 2001), mentre la resistenza al carboplatino e al paclitaxel si riscontra nelle cellule di carcinoma ovarico (Kim et al., 2007).

Tra le molecole più studiate in grado di modulare l'attività di Akt vi sono gli inibitori della via dei fosfoinositidi, LY294002 e wortmannina. Entrambe le molecole si sono rivelate promettenti per contrastare la proliferazione cellulare soprattutto nelle linee tumorali caratterizzate da eccessiva attivazione di Akt. Tuttavia, nonostante le premesse, l'utilizzo di queste sostanze si è rivelato fallimentare nella sperimentazione *in vivo*. Entrambe le molecole sono, infatti, poco maneggevoli, dotate di scarsa selettività ed elevata tossicità (Marone et al., 2008).

Un derivato di LY294002, SF1126, è tra le molecole attualmente in fase di sperimentazione clinica per la capacità di inibire la PI3K; il suo potenziale terapeutico in campo oncologico è legato alla capacità di promuovere la regressione della massa tumorale e di ridurre l'angiogenesi, come dimostrato in un modello sperimentale di tumore da xenotrapianto nel topo (Garlich et al., 2008).

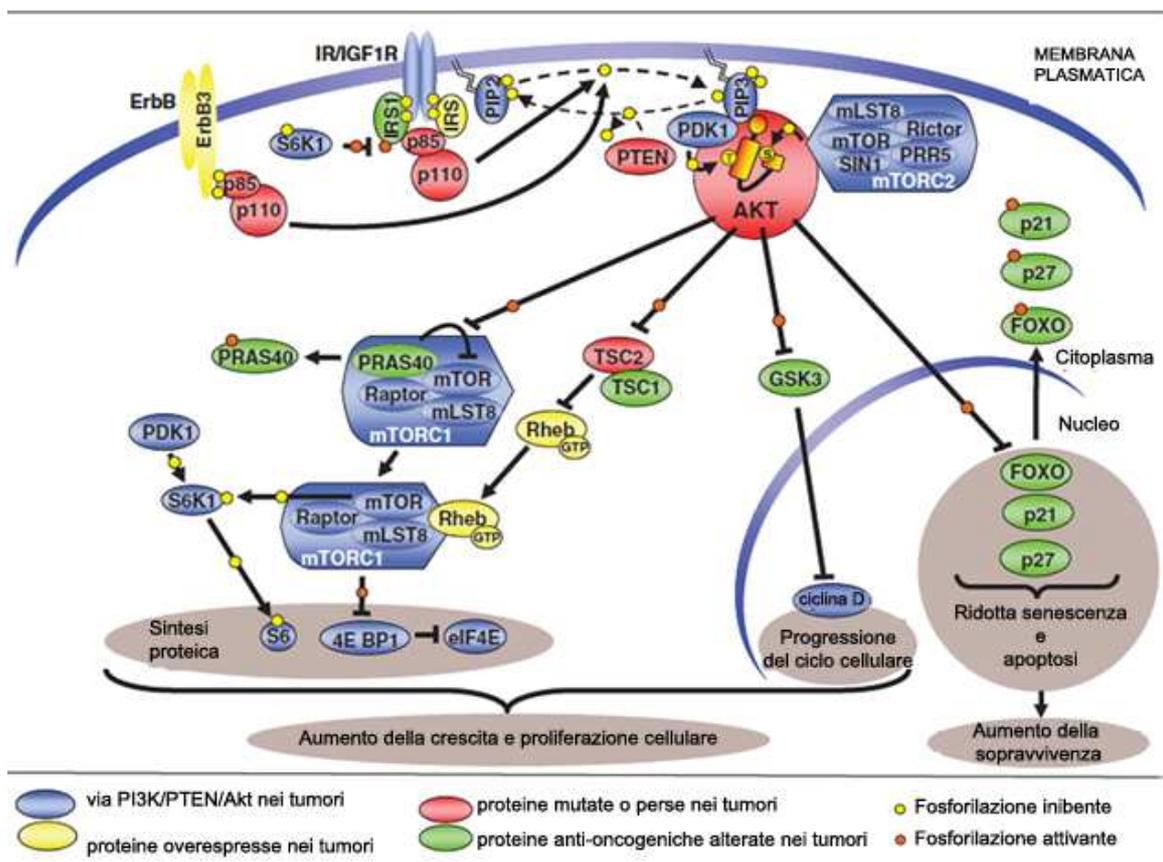


Fig. 1.4) Coinvolgimento di PI3K/Akt nell'oncogenesi e nella chemioresistenza. (Restuccia & Hemmings 2010)

2. Scopo della tesi

Recenti studi hanno descritto le proprietà ansiolitiche dell'olio essenziale di bergamotto (BEO) nel ratto (Saiyudthong & Marsden, 2011) e le proprietà antinocicettive del fitocomplesso e di alcuni dei suoi costituenti in modelli sperimentali di dolore nel topo (Bagetta et al., 2010; Berliocchi et al., 2009; Sakurada et al., 2009, 2011). Questi studi sottolineano il potenziale terapeutico dell'olio essenziale di bergamotto, il cui impiego è diffuso in aromaterapia per alleviare i disturbi dell'umore, i sintomi dell'ansia indotta da stress, o il dolore nei soggetti oncologici (si veda Bagetta et al., 2010). Inoltre, il BEO e preparati a base dell'olio essenziale sono impiegati nell'industria alimentare, farmaceutica, profumiera e cosmetica.

Tuttavia, in letteratura non sono disponibili dati che descrivano il profilo tossicologico del BEO *in vivo* o in colture cellulari umane sia normali che tumorali; gli unici studi che hanno approfondito questo aspetto dell'olio essenziale di bergamotto sono quelli condotti su organismi patogeni (Fisher & Philips, 2006; Mandalari et al., 2007; Romano et al., 2005).

Studi condotti *in vitro* ed *in vivo* hanno documentato il potenziale neuroprotettivo del BEO che previene il danno eccitotossico indotto da NMDA, in colture di neuroblastoma umano (Corasaniti et al., 2007), e riduce il volume d'infarto in un modello sperimentale di ischemia cerebrale nel ratto (Amantea et al., 2009). Da questi studi è emerso che gli effetti neuroprotettivi del BEO sono associati alla modulazione della via di sopravvivenza PI3K/Akt. È stato ampiamente descritto in letteratura che la chinasi Akt stimola la proliferazione e la sopravvivenza cellulare favorendo la progressione del ciclo cellulare e inibendo alcuni dei meccanismi proapoptotici (Diehl et al. 1998; Engelman et al., 2006; Fujita et al., 2002; Rossig et al., 2001;). L'effetto *pro-survival* esercitato della via PI3K/Akt ha un ruolo im-

portante nel contrastare gli stimoli dannosi per la cellula; tuttavia, l'iperpressione o la deregolazione della chinasi Akt sono fenomeni associati alla tumorigenesi ed alla resistenza di alcuni tipi di tumore alla terapia antineoplastica (Brognard et al., 2001; Kim et al., 2007; Staal et al., 1987).

Pertanto, lo scopo del presente studio, condotto *in vitro*, è stato quello di caratterizzare gli effetti del BEO sulla vitalità e proliferazione cellulare e valutare le alterazioni indotte a carico di alcune delle vie biochimiche che favoriscono la sopravvivenza cellulare. In particolare, sono state utilizzate colture di cellule di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, precedentemente usate negli studi di neuroprotezione dal danno eccitotossico indotto da NMDA, e colture di leucemia mieloide cronica umana (CML), K-562. Inoltre, lo studio è stato esteso a colture di fibroblasti di cute umana, Hs 605.Sk, per valutare la sensibilità di linee cellulari con un fenotipo normale all'olio essenziale di bergamotto.

3. Materiali e metodi

3.1 Reagenti

L'olio essenziale di bergamotto (BEO) è stato fornito dal “*Consorzio 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 fitocomplesso utilizzato presentava la seguente composizione: 44.17% di d-limonene, 28.73% di acetato di linalile, 7% di γ -terpinene, 6.57% di β -pinene, 4.61% di linalolo, 0.47% di β -bisabolene e 0.23% di geraniale, come determinato mediante tecniche di gas cromatografia (GC-FID) e 1.467 g/Kg di bergaptene, analizzato mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC/UV). Sulla base dell'analisi chirale, il BEO presentava seguente profilo enantiomerico: il 98.2% di (+)-limonene rispetto all'1.8% di (-)-limonene; lo 0.6% di (+)-linalolo rispetto al 99.4% di (-)-linalolo; lo 0.5% di (+)-acetato di linalile rispetto al 99.5% di (-)-acetato di linalile.

Il BEO è stato diluito 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 (0,005; 0,01; 0,02%; 0,03 e 0,04%). Al fine di valutare gli effetti dell'etanolo sui parametri cellulari studiati, in ogni esperimento colture cellulari sono state parallelamente trattate con *medium* contenente etanolo a concentrazione pari a quella presente nelle varie diluizioni del BEO (0,0045-0,036%).

L'inibitore non selettivo delle caspasi benzilossicarbonil-Val-Ala-Asp(OMe)-fluorometilchetone (Z-VAD-fmk) è stato ottenuto da MBL International Corporation (MA,

USA). L'inibitore delle catepsine, (2S,3S)-trans-epossisuccinil-L-leucilamido-3-metil butano etil estere (E-64d), l'N-acetil-L-cisteina (NAC) e l'etilen glicol-bis(2-aminoetiletere)-N,N,N',N'-acido tetra acetico (EGTA) sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). L'inibitore delle calpaine (carbossibenzossil-valinil-fenilalaninale; MDL 28170) è stato ottenuto da Calbiochem (La Jolla, CA, U.S.A.). L'1,2-bis-(o-Aminofenossi)-etano-N-N'-N'-acido tetra acetico, tetracetossi metil estere (BAPTA-AM) è stato ottenuto da Enzo Life Sciences (Lausen, Svizzera).

3.2 Colture cellulari e trattamenti

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state ottenute dall'ICLC-IST (Genova, Italia). Questa linea è un sub-clone 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-glutammina (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. Ventiquattro ore dopo la semina, il terreno di coltura veniva sostituito con mezzo fresco normale (colture controllo) o *medium* contenente il veicolo o il BEO per il tempo indicato.

Le soluzioni stock di Z-VAD-fmk (100mM), E-64d (30 mM), MDL 28170 (40 mM) e BAPTA, in dimetilsolfossido (DMSO), sono state diluite nel mezzo di coltura ed applicate alle colture SH-SY5Y per 30 min (BAPTA), 1 ora (E-64d, MDL28170) o 2 ore (Z-VAD-fmk) prima dell'esposizione al BEO. Al fine di evitare errori interpretativi dei risultati dovuti alla presenza del DMSO, sono stati condotti esperimenti paralleli di controllo nei quali le cellule sono state trattate con uguali percentuali del veicolo (DMSO) prima dell'esposizione al BEO. Contemporaneamente, al fine di valutare gli effetti dell'etanolo (veicolo del BEO) sui parametri cellulari analizzati, colture cellulari pretrattate con gli inibitori farmacologici, sono state esposte al *medium* contenente etanolo a concentrazione pari a quella presente nelle varie diluizioni del BEO (0,0045-0,036%).

La linea cellulare di leucemia mieloide cronica umana K-562 è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD). Le K-562 sono cellule multipotenti del tessuto ematopoietico. La linea continua deriva dall'effusione pleurica di una paziente di 53 anni affetta da leucemia mieloide in crisi blastica terminale (Lozzio & Lozzio, 1977).

Le cellule sono state coltivate in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con aggiunta di siero fetale bovino (10%; vol/vol) e penicillina-streptomina (100X, 1%), a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Per i trattamenti con il BEO (0,005-0,03%) e le concentrazioni corrispondenti di veicolo (etanolo 0,0045-0,027%) le cellule sono state poste in tubi di polipropilene, adatti all'analisi citofluorimetrica, alla densità di 4×10^5 cellule/ml.

La linea cellulare di fibroblasti di cute umana (Hs 605.Sk) è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (Rockville, MD). Questa linea cellulare presenta un fenotipo normale ed è stata ottenuta dal tessuto cutaneo apparentemente normale di una donna affetta

da carcinoma mammario. Le condizioni di coltura di tale linea cellulare, la cui propagazione avviene in adesione, prevedono l'utilizzo di DMEM con aggiunta di siero fetale bovino (10%; vol/vol) e penicillina-streptomicina (100X, 1%). Le cellule, mantenute in coltura in fiasche da 75cm², sono state seminate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 10⁵ cellule/pozzetto e dopo 48 h dalla semina sottoposte a trattamento con BEO (0,01-0,04%) o con le corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,018-0,036%).

3.3 Studi di citotossicità.

La combinazione di diverse tecniche sperimentali ha reso possibile l'analisi degli effetti del BEO sulla vitalità e proliferazione cellulare. In particolare, l'analisi citofluorimetrica mono e bi-parametrica, il test di esclusione del *Trypan blue* e il saggio di proliferazione cellulare MTT.

3.3.1 Analisi citofluorimetrica.

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. La possibilità di rilevare le informazioni provenienti dal-

la diffusione contemporaneamente a quelle di fluorescenza e potendo utilizzare allo stesso tempo più fluorocromi come, ad esempio, lo ioduro di propidio (PI), la fluoresceina isotiocianato (FITC) o la ficoeritrina (PE), permette l'acquisizione simultanea di diverse informazioni, per ogni cellula che attraversa il fascio di eccitazione.

Una delle peculiarità della citometria a flusso risiede nella velocità di misura ed acquisizione dei dati; infatti, essa consente l'analisi di un numero di cellule dell'ordine delle decine di migliaia al secondo.

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 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 3.1 (immagine ottenuta dal sito internet www.iscr.ed.ac.uk/FACS).

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 l'acronimo 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. 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.

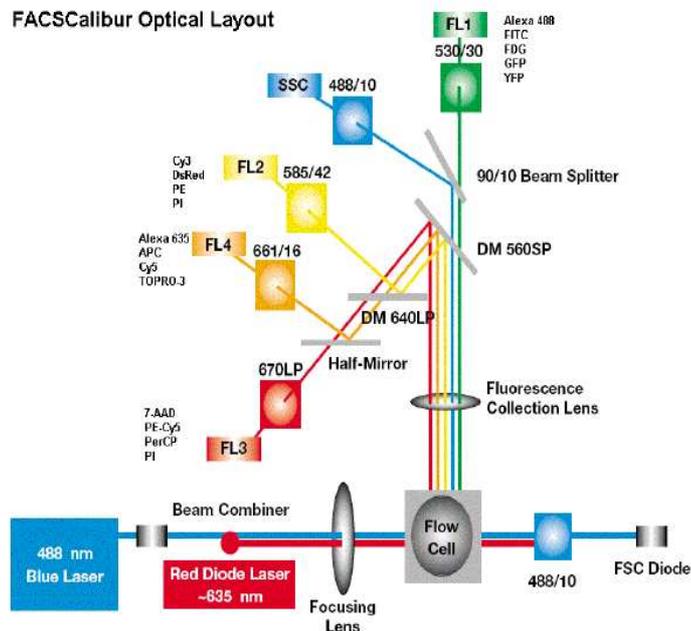


Fig 3.1) Rappresentazione del sistema ottico del FacsCalibur. Immagine ottenuta dal sito internet www.iscr.ed.ac.uk/FACS

Ciascuna radiazione emessa viene raccolta dal fotomoltiplicatore corrispondente e convertita in segnale analogico. Perpendicolarmente rispetto a FSC si trova il fotomoltiplicatore per il segnale SSC, acronimo di *Side Scatter*, che fornisce informazioni circa la complessità interna di ogni cellula (granulosità) e sul rapporto nucleo/citoplasma. Le informazioni che derivano dai dati di FSC e SSC risultano già sufficienti all'identificazione di subpopolazioni all'interno della sospensione in esame. 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 ricadono nella regione del verde dello spettro visibile (λ 500-550 nm), FL-2 rileva radiazioni comprese nella regione del giallo (λ 600 nm) ed FL-3 rileva radiazioni emesse nella regione del rosso (λ 600-650 nm).

3.3.1.1 Test di vitalità FDA/PI

Il test biparametrico FDA/PI, è un tipo di analisi che si effettua su sospensioni cellulari vitali. L'abilità delle cellule di escludere lo ioduro di propidio (PI), un colorante nucleare non permeabile, e di de-esterificare la fluoresceina diacetato (FDA) che entra liberamente nel compartimento citoplasmatico, è stata utilizzata per la valutazione della vitalità cellulare (Morris et al., 1994; Ross et al., 1989).

Il colorante FDA viene idrolizzato ad opera delle esterasi intracellulari in maniera proporzionale all'attività metabolica cellulare. La fluoresceina, prodotta dalla reazione di de-esterificazione, viene trattenuta all'interno delle cellule in funzione dell'integrità di membrana ed emette un'intensa fluorescenza, nelle cellule vitali (Rotman & Papermaster, 1966). Inoltre, grazie all'integrità della membrana cellulare, le cellule vitali escludono l'agente intercalante PI. Al contrario, le cellule necrotiche sono incapaci di escludere il PI a causa della compromessa integrità di membrana e non possono attivare la sonda FDA essendo metabolicamente inattive. Le cellule apoptotiche conservano l'integrità di membrana fino agli stadi più avanzati della morte cellulare e, pertanto, escludono il PI (Darzynkiewicz et al., 1992; Dive et al., 1992; Morris et al., 1994) e trattengono la fluoresceina; tuttavia, la capacità di metabolizzare l'FDA è notevolmente ridotta e, quindi, esse risultano meno fluorescenti delle cellule vitali (Frey, 1997; Ormerod et al., 1993).

Grazie alle proprietà sopra descritte, l'analisi citofluorimetrica permette di distinguere le cellule vitali, caratterizzate da un'intensa emissione di fluorescenza nel canale del verde (FL1-H) e una bassa emissione nel canale del rosso (FL2-H), dalle cellule necrotiche, caratterizzate un'intensa emissione di fluorescenza nel canale del rosso (FL2-H) e una debole

emissione nel canale del verde (FL1-H), e dalle cellule apoptotiche che manifestano una blanda emissione di fluorescenza sia nel canale del rosso (FL2-H) che del verde (FL1).

Tuttavia, è da tenere presente che negli stadi più avanzati dell'apoptosi l'integrità di membrana è comunque compromessa; pertanto, le cellule in tarda apoptosi possono essere distinte dalle cellule apoptotiche e vitali in base al grado di permeabilità al PI e dalle cellule necrotiche in base alla residua capacità di metabolizzare la sonda (Morris et al., 1994; Ross et al., 1989).

Dopo trattamento con il BEO (0,005-0,04%), o con il veicolo alle concentrazioni corrispondenti (etanolo 0,009-0,036%), le cellule sono state pellettate a 800 x g, al fine di allontanare il mezzo di coltura e risospese in una soluzione di colorazione contenente 2 µg/ml di PI e 0.1 µM di FDA in PBS. Le sospensioni cellulari ottenute sono state analizzate al citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, U.S.A.) per determinare la proporzione di cellule vitali (FDA⁺/PI⁻), apoptotiche (FDA⁻/PI⁻) e necrotiche (FDA⁻/PI⁺), attraverso l'analisi dei quadranti dei dot-plots FL1-H/FL2-H (Bartkowiak et al., 1999). L'analisi dei dati è stata condotta dopo l'acquisizione di 10,000 eventi/campione. I coloranti sono stati eccitati ad una lunghezza d'onda di 488 nm con un laser a ioni di Argon. L'emissione di fluorescenza è stata rilevata da fotomoltiplicatori con filtri per le lunghezze d'onda di 582/42 (PI) e 530/30 (FDA) nm. Per evitare la sovrapposizione degli spettri di emissione, è stata eseguita la compensazione dei due canali sottraendo da ciascuno la percentuale di fluorescenza aspecifica (FL2 - %FL1; FL1 - %FL2).

3.3.1.2 Analisi della granulosità (SSC) e delle dimensioni cellulari (FSC).

La morte cellulare è anche associata a cambiamenti nella capacità di diffrazione della luce incidente nei canali SSC/FSC (Bartkowiak et al., 1999), rilevabili al citofluorimetro. Durante l'apoptosi, la perdita di ioni dal compartimento citoplasmatico e l'efflusso di acqua determinano una riduzione del volume cellulare, che si riflette in una riduzione del parametro FSC e aumento della densità. Al contrario, la necrosi è caratterizzata da un iniziale rigonfiamento cellulare seguito da una riduzione del volume, causata dalla rottura della membrana extracellulare. Pertanto, come nel caso dell'apoptosi, anche alcuni stadi della necrosi possono essere caratterizzati dall'aumento della densità cellulare che si riflette nell'aumento della rifrazione della luce incidente a 90° (SSC) (Lizard et al., 1995).

La deviazione della luce in senso opposto (FSC) o a 90° (SSC) rispetto alla fonte di emissione fornisce informazioni circa le dimensioni cellulari e la complessità intracellulare. Queste sono state rilevate rispettivamente grazie a un detector di silice allo stato solido, con un filtro per la luce emessa a 488 nm in direzione opposta al fascio (FSC) e un fotomoltiplicatore (PMT) al quale la luce emessa a 90° rispetto alla fonte viene convogliata da uno *splitter* ad angolo di Brewster (SSC).

Dopo il trattamento per i tempi indicati, le linee cellulari in adesione sono state raccolte previa tripsinizzazione e, dopo opportuni lavaggi, risospese in 1 ml di terreno di coltura privo di *rosso fenolo* e sottoposte all'analisi morfologica. Per le cellule coltivate in adesione non è stato necessario l'utilizzo di tripsina. La velocità di acquisizione è stata limitata a 600 eventi/sec, al fine di ottimizzare la risoluzione. Sui *dot-plots* (FSS-H/SSC-H), ottenuti dall'analisi CellQuest, sono state delimitate tre aree (R1, R2, R3), caratterizzate da valori

progressivamente più alti di FSC-H, per la valutazione delle alterazioni morfologiche cellulari indotte dal trattamento con il BEO.

3.3.1.3 Analisi dell'ipodiploidia cellulare (sub-G_{0/1}).

Il principio dell'analisi si basa sulla capacità dello ioduro di propidio (PI) di intercalarsi tra le basi azotate del DNA, fenomeno reso possibile dalla preventiva permeabilizzazione della membrana cellulare. A tale scopo vengono frequentemente utilizzate basse concentrazioni di detergenti come il Triton X-100 o sostanze in grado di fissare e permeabilizzare contemporaneamente la membrana, come l'alcol etilico al 70%.

La fluorescenza emessa dal PI nel canale del rosso viene rilevata con il fotomoltiplicatore FL2 e rappresentata sull'istogramma di frequenza che riporta in ascissa l'intensità di fluorescenza emessa da ogni singolo evento, in scala lineare (FL2-H), e in ordinata il numero di eventi rilevati ad una ben precisa lunghezza d'onda (counts).

La fluorescenza emessa 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 valore di fluorescenza pari ad ½ rispetto alle cellule in fase G₂/M. Le cellule che attraversano la fase S presentano una fluorescenza equamente distribuita tra le cellule in fase G₀ e quelle in fase G₂. Durante la morte cellulare per apoptosi, specifiche endonucleasi possono mediare tagli intranucleosomali e produrre frammenti discreti di DNA; al contrario, un *pattern* disomogeneo di clivaggio si ottiene durante la necrosi, per attivazione di nucleasi aspecifiche (si veda Darzynkiewicz et al., 1997). La permeabilizzazione cellulare determina la perdita delle porzioni di DNA derivanti dalla frammentazione con formazione di una popolazione cellulare a ridotto contenu-

to in DNA, denominata Sub-G_{0/1}, rilevabile con l'analisi citofluorimetrica, in seguito a colorazione con il PI .

Dopo il trattamento con il BEO, per differenti intervalli di tempo, le cellule coltivate in adesione (SH-SY5Y, HS 605.Sk) sono state raccolte previa tripsinizzazione, lavate in PBS, centrifugate e fissate /permeabilizzate con una soluzione di etanolo freddo al 70% (v/v), per 24 h a -20°C. Dopo un lavaggio in PBS, per allontanare gli eccessi del fissativo, le cellule sono state risospese in una soluzione di colorazione contenente PI (20µg/ml), Triton X-100 (0,1%) e 0,17 mg/ml di RNasi-A. Le sospensioni cellulari sono state incubate per 20 min a temperatura ambiente e sotto costante agitazione, in condizioni di buio. L'analisi citofluorimetrica è stata condotta con l'utilizzo di un FACSCalibur (Becton Dickinson) e 30,000 eventi/campione sono stati acquisiti. Per l'analisi delle cellule in sospensione (K-562) è stato applicato il medesimo protocollo operativo, ad eccezione della tripsinizzazione. La percentuale degli eventi ipodiploidi (sub-G_{0/1}) presenti in ciascun campione è stata determinata con l'utilizzo del programma CellQuest (Becton Dickinson).

3.3.2 Test di esclusione del *Trypan Blue*.

Il colorante acido *Trypan blue* 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 esse non risultino danneggiate; quest'ultima condizione si verifica quando la cellula va incontro a morte cellulare per necrosi. La posi-

tività alla colorazione, osservata al microscopio ottico, permette di individuare, pertanto, la popolazione di cellule morte rispetto a quelle vitali che non risultano Trypan blue positive.

Le cellule SH-SY5Y sono state seminate in piastre a 6 pozzetti da 35 mm di diametro alla densità di 300×10^3 cellule per pozzetto. Dopo 24 ore il *medium* è stato rimosso e sostituito con terreno normale (controllo), con terreno contenente il BEO (0,01- 0,03%) o le corrispondenti concentrazioni di veicolo.

Dopo 24 ore di esposizione è stato valutato al microscopio ottico il numero di cellule vitali, negative alla colorazione con il trypan blue (0,4% peso/volume). In particolare, il mezzo di trattamento è stato prelevato da ogni pozzetto, 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 5' 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. Le cellule negative alla colorazione, quindi vitali, sono state contate e i dati sono stati espressi come media \pm errore standard del numero di cellule vitali in ciascun campione.

3.3.3 Saggio MTT

L'MTT, un sale organico di colore giallo, corrisponde chimicamente al bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio. Tale sostanza viene ridotta ad opera delle deidrogenasi mitocondriali, in presenza del cofattore NADH, dando luogo alla formazione di cristalli di formazano insolubili in mezzo acquoso (di colore viola porpora). Per la quantificazione dell'intensità della colorazione, i sali vengono successivamente solubilizzati con una soluzione a base di detergenti. 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 SH-SY5Y sono state seminate in piastre a 96 pozzetti, alla densità di 8×10^3 cellule per pozzetto; dopo 24 h il terreno di coltura è stato sostituito con mezzo fresco (controllo), o *medium* contenente il BEO (0,005-0,03%) o le corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,0045-0,027%), e le cellule incubate per 24 ore.

Trascorso il tempo d'incubazione, per evitare interferenze, la soluzione di trattamento contenente il BEO o il veicolo è stata rimossa prima dell'aggiunta dell'MTT (0,5 mg/ml). Le cellule sono state quindi incubate per 4 h a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. I cristalli di formazano sono stati portati in soluzione attraverso l'aggiunta di una soluzione di SDS al 10% in HCl (0.01 M), per circa 12 h.

Le cellule metabolicamente attive sono state quantificate mediante uno spettrofotometro per micropiastre (Multiscan MS, Labsystems, Helsinki, Finlandia), misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm (filtro di referenza: 690 nm).

I valori sono stati riportati come media \pm errore standard delle variazioni percentuali della densità ottica delle cellule trattate con il BEO o con il veicolo corrispondente, rispetto al controllo (cellule non trattate) posto uguale a 100.

3.4 Valutazione del potenziale di membrana ($\Delta\Psi_m$) e della morfologia dei mitocondri.

La valutazione della funzionalità dei mitocondri è resa possibile grazie all'impiego di sonde lipofile cationiche, quali la rodamina 123 e derivati. Queste molecole si concentrano, e vengono trattenute, nella matrice mitocondriale in funzione della differenza di potenziale

($\Delta\Psi_m$) e grazie alla carica negativa a ridosso della membrana mitocondriale interna (Smiley et al., 1991). Il TMRE (estere etilico della tetrametiletilrodamina) è stato uno dei primi derivati fluorescenti della rodamina 123 ad essere stato impiegato per la valutazione di $\Delta\Psi_m$, sfruttando tecniche di microscopia a fluorescenza (Loew et al., 1993).

Questo colorante viene eccitato alla lunghezza d'onda di 488 nm, emette a 580 nm ed esibisce un modesto legame alle proteine della membrana mitocondriale, indipendente dal potenziale.

Alcuni accorgimenti da adottare per la corretta applicazione della metodica consistono nella scelta della concentrazione della sonda e nell'ottimizzazione dei tempi di esposizione alla sorgente luminosa, al fine di evitare i fenomeni di decadimento del segnale (*spegnimento* o **quenching**; *photodecadimento* o **photobleaching**).

Cellule SH-SY5Y sono state seminate in piastre con fondo in vetro (Iwaki) alla densità di 3×10^4 cellule. Ventiquattro ore dopo la semina il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco (controllo), *medium* contenente il BEO (0,02%) o il veicolo (etanolo, 0.018%).

Successivamente, è stato aggiunto il TMRE (Molecular Probes) a partire da uno stock iniziale 50 mM in DMSO, per ottenere una concentrazione finale pari a 5 nM. Per la colorazione nucleare, allo stesso mezzo di coltura è stato aggiunto l'HOECHST 33342 impiegato alla concentrazione finale di 0.5 mg/ml. Le cellule sono state incubate per 10' a 37°C, in ambiente umidificato, protette dalla luce.

L'acquisizione delle immagini è stata condotta al microscopio confocale (Leica Microsystems Srl, Milano, Italia) dotato di un obiettivo ad immersione in mezzo oleoso, HCX PL

APO63x/1.4 (Leica Microsystems Srl). Le immagini finali sono state ottenute dalla sovrapposizione di 20-22 piani focali-z.

Oltre all'analisi in microscopia confocale, il potenziale di membrana mitocondriale è stato determinato mediante analisi citofluorimetrica. In questo caso, 300×10^3 cellule/campione sono state seminate e, dopo 24 h, sottoposte ad analisi citofluorimetrica. Le cellule SH-SY5Y, tripsinizzate e trasferite in tubi di polipropilene, sono state risospese in mezzo fresco (controllo) o *medium* contenente il BEO o il veicolo alle concentrazioni corrispondenti. Le soluzioni di trattamento sono state realizzate in terreno di coltura privo di rosso fenolo al quale è stata aggiunta la sonda TMRE alla concentrazione finale di 25 nM. Per l'analisi delle colture K-562 è stato applicato lo stesso protocollo operativo, ad eccezione della tripsinizzazione. Trascorso il tempo di incubazione, al buio a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, i campioni sono stati sottoposti ad analisi citofluorimetrica.

La fluorescenza emessa dal TMRE nel canale del rosso è stata rilevata dal fotomoltiplicatore FL2 e rappresentata in scala logaritmica. I *dot-plots* FSC/SSC sono stati utilizzati per escludere dall'analisi i detriti e gli aggregati cellulari, eventualmente presenti nei campioni esaminati. Per l'analisi sono stati acquisiti 10,000 eventi/campione e i dati elaborati con l'utilizzo del programma CellQuest (Becton Dickinson).

In entrambe le tecniche utilizzate, il disaccoppiante mitocondriale carbonil-cianuro fluorometilidrazone (CCCP; Sigma-Aldrich) è stato utilizzato come controllo positivo della metodica.

3.5 Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata determinata mediante analisi spettrofotofluorimetrica impiegando come sonda la 2', 7'-diclorodidrofluoresceina-

diacetato (H₂DCF-DA), come precedentemente descritto (Corasaniti et al., 2007). La H₂DCF-DA è una molecola lipofila che diffonde facilmente attraverso le membrane cellulari; una volta all'interno del citosol viene de-acetilata, ad opera delle esterasi intracellulari, a 2',7'-diclorodidrossifluoresceina (H₂DCF). In questa forma la molecola diviene polare e rimane intrappolata nella cellula. I ROS intracellulari ossidano l'H₂DCF trasformandola nella molecola 2',7'-diclorofluoresceina (DCF) la quale, opportunamente eccitata ($\lambda = 485$ nm), emette in fluorescenza ($\lambda = 535$ nm).

Le cellule SH-SY5Y sono state seminate alla densità di 50×10^3 cellule per pozzetto, in piastre nere a fondo trasparente, da 96 pozzetti. Dopo 24 h, il *medium* è stato rimosso e le cellule incubate in tampone KHB (Krebs Henseleit buffer; NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosio 11 mM, pH 7.4) contenente H₂DCFDA (20 μ m) e probenecid (2.5 mM) per 30 minuti a 37 °C al buio. Quindi, le cellule sono state lavate per eliminare l' H₂DCFDA extracellulare ed incubate in tampone KHB normale (cellule controllo) o tampone KHB contenente BEO (0.005-0.03%) o veicolo (etanolo, 0.0045-0.027%).

La fluorescenza emessa è stata monitorata ogni 5 min per 1h, dopo l'esposizione al BEO, utilizzando uno spettrofotofluorimetro per micropiastre (Victor² multilabel counter, Perkin-Elmer Life Sciences; eccitazione:495 nm, emissione: 530 nm).

I risultati sono stati espressi come media \pm errore standard dell'area sotto la curva (ASC) della fluorescenza emessa in funzione del tempo, da 0 a 60 min (ASC_{0-60 min}), di tre esperimenti indipendenti ognuno dei quali condotto impiegando 4-8 pozzetti per gruppo sperimentale.

Come controllo positivo della metodica è stato utilizzato il perossido di idrogeno (H_2O_2 , 100 μM).

3.6 Analisi in microscopia a fluorescenza delle proteine del citoscheletro.

Le cellule SH-SY5Y sono state seminate su vetrini per immunocitochimica (LabTek Chamber slides, Nunc) alla densità di 3×10^4 cellule, per l'analisi delle proteine del citoscheletro. Dopo 24 h il mezzo di coltura è stato sostituito con mezzo fresco contenente il BEO (0,02-0,03%) o la più alta concentrazione di veicolo (etanolo 0,027%). Dopo 1 h di esposizione, il mezzo è stato rimosso e le cellule fissate con paraformaldeide al 4% per 10 min e successivamente permeabilizzate con Triton X-100 0,1% in PBS. In seguito, le cellule sono state incubate per 20 min in PBS contenente albumina serica bovina (BSA, 0,1%), per bloccare i siti aspecifici di legame, quindi, incubate per 30 min a temperatura ambiente con un anticorpo primario monoclonale di topo anti α -tubulina (1:2000; clone B-5-1-2, Sigma). Quindi, dopo opportuni lavaggi, le cellule sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato ad Alexa-Fluor[®] 594 (Molecular Probes; diluizione: 1:400) e con falloidina coniugata ad Alexa Fluor[®] 488, al 2% (Molecular Probes), per la marcatura dei filamenti di (F)-actina. Dopo colorazione dei nuclei con DAPI, i vetrini sono stati ricoperti con vetrini coprioggetto e le immagini acquisite con un microscopio a fluorescenza (Nikon Optiphot-2; Nikon Instruments) utilizzando un obiettivo 40x (Nikon Instruments).

3.7 Preparazione dei lisati cellulari.

Per l'analisi western-blot della caspasi 3 è stato utilizzato un tampone di lisi (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1%, Igepal CA 630 1%, sodio deossicolato 0,5%) contenente un cocktail di inibitori delle proteasi (codice P8340, Sigma-Aldrich).

Per studiare la fosforilazione della chinasi Akt, i lisati cellulari sono stati preparati come precedentemente descritto (Corasaniti et al., 2007), utilizzando un tampone di lisi non denaturante a basso contenuto di detergenti (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, Triton X-100 1%, acido okadaico 1 nM) contenente un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich) ed uno di inibitori delle fosfatasi (codice 524625, Calbiochem). I lisati sono stati centrifugati per 15 min alla velocità di 20,000 x g a 4°C.

Per incrementare l'efficienza dell'estrazione proteica è stato utilizzato un tampone di estrazione arricchito di detergenti anionici (Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, Triton X-100 1%, SDS 0.2%, sodio deossicolato 0.5%, MgCl₂ 20 mM, NaCl 450 mM, cocktail di inibitori delle proteasi). I lisati sono stati incubati per 10 min in ghiaccio e, quindi, centrifugati per 30 min a 4 °C a 40,000 x g. Il contenuto proteico nei surnatanti dei lisati cellulari è stato determinato utilizzando il metodo Bio Rad DC, che si basa sulla reazione delle proteine con una soluzione alcalina di tartrato di rame (reagente A) e con il reagente di Folin (reagente B), impiegando soluzioni a concentrazione nota di albumina serica bovina (BSA) per la preparazione della curva standard. La lettura è stata effettuata a 690 nm impiegando uno spettrofotometro per micropiastre (Multiskan MS, Labsystems, Helsinki, Finlandia).

3.8 Analisi Western blot.

L'elettroforesi su gel di poliacrilammide, in condizioni denaturanti e riducenti, è uno dei metodi maggiormente impiegati per l'analisi qualitativa/quantitativa di miscele di proteine; essa, infatti, permette la loro separazione in base al peso molecolare ed il loro riconoscimento mediante l'uso di anticorpi specifici.

Dopo 24 h dalla semina, le cellule SH-SY5Y sono state trattate con il BEO (0,01-0,03%) o con le corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,009-0,027%) per 30 min o 1h. Allo scadere del tempo di trattamento le cellule sono state raccolte e i lisati cellulari realizzati come precedentemente descritto.

Le proteine (20 µg) sono state caricate in gel di SDS-poliacrilammide, sottoposte a corsa elettroforetica ed elettrotrasferite su membrane di polivinil-fluoruro (PVDF, Immobilon-P, Sigma-Aldrich). Le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari per tutta la notte a 4°C, quindi, incubate per 1 h a temperatura ambiente con anticorpi secondari coniugati a perossidasi di rafano (HRP).

L'immunoreattività è stata visualizzata in chemiluminescenza (ECL, Amersham Biosciences, GE Healthcare). Il principio su cui si base tale tecnica è che, in presenza di acqua ossigenata, la perossidasi coniugata agli anticorpi secondari ossida il luminolo, un substrato chemiluminescente, con contemporanea produzione di luce. Il segnale luminoso emesso è stato rilevato esponendo la membrana ad una lastra autoradiografica (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). Le lastre impressionate sono state scansionate e sottoposte ad analisi densitometrica condotta utilizzando il programma Quantiscan (Biosoft, Cambridge, UK).

Alcuni degli anticorpi primari utilizzati nel presente studio sono stati ottenuti da Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) ed impiegati alla diluizione 1:1000; in particolare, un anticorpo policlonale di coniglio specifico per la caspasi 3 capace di riconoscere anche i frammenti di clivaggio, un anticorpo policlonale di coniglio specifico per la forma non clivata e in grado di riconoscere i frammenti di clivaggio di PARP, un anticorpo policlonale di coniglio specifico per Akt e un anticorpo policlonale di coniglio in grado di riconoscere la forma fosforilata della chinasi Akt (p-Akt, Ser473).

Per studiare l'espressione di actina, tubulina e gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) sono stati impiegati, rispettivamente: un anticorpo monoclonale di topo (clone AC-40; Sigma-Aldrich), diluito 1:2000, un anticorpo monoclonale di topo (clone B-5-1-2; Sigma-Aldrich), diluito 1:40,000, ed un anticorpo monoclonale di topo (clone 6C5; Applied Biosystems, CA, USA) diluito 1:20,000.

Come anticorpi secondari sono state utilizzate immunoglobuline di capra coniugate con perossidasi di rafano e dirette contro immunoglobuline di topo o di coniglio (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)

3.9 Analisi statistica dei dati.

I dati sono espressi come media \pm errore standard del numero di esperimenti indicato. L'analisi statistica dei dati è stata condotta mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple. Il test del 't' di Student è stato utilizzato per valutare la differenza tra due medie. Un valore di P minore di 0.05 è stato considerato significativo.

4. Risultati

4.1 Riduzione della vitalità cellulare e alterazioni delle caratteristiche morfologiche indotte dal BEO in colture di neuroblastoma umano, SH-SY5Y.

Per valutare gli effetti indotti dal BEO sulla proliferazione cellulare è stato utilizzato il saggio colorimetrico MTT. Dopo 24 h di incubazione con il fitocomplesso (0.005-0.03%), le colture SH-SY5Y trattate con il BEO 0,02-0,03% manifestano una ridotta capacità di metabolizzare la sonda, rispetto alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,018-0,027%); l'effetto osservato è concentrazione-dipendente e risulta statisticamente significativo ($P < 0.05$ e $P < 0.001$, rispettivamente) (Fig. 4.1a). Concentrazioni inferiori di BEO (0,005-0,01%) ed il veicolo (etanolo 0,0045-0,027%) non modificano la vitalità cellulare (Fig. 4.1a).

In accordo con queste osservazioni, il test del *trypan bleu* ha evidenziato una significativa riduzione ($P < 0.05$ e $P < 0.001$, rispettivamente) del numero di cellule vitali, capaci di escludere il colorante, dopo 24 h di esposizione al BEO 0,02-0,03%, rispetto alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,018-0,027%). Nessuna variazione del numero di cellule vitali si osserva dopo esposizione al BEO 0,01%, rispetto al veicolo corrispondente (etanolo 0,009) (Fig. 4.1b).

Gli effetti citotossici del BEO sono stati anche confermati mediante analisi del profilo del DNA di colture SH-SY5Y trattate con il fitocomplesso (0,005-0,03%) e le concentrazioni corrispondenti di veicolo (etanolo 0,0045-0,027%).

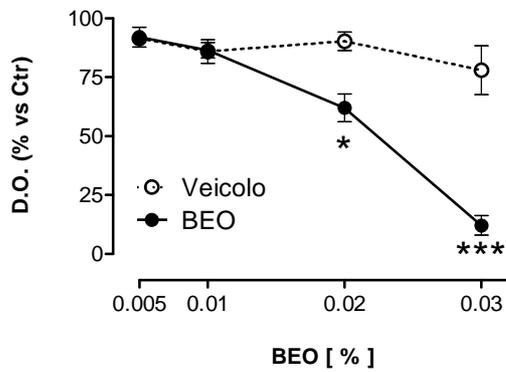
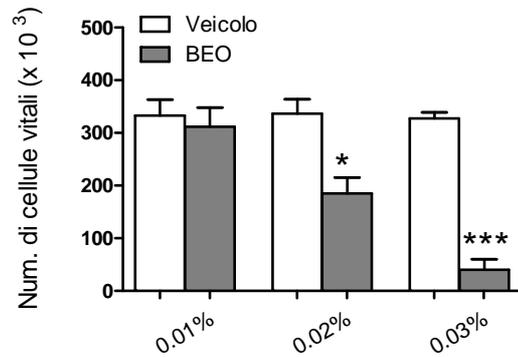
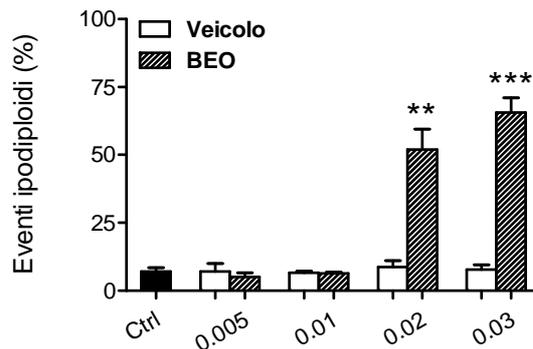
A**B****C**

Fig 4.1) L'esposizione di 24 h delle colture SH-SY5Y al BEO induce una riduzione concentrazione-dipendente del numero di cellule vitali associata ad ipodiploidia. **A)** Analisi dell'attività metabolica cellulare determinata con il saggio colorimetrico MTT dopo 24 h di esposizione al BEO (0,005-0,03%). I valori di densità ottica (D.O.) riportati, per il BEO (0,005-0,03%) e il veicolo corrispondente (etanolo 0,0045-0,027%), sono espressi come percentuale rispetto al controllo. Tali valori derivano dalla media \pm errore standard dell'assorbanza misurata in 3 esperimenti indipendenti in cui ogni concentrazione di BEO e di veicolo è stata utilizzata in ottuplicato. **B)** Analisi del numero di cellule vitali determinato al microscopio ottico dopo colorazione con trypan blue. L'istogramma riporta le variazioni del numero di cellule vitali in colture trattate con BEO (0,01-0,03%) rispetto al veicolo corrispondente (0,009-0,027%), di 3 esperimenti indipendenti. * e *** denotano, rispettivamente, $P < 0.05$ e $P < 0.001$ rispetto al veicolo (test t di Student). **C)** Analisi della percentuale di eventi ipodiploidi indotti in colture SH-SY5Y dall'esposizione di 24 h al BEO (0,005-0,03%) e alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,0045-0,027%). I dati rappresentano la me-

*dia ± errore standard dei risultati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. ** e*** indicano $P < 0.01$ e $P < 0.001$ rispetto al veicolo (test t di Student).*

Dopo 24 h di incubazione, le cellule sono state fissate, permeabilizzate, colorate con ioduro di propidio (PI) ed analizzate al citofluorimetro. Come riportato in figura 4.1c, rispetto alle colture controllo e quelle trattate con il veicolo (etanolo 0,018-0,027%), il BEO (0,02-0,03%) induce un aumento statisticamente significativo ($P < 0.01$ e $P < 0.001$, rispettivamente) dell'ipodiploidia. Concentrazioni inferiori di BEO (0,005-0,01%) non inducono alcun aumento dell'ipodiploidia, rispetto alle colture controllo ed alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (fig. 4.1c).

L'analisi biparametrica FDA/PI, al citofluorimetro, ha consentito di approfondire l'analisi del profilo tossicologico del BEO in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y. Gli istogrammi in figura 4.2b, riportano i dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti. In seguito a 24 h di esposizione al BEO 0,02-0,03% è emersa una riduzione della percentuale di cellule vitali (Fig. 4.2) che risulta concentrazione-dipendente e non si osserva nelle colture esposte al solo veicolo (etanolo 0,018-0,027%) o a concentrazioni inferiori dell'olio (0,005-0,01%).

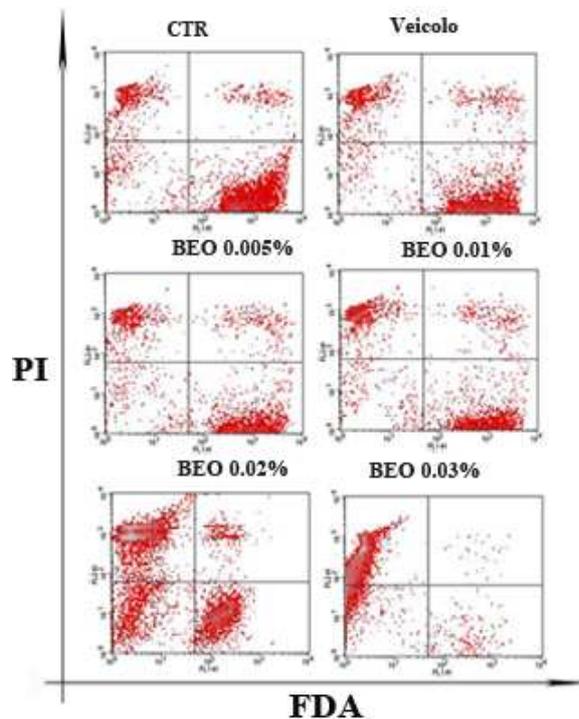
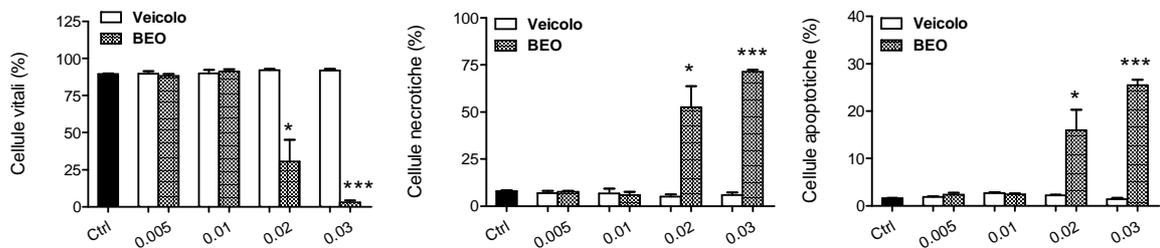
A**B**

Fig 4.2) La riduzione della vitalità cellulare indotta da esposizione per 24 h al BEO è associata ad aumento della percentuale di cellule necrotiche e apoptotiche, in culture SH-SY5Y. **A)** Dot-plots rappresentativi ottenuti dall'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare (FDA/PI) di culture SH-SY5Y esposte al BEO (0,005-0,03%) per 24 h. Il programma cellQuest è stato utilizzato per la quantificazione delle cellule apoptotiche (quadrante in basso a sinistra), necrotiche (quadrante in alto a sinistra) e vitali (quadrante in basso a destra), dopo l'acquisizione di 10,000 eventi/campione. (Veicolo: etanolo 0,027%). **B)** Analisi statistica dei dati ottenuti. Gli istogrammi riportano le percentuali di cellule vitali, necrotiche e apoptotiche determinate mediante analisi citofluorimetrica in culture SH-SY5Y esposte per 24 h al BEO (0,005-0,03%) e alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,0045- 0,027%). I dati sono riportati come media \pm errore

standard dei valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. * e*** indicano $P < 0.05$ e $P < 0.001$ rispetto al veicolo (test *t* di Student).

La riduzione della vitalità cellulare indotta da incubazione per 24 h delle colture SH-SY5Y con il fitocomplesso alle concentrazioni 0,02-0,03% si associa ad un aumento significativo della percentuale di cellule necrotiche ed apoptotiche. Le concentrazioni più basse di BEO (0,005-0,01%), così come le concentrazioni di etanolo testate (0,0045-0,027%), non risultano tossiche e non inducono alcuna variazione in termini di vitalità, necrosi e apoptosi, rispetto alle colture controllo (Fig. 4.2).

Caratteristiche tipiche della morte cellulare sono state osservate anche dopo brevi periodi (1 h) di incubazione con il fitocomplesso.

In figura 4.3, sono riportati tipici diagrammi dell'analisi dell'ipodiploidia cellulare. La distribuzione dei picchi sull'asse delle x consente di individuare cellule diploidi ($2n$) corrispondenti alla fase $G_{0/1}$ del ciclo cellulare, cellule in fase $G_{2/M}$ con un contenuto doppio di DNA e una popolazione intermedia corrispondente alle cellule in fase S, nonché popolazioni con un contenuto ridotto di DNA (ipodiploidi).

L'analisi del profilo del DNA in colture SH-SY5Y trattate per 1 h con il BEO (0,02-0,03%), ha evidenziato un marcato aumento della popolazione ipodiploide (sub- G_1), indice di un'aumentata frammentazione del DNA, rispetto alla popolazione controllo. Nessun effetto sull'ipodiploidia è stato osservato in colture trattate con l'etanolo alla 0,027% corrispondente a quella presente nel BEO 0,03% (fig. 4.3).

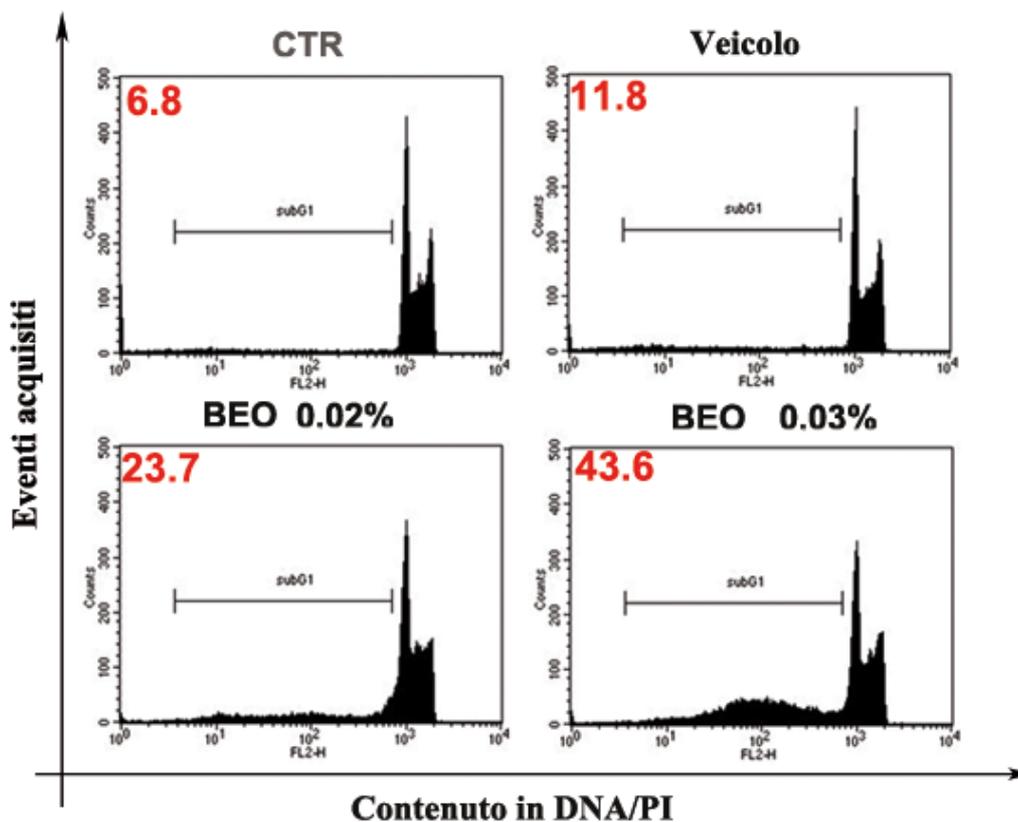
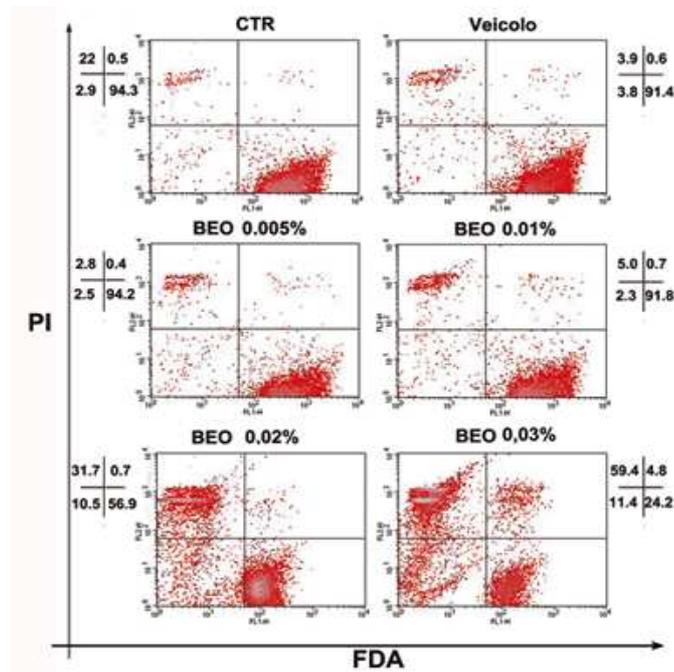


Fig. 4.3) Il BEO induce una rapida frammentazione del DNA in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. Istogrammi della frequenza di distribuzione del DNA di colture SH-SY5Y dopo 1 h di incubazione con il BEO (0,02-0,03%) o il veicolo (etanolo 0,027%). I pannelli sono stati ottenuti dall'analisi citofluorimetrica di cellule (fissate/permeabilizzate in etanolo) colorate con ioduro di propidio (PI). In ciascun istogramma è indicata (in rosso) la percentuale di eventi con ridotto contenuto in DNA ($subG_1$), corrispondente ad una popolazione ipodiploide ($<2n$) rilevata in 30,000 eventi/campione. I dati riportati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

L'analisi biparametrica FDA/PI, ha permesso di rilevare che l'incubazione di cellule SH-SY5Y con concentrazioni di BEO pari a 0,02-0,03%, per 1 h, determina una riduzione statisticamente significativa ($P < 0.05$ e $P < 0.001$, rispettivamente) della percentuale di cellule vitali; l'effetto è accompagnato da un aumento della percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche, rispetto alle colture controllo o trattate con il solo veicolo (etanolo 0,018-0,027%) (Fig.4,4b). In figura 4.4a è rappresentata la suddivisione in quadranti dei *dot-plots* FL1-H/FL2-H ottenuti al citofluorimetro. L'analisi dei quadranti permette di distinguere le cellule vitali (in basso a destra, FDA⁺/PI⁻) da quelle apoptotiche (in basso a sinistra, FDA⁻/PI⁻) e necrotiche (in alto a sinistra, FDA⁻/PI⁺). Come rilevabile dai *dot-plots* rappresentativi riportati in figura 4.4a, già dopo 1 h di esposizione al BEO (0,02-0,03%) si osserva un aumento della morte cellulare per apoptosi e per necrosi, mentre non sono rilevabili alterazioni della vitalità cellulare quando il BEO è impiegato a concentrazioni inferiori (0,005-0,01%).

A



B

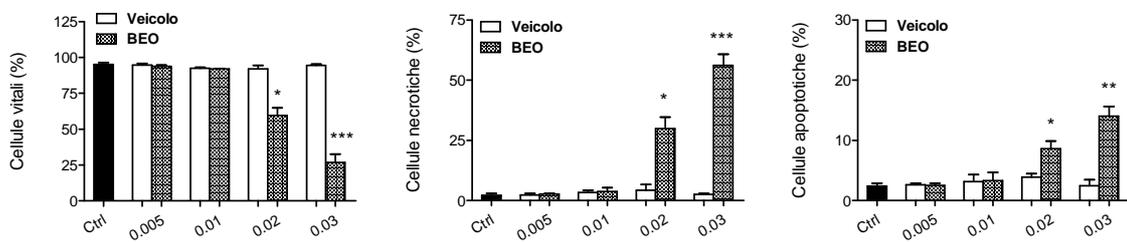
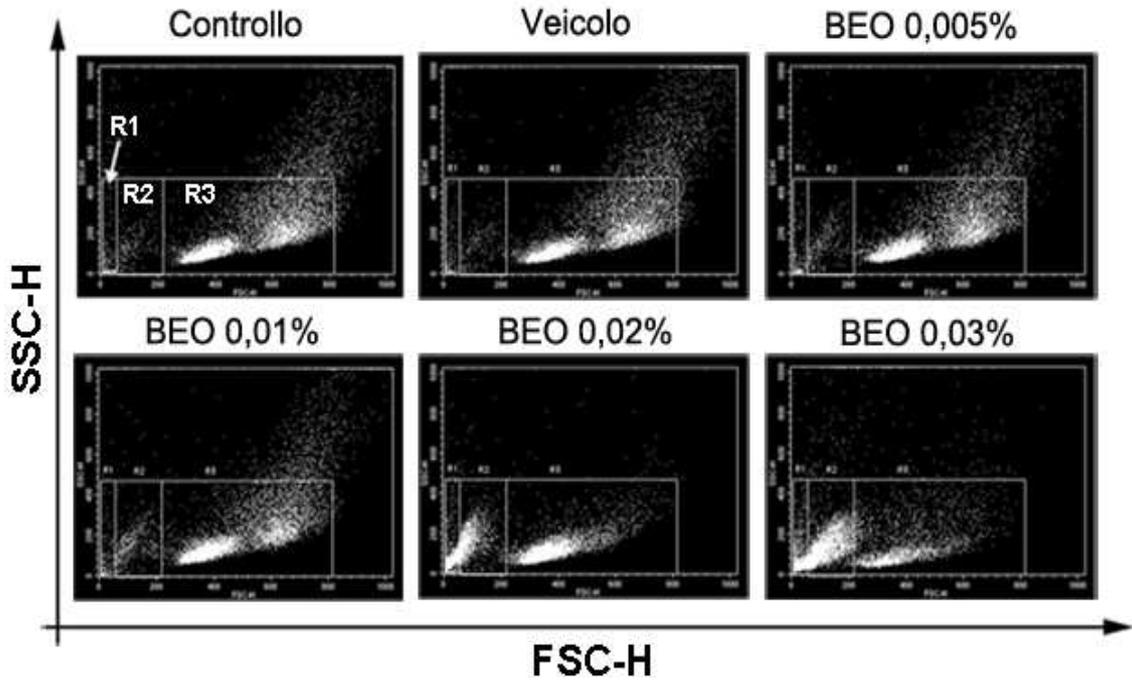


Fig. 4.4) L'esposizione al BEO per 1 h riduce la vitalità cellulare ed aumenta la percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche, in colture SH-SY5Y. A) Dot-plots rappresentativi ottenuti dall'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare (FDA/PI) di colture SH-SY5Y esposte al BEO (0,005-0,03%) per 1 h. Il programma cellQuest è stato utilizzato per la quantificazione delle cellule apoptotiche (quadrante in basso a sinistra), necrotiche (quadrante in alto a sinistra) e vitali (quadrante in basso a destra), dopo l'acquisizione di 10,000 eventi/campione. (Veicolo: etanolo 0,027%) B) Analisi statistica dei dati ottenuti. L'esposizione di colture SH-SY5Y al BEO (0,02-0,03%) per 1 h causa un aumento significativo della percentuale di cellule necrotiche e apoptotiche ed una riduzione statisticamente significativa della percentuale di cellule vitali, rispetto alle colture trattate con il veicolo (etanolo 0,0045-0,027%). L'effetto osservato è concentrazione-dipendente. I valori riportati negli istogrammi ed espressi come percentuale degli eventi acquisiti (10,000 eventi/campione), corrispondono alla media \pm errore standard dei dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. *, ** e * denotano, rispettivamente, $P < 0.05$, $P < 0.01$ e $P < 0.001$, rispetto al veicolo (test t di Student).**

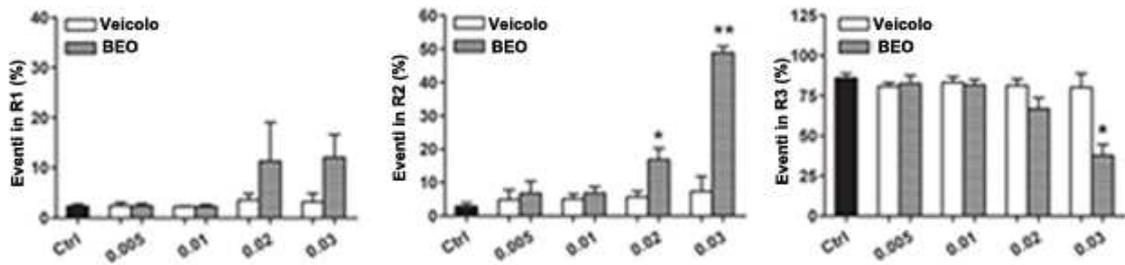
Dalle analisi condotte è emerso che gli effetti citotossici si osservano già dopo 1 h di esposizione al BEO 0,02-0,03%, mentre concentrazioni inferiori del fitocomplesso (0,005-0,01%) non determinano alcuna variazione dei parametri studiati, né rispetto alle colture controllo né a quelle trattate con corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,009-0,018%) sia dopo 1 h che dopo 24 h di esposizione. Al contrario, estendendo il tempo di incubazione a 24 h, il BEO 0,02 e 0,03% induce una più drastica riduzione della vitalità cellulare; pertanto, l'effetto citotossico del BEO risulta concentrazione- e tempo-dipendente.

Alcune alterazioni della morfologia cellulare, come il raggrinzimento o il rigonfiamento, sono associate alla morte cellulare e determinano cambiamenti della capacità di diffrazione della luce incidente che possono essere rilevati con l'analisi citofluorimetrica. Le ridotte dimensioni o l'aumentata granulosità cellulare si traducono, rispettivamente, in una ridotta capacità di diffrazione della luce incidente in direzione opposta al fascio di luce emesso (FSC) e nell'aumento della deviazione della luce con un angolo di 90° rispetto alla fonte (SSC) (si veda Darzynkiewicz et al., 1997).

A



B



C

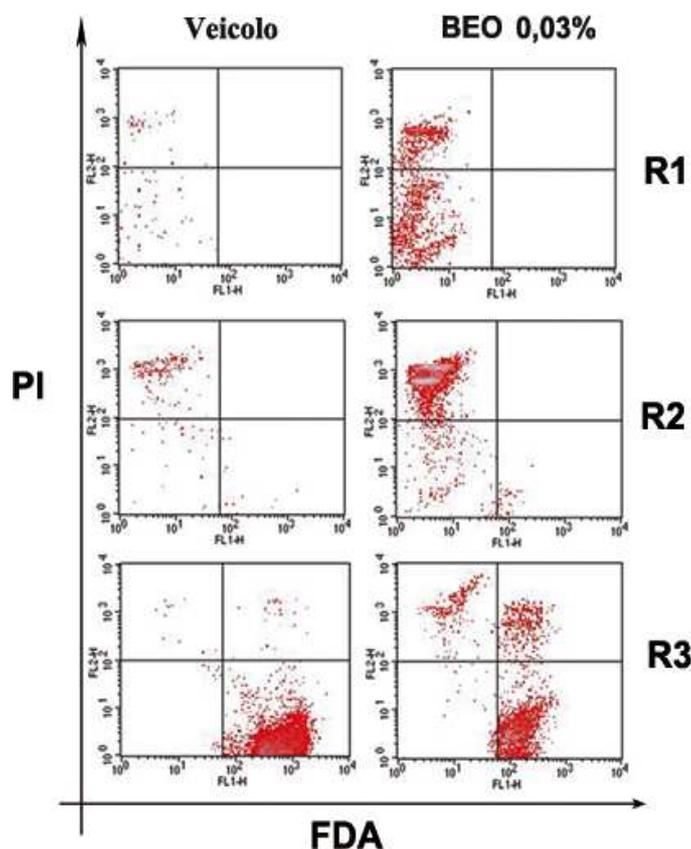


Fig. 4.5) Il BEO induce raggrinzimento cellulare in colture SH-SY5Y. Le cellule che presentano dimensioni ridotte (R1, R2) sono in parte apoptotiche e in parte necrotiche. A) Dot-plots FSC/SSC della distribuzione cellulare in base alle proprietà di diffrazione della luce incidente. Tre aree (R1, R2, R3) sono state delimitate sui dot-plots FSC/SSC per la valutazione delle alterazioni morfologiche. L'incubazione con il BEO (0,02-0,03%) per 1 h induce, in colture SH-SY5Y, una redistribuzione concentrazione-dipendente della popolazione principale dalla regione R3 alle regioni R1 ed R2, caratterizzate da minori valori di FSC. B) Analisi statistica della distribuzione cellulare nelle regioni R1, R2 e R3. I dati riportati corrispondono alla media \pm errore standard degli eventi localizzati in R1, R2 e R3, espressi come percentuale rispetto agli eventi acquisiti (10,000 eventi/campione) in 3 esperimenti indipendenti. * e ** denotano rispettivamente $P < 0.05$ e $P < 0.01$, rispetto al veicolo (test t di Student). C) Colture SH-SY5Y esposte per 1 h al veicolo (etanolo 0,027%) o al BEO (0,03%) sono state colorate con FDA/PI ed analizzate al citofluorimetro per individuare le sub-popolazioni vitali, apoptotiche e necrotiche nell'ambito delle regioni R1, R2 e R3. Dopo trattamento con BEO le cellule localizzate nell'area R2 risultano prevalentemente necrotiche, mentre quelle localizzate nella regione R1, con più basso FSC/SSC, presentano principalmente le caratteristiche dell'apoptosi.

Dall'analisi della distribuzione cellulare nei *dot-plots* FSC/SSC (Fig. 4.5a) è emerso che circa l'86% degli eventi acquisiti da colture SH-SY5Y controllo è localizzata all'interno di un'area denominata R3 in Figura, mentre circa il 3% e il 2.4% sono localizzati nelle regioni R2 ed R1, rispettivamente. Il BEO impiegato a concentrazioni citotossiche (0,02-0,03%) determina una riduzione concentrazione-dipendente delle dimensioni cellulari (Fig.4.5a, b), dopo 1 h di esposizione. Infatti, solo circa il 67% di eventi è localizzato nella regione R3, dopo il trattamento con BEO 0,02%, mentre la percentuale scende al 38% dopo trattamento con BEO 0,03%, variazione che risulta statisticamente significativa ($P < 0.05\%$). La riduzione degli eventi localizzati nella regione R3, dopo trattamento con il BEO (0,02-0,03%), è accompagnata da un aumento significativo di eventi nelle regioni R2 ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, rispettivamente), a ridotto FSC, e dall'aumento della percentuale di eventi nella regione R1, in cui anche la granulosità (SSC) è ridotta. Il veicolo (etanolo 0,0045-0,027%) e le concentrazioni inferiori di BEO (0,005-0,01%) non determinano variazioni delle caratteristiche morfologiche, rispetto alle colture controllo (Fig.4.5a, b).

Combinando l'analisi morfologica con il test di vitalità cellulare, FDA/PI, è stato possibile approfondire l'analisi quali-quantitativa delle popolazioni cellulari trattate con il BEO, rispetto al veicolo (Fig. 4.5c).

È stato così osservato che, dopo 1 h di esposizione al BEO (0,03%), gli eventi localizzati nella regione R3 del *dot-plot* FSC/SSC presentano una distribuzione eterogenea nel *dot-plot* FL1/FL2 rispetto alle colture trattate con il veicolo (etanolo 0,027%), in cui la popolazione cellulare localizzata in R3 presenta una distribuzione circoscritta al quadrante in basso a destra (cellule vitali, FDA⁺/PI).

Da questo tipo di analisi si evince, inoltre, che in colture SH-SY5Y sottoposte ad 1 h di trattamento con BEO (0,03%), gli eventi che dall'analisi morfologica sono compresi nella regione R2 presentano le caratteristiche della necrosi, con bassa emissione nel canale del verde ed elevata fluorescenza nel rosso; mentre, le cellule localizzate in R1 risultando in parte apoptotiche ed in parte necrotiche (Fig. 4.5c). Nelle colture trattate con il veicolo solo una bassa percentuale di eventi è localizzata in R1 e R2 (Fig. 4.5c).

Le rapide modificazioni del fenotipo cellulare indotte dal trattamento con il BEO (0,02-0,03%) per 1 h, includono una serie di alterazioni delle proteine del citoscheletro apprezzate analizzando l'actina e la tubulina in microscopia a fluorescenza. Tali alterazioni sono state osservate, in colture SH-SY5Y, dopo 1 h di esposizione al BEO 0,02-0,03%, rispetto alle colture trattate con il veicolo (etanolo 0,027%). Come mostrato in figura 4.6 (freccie in bianco), la struttura del citoscheletro perde la sua fine organizzazione e l'effetto è maggiormente evidente in cellule ad uno stadio più avanzato di condensazione nucleare (fig. 4.6, freccie in giallo). La perdita di immunoreattività per la tubulina suggerisce che la struttura dei microtubuli sia quella maggiormente compromessa nelle cellule trattate con BEO 0,03%.

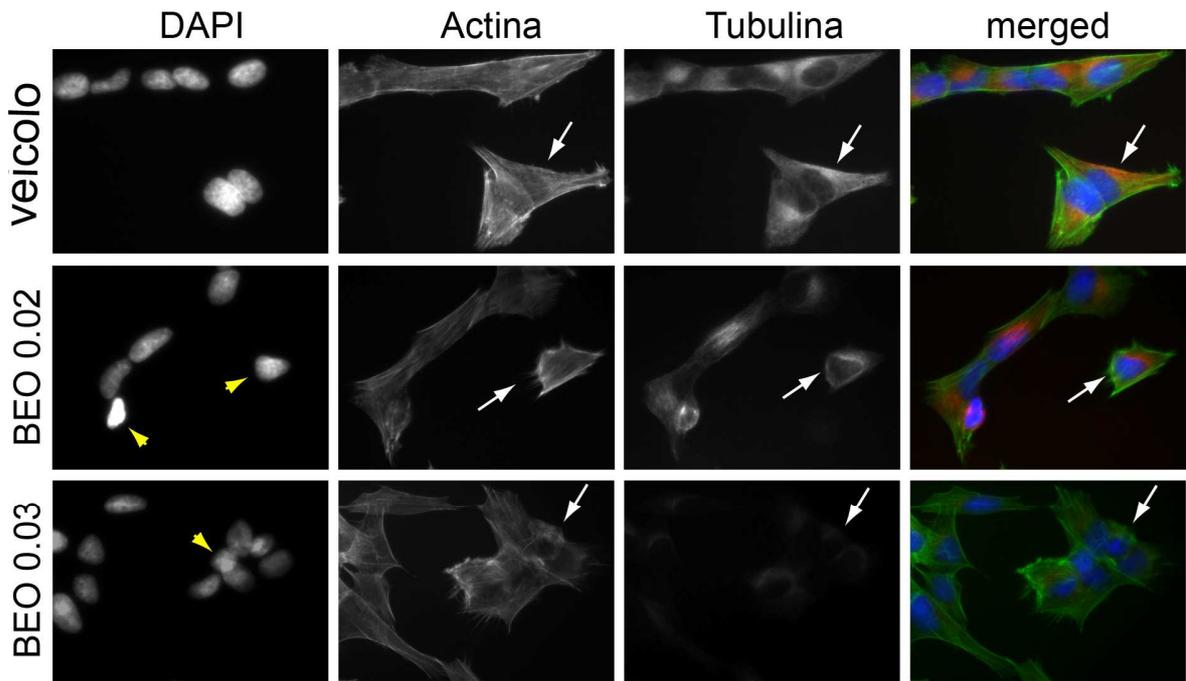


Fig. 4.6) Il BEO induce rapide alterazioni delle proteine del citoscheletro, in colture SH-SY5Y. Colture SH-SY5Y sono state trattate per 1 h con il BEO (0,02-0,03%) o con il veicolo presente nella più elevata concentrazione di BEO utilizzata (etanolo 0,027%) e sottoposte ad analisi in microscopia a fluorescenza delle proteine del citoscheletro (actina in verde, tubulina in rosso). I nuclei sono stati marcati con il colorante DAPI. Si osserva la presenza di formazioni circolari altamente fluorescenti immunopositive alla tubulina intorno a nuclei condensati in cellule trattate con il BEO 0,02% (freccie in bianco). L'immunoreattività dell' α -tubulina nelle colture trattate con il BEO 0,03% risulta ridotta rispetto alle cellule trattate con il veicolo (etanolo 0,027%). Le frecce in giallo indicano i nuclei condensati. Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza (Optiphot-2; Nikon), utilizzando un obiettivo 40X.

4.2 Il trattamento con BEO induce alterazioni della morfologia e del potenziale mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) in colture di neuroblastoma umano, SH-SY5Y.

L'applicazione di tecniche citofluorimetriche e di microscopia confocale ha permesso di stabilire che alterazioni della morfologia e del potenziale di membrana mitocondriale precedono l'ipodiploidia, il raggrinzimento cellulare e la riduzione della vitalità indotti dal BEO nelle colture SH-SY5Y.

Il principio dell'analisi impiegata si basa sulla capacità del colorante lipofilo cationico TMRE di concentrarsi all'interno dei mitocondri in funzione del potenziale mitocondriale transmembrana ($\Delta\Psi_m$) (Loew et al., 1993). La perdita del gradiente elettrochimico determina una riduzione della fluorescenza, a causa della ridotta capacità dei mitocondri di trattenere la sonda, come accade con l'impiego del disaccoppiante CCCP, utilizzato come controllo positivo della metodica, sia negli esperimenti al confocale che in quelli realizzati al citofluorimetro.

Come mostrato in figura 4.7a, dove sono riportate le immagini relative all'analisi in microscopia confocale, le colture SH-SY5Y controllo presentano mitocondri allungati e distribuiti attorno al perimetro nucleare come lungo le proiezioni cellulari.

In cellule trattate con il veicolo (etanolo 0,018%), i mitocondri presentano una distribuzione meno uniforme ma non mostrano alterazioni apprezzabili del potenziale di membrana come indicato dalla loro capacità di trattenere la sonda.

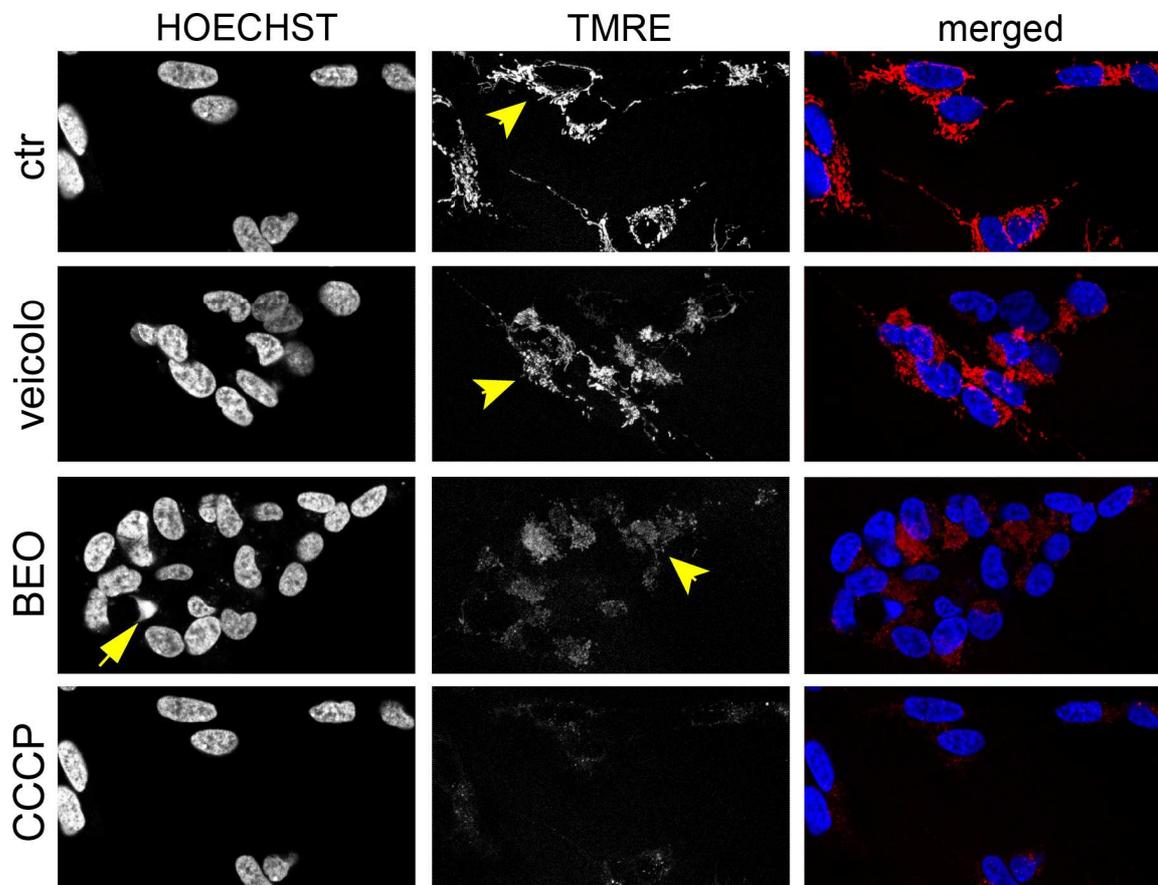
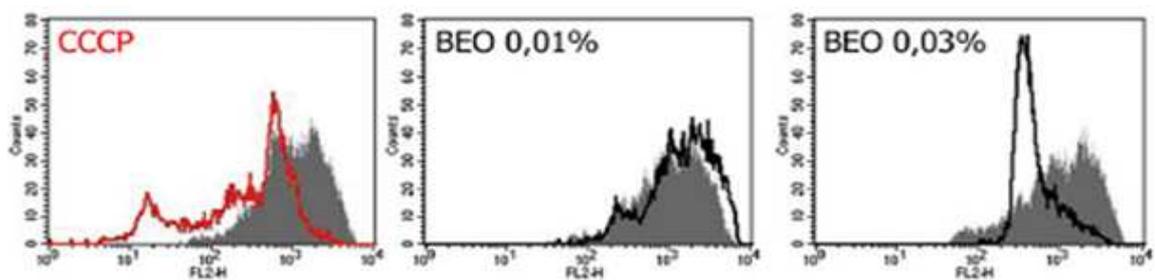
A**B**

Fig. 4.7) Alterazioni della funzionalità e della morfologia mitocondriale indotte dal BEO in colture SH-SY5Y. A) Immagini ottenute al microscopio confocale dopo colorazione con il fluoroforo TMRE. Si noti la presenza di mitocondri TMRE-positivi per la presenza del potenziale transmembranario (punta di frecce in giallo). Dopo 20 min di esposizione al BEO 0,02% si osserva perdita del potenziale di membrana accompagnata da alterazioni morfologiche dei mitocondri, rispetto alla popolazione controllo. La freccia gialla indica un nucleo condensato in colture trattate con il BEO. Il trattamento con il solo veicolo (etanolo 0,018%) determina una differente distribuzione dei mitocondri nel compartimento citoplasmatico, ma il potenziale

*mitocondriale trasmembrana non risulta alterato. L'utilizzo del disaccoppiante mitocondriale CCCP (10 μ M), applicato nello stesso campo ottico della popolazione controllo, dà conferma della specificità della colorazione. Le immagini riportate derivano dalla sovrapposizione di 20-22 piani focali acquisiti lungo l'asse z. Spessore dell'immagine: 110 μ m. **B**) Analisi citofluorimetrica del potenziale di membrana mitocondriale in colture SH-SY5Y esposte al BEO (0,01%, 0,03%) e alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,009%, 0,027%), per 20 min. L'analisi è stata eseguita con l'utilizzo del software CellQuest e la distribuzione cellulare nel canale di fluorescenza FL2-H, in base alla ritenzione della sonda, è rappresentata negli istogrammi di frequenza*

Al contrario, dopo l'esposizione di colture SH-SY5Y al BEO (0,02%) per 20 min, si osserva una drammatica riduzione della fluorescenza emessa indicativa di perdita del potenziale di membrana mitocondriale. Tale evento è, inoltre, accompagnato da alterazioni morfologiche dei mitocondri i quali appaiono meno tubulari.

La perdita del potenziale di membrana evidenziata dall'analisi in microscopia confocale è stata confermata da studi di citofluorimetria (Fig. 4.7b).

In figura 4.7b sono riportati gli istogrammi della frequenza di distribuzione cellulare nel canale di fluorescenza FL2-H delle popolazioni trattate con BEO 0,01% e 0,03% (in nero), rispetto alle colture esposte alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,009 e 0,027%; in grigio). Come controllo positivo della metodica è stato utilizzato il disaccoppiante mitocondriale CCCP (in rosso). Mentre il trattamento di cellule SH-SY5Y con concentrazioni di BEO pari a 0,01% non induce alcun effetto, una significativa riduzione del potenziale di membrana mitocondriale è apprezzabile dopo 20 min di esposizione al BEO 0,03%.

4.3 Le alterazioni mitocondriali e la morte cellulare indotte dal BEO in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y non sono associate a stress ossidativo.

Al fine di verificare il coinvolgimento dello stress ossidativo nei meccanismi alla base delle alterazioni mitocondriali e della morte cellulare indotte dal fitocomplesso, colture SH-SY5Y sono state trattate con varie concentrazioni di BEO (0,005-0,03%) e di veicolo (etanolo 0,0045-0,027%) e la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è stata seguita allo spettrofotofluorimetro (Victor², Multilabel Counter, Perkin-Elmer Life Sciences; eccitazione 495nm, emissione 530 nm) ad intervalli di 5 min, per 1 h, impiegando, come sonda, la diidro-dicloro-fluoresceina diacetato (H₂DCF-DA).

Nel grafico in figura 4.8a è riportata l'area sotto la curva (ASC_{0-60min}) dell'intensità di fluorescenza emessa da ciascun campione rispetto al tempo. Come controllo positivo della metodica è stato utilizzato il perossido di idrogeno (H₂O₂, 100µM).

È possibile osservare che l'esposizione di colture SH-SY5Y al BEO (0,005-0,03%) non è associata all'aumento di ROS né rispetto alla popolazione controllo, né rispetto ai campioni trattati con il veicolo (etanolo 0,0045-0,027%). Inoltre, il pretrattamento per 1 h con n-acetil-cisteina (NAC, 1mM) non è in grado di prevenire gli effetti citotossici indotti dal BEO (0,03%). Come mostrato in figura 4.8b, la percentuale di cellule necrotiche ed apoptotiche non varia in seguito a pretrattamento con NAC, rispetto alle colture trattate con il solo BEO (0,03%).

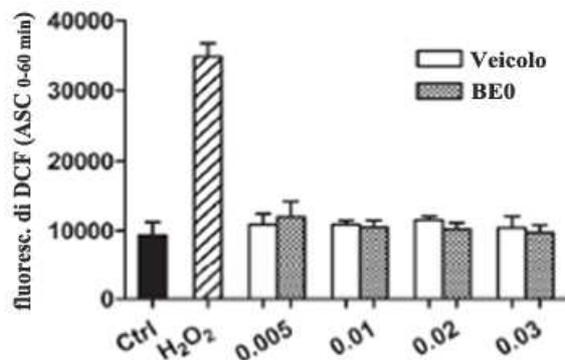
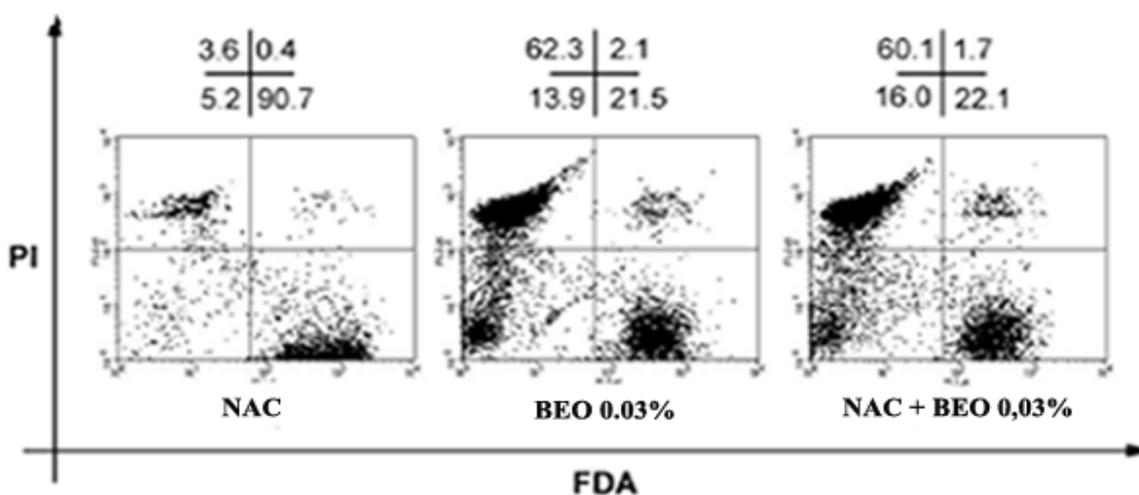
A**B**

Fig 4.8) Le alterazioni mitocondriali e la morte cellulare indotta dal BEO in colture SH-SY5Y non sono associate alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). **A)** Colture SH-SY5Y sono state esposte al BEO (0,005-0,03%) e al veicolo (etanolo 0,0045-0,027%) e la produzione di ROS è stata stimata mediante analisi spettrofotofluorimetrica con l'utilizzo della sonda H₂DCF-DA, per 1 h ad intervalli di 5 min. I risultati sono stati espressi come media ± errore standard dell'area sotto la curva (ASC) della fluorescenza emessa in funzione del tempo, da 0 a 60 min (ASC_{0-60 min}), di tre esperimenti indipendenti ognuno dei quali condotto impiegando 4-8 pozzetti per gruppo sperimentale. **B)** Colture SH-SY5Y sono state preincubate per 1 h con NAC (1mM) prima dell'esposizione a BEO (0,03%) per 1 h. La vitalità cellulare è stata valutata con la doppia colorazione FDA/PI, al citofluorimetro. Il pretrattamento con NAC non determina variazioni nella percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche indotta BEO (0,03%). I dot-plots riportati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

4.4 L'esposizione di colture SH-SY5Y a concentrazioni citotossiche di BEO (0,02-0,03%) induce attivazione di proteasi associate alla morte cellulare.

Come riportato in letteratura, le alterazioni mitocondriali giocano un ruolo importante nella morte cellulare, sia perché inducono un *deficit* energetico che compromette le fisiologiche funzioni cellulari, sia perché possono determinare il rilascio di fattori proapoptotici e di molecole in grado di attivare le caspasi (Green & Kroemer 2004).

In colture SH-SY5Y esposte al BEO (0,02-0,03%), la rapida alterazione del potenziale di membrana è accompagnata dall'attivazione della caspasi 3, come riportato in figura 4.9.

L'analisi western-blot ha permesso di identificare, dopo 1 h di esposizione al BEO (0,02-0,03%), la presenza di frammenti di clivaggio dello zimogeno inattivo della caspasi 3 del peso molecolare di 17 e 19 kDa (Nicholson et al., 1995).

L'entità dell'attivazione della caspasi 3, rilevata dopo l'esposizione alle concentrazioni citotossiche di BEO, risulta concentrazione dipendente e non è apprezzabile nelle colture sottoposte a trattamento con il solo veicolo o con le concentrazioni inferiori di BEO (0,005-0,01%).

L'attivazione della caspasi è stata confermata dall'aumento dell'immunoreattività dei frammenti di clivaggio della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP), uno dei substrati canonici della caspasi 3 (Lazebnik et al., 1994) (fig. 4.9). Infatti, dopo l'esposizione di cellule SH-SY5Y al BEO (0,02-0,03%) si osserva l'accumulo del frammento di PARP del peso molecolare di 89 kDa, che deriva in maniera specifica dal taglio proteolitico operato dalla caspasi 3. Anche in questo caso il fenomeno risulta concentrazione dipendente.

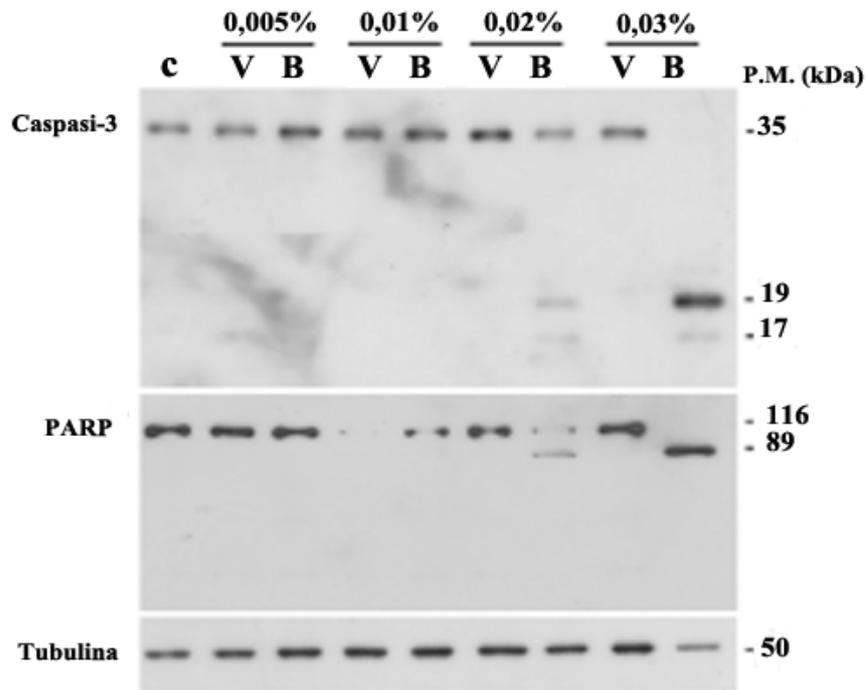


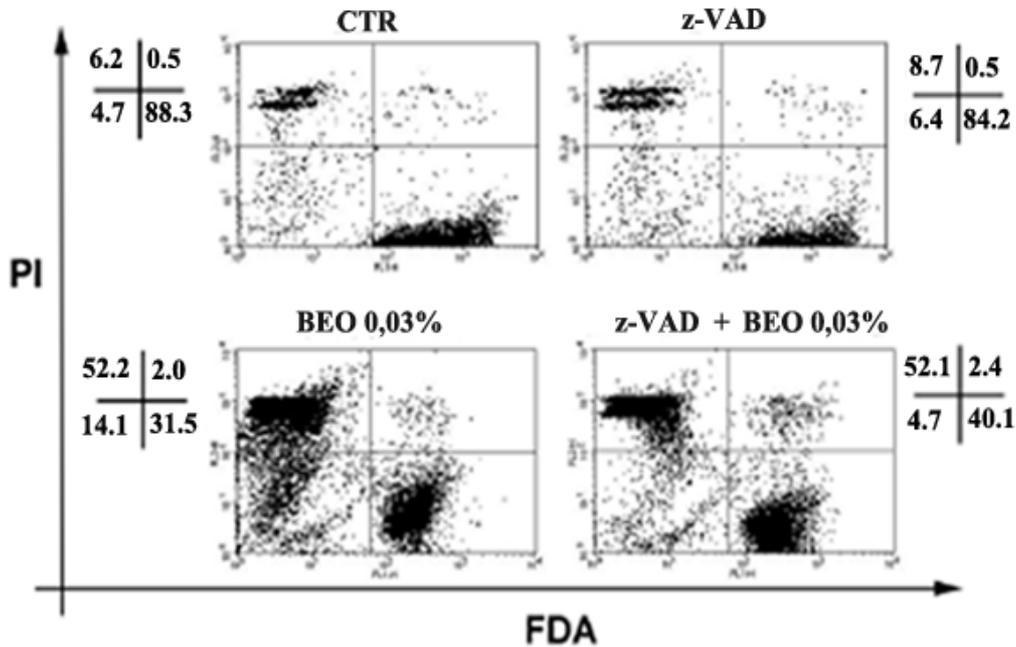
Fig 4.9) *L'esposizione di colture SH-SY5Y al BEO determina l'attivazione della caspasi 3 e il clivaggio caspasi-dipendente di PARP. Colture SH-SY5Y sono state incubate con normale medium di coltura (ctr) o esposte al BEO (0,005-0,03%) e al veicolo (etanolo 0,0045-0,027%) per 1 h. I lisati cellulari sono stati sottoposti ad analisi western-blot per valutare l'attivazione della caspasi, in base alla formazione dei frammenti proteolitici (17, 19 kDa) ed il clivaggio del substrato canonico PARP, in frammenti del peso di 89 e 24 kDa. L' α -tubulina è stata utilizzata come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in tre esperimenti indipendenti.*

In accordo con queste osservazioni, una parziale protezione dalla citotossicità indotta dal BEO è stata conferita dall'inibitore ad ampio spettro delle caspasi, Z-VAD-fmk, come mostrato in figura 4.10 dove sono riportati i pannelli rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica (fig. 4.10a) e l'analisi statistica dei dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti (fig.4.10b).

Colture SH-SY5Y sono state pretrattate per 2 h con Z-VAD-fmk (10-20 μ M), quindi esposte al BEO (0,03%) per 1 h. L'inibitore delle caspasi ha determinato una riduzione della percentuale di cellule apoptotiche indotta dal BEO, riduzione che risulta statisticamente significativa ($p < 0.05$) con l'impiego di Z-VAD-fmk 20 μ M ed una tendenza all'aumento della vitalità cellulare, come documentato al citofluorimetro con il saggio biparametrico FDA/PI. Lo Z-VAD-fmk (10-20 μ M) non previene la morte cellulare di tipo necrotico indotta dal trattamento con il BEO (fig. 4.10b).

Nello stesso modello sperimentale, utilizzando un tampone arricchito di detergenti anionici per la preparazione dei lisati cellulari, l'analisi western-blot ha permesso di documentare che, dopo 30' dall'esposizione di colture SH-SY5Y al fitocomplesso (0.02 e 0.03%), sono presenti altri frammenti di clivaggio della proteina PARP (fig. 4.11), oltre quello di 89 kDa generato dall'attività della caspasi 3. Come mostrato in figura 4.11, il clivaggio di PARP è concentrazione-dipendente ed una più rapida e progressiva proteolisi dei frammenti intermedi sembra verificarsi nelle cellule trattate con il BEO alla concentrazione più alta (0.03%).

A



B

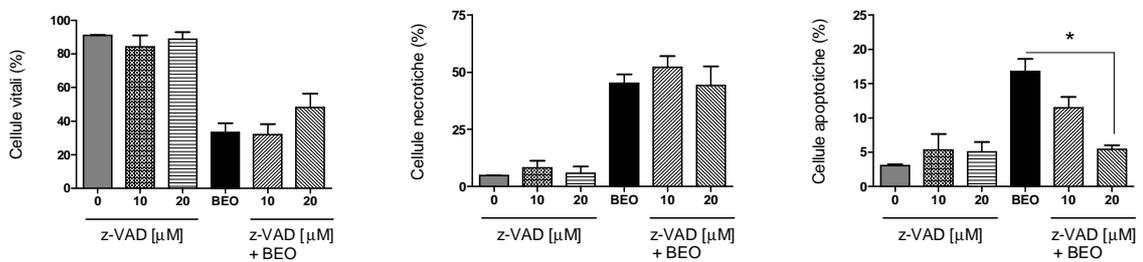


Fig 4.10) L'inibitore Z-VAD-fmk previene la morte di tipo apoptotico ma non la necrosi indotta dal BEO in colture SH-SY5Y. A) Dot-plots rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare in colture SH-SY5Y sottoposte a 2 h di pretrattamento con Z-VAD-fmk (20 μM) e, quindi, esposte al BEO (0,03%) per 1 h. Sono riportate le percentuali di cellule vitali, necrotiche e apoptotiche rilevate in 10,000 eventi/campione acquisiti. B) Analisi statistica dei dati ottenuti dalla preincubazione per 2 h con l'inibitore non selettivo delle caspasi Z-VAD-fmk (10-20 μM), seguita dall'esposizione al BEO 0,03%. La vitalità cellulare è stata stimata al citofluorimetro dopo 1 h di esposizione al BEO. I dati riportati rappresentano la media ± errore standard dei valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti * indica $p < 0.05$ rispetto al trattamento con il solo BEO (ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

La frammentazione di PARP non si osserva in seguito all'esposizione di colture SH-SY5Y a concentrazioni inferiori di BEO (0,005-0,01%), né in seguito al trattamento con il veicolo (etanolo 0,0045-0,027%); tuttavia, una banda dal peso molecolare approssimativo di 45 kDa, la cui espressione è significativamente ridotta dal trattamento con il BEO 0,03%, è stata osservata dopo l'esposizione a tutte le concentrazioni di veicolo e di BEO. Tale banda è visibile in lisati cellulari preparati utilizzando un buffer di estrazione arricchito di detergenti, ma non un tampone privo di Triton X-100 (fig. 4.11).

I frammenti derivanti dal clivaggio di PARP, rilevati dall'analisi, sono compresi in un *range* di 35-72 kDa, intervallo in cui ricadono i frammenti di PARP associati alla morte cellulare per necrosi (Aikin et al., 2004; Gobeil et al., 2001; Shah et al., 1996).

L'estesa frammentazione della proteina, osservata dopo 30 min di esposizione delle colture SH-SY5Y al BEO (0,02-0,03%), ha indotto ad indagare il coinvolgimento di altre proteasi nei meccanismi di citotossicità.

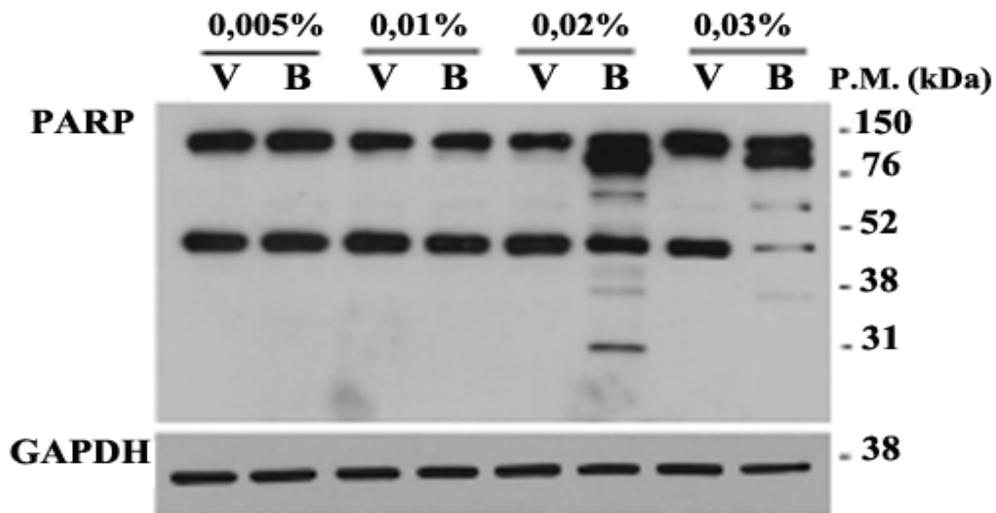


Fig. 4.11) Il BEO determina la formazione di frammenti clivaggio di PARP associati a morte cellulare per necrosi. Colture SH-SY5Y sono state incubate con mezzo fresco (ctr) o esposte al BEO (0,005-0,03%) e al veicolo (etanolo 0,0045-0,027%) per 30 min. I lisati cellulari sono stati preparati impiegando un tampone di estrazione proteica arricchito di detergenti per l'analisi western-blot di PARP. Oltre i frammenti caratteristici del processo apoptotico e derivanti dall'attivazione delle caspasi, è possibile individuare frammenti di PARP legati alla necrosi, in colture SH-SY5Y trattate con BEO (0,02-0,03%) ma non con concentrazioni inferiori (0,005-0,01%). La proteina GAPDH è stata utilizzata come controllo interno. L'immagine è rappresentativa dei risultati ottenuti in tre esperimenti indipendenti.

Proteasi lisosomiali come le catepsine B e G sono state implicate nella frammentazione di PARP durante la necrosi (Gobeil et al., 2001).

Al fine di accertare il coinvolgimento delle catepsine nei meccanismi di morte cellulare indotta dal BEO, le colture di neuroblastoma SH-SY5Y sono state sottoposte a pretrattamento con E-64d. Come mostrato in figura 4.12b, nessuna delle concentrazioni testate dell'inibitore enzimatico (5-50 μM), si è rivelata efficace nel ridurre la citotossicità indotta dal BEO (0,03%).

Al contrario, il pretrattamento con la più elevata concentrazione di inibitore testata (50 μM), determina uno *shift* tra la morte cellulare per apoptosi e per necrosi. Infatti, l'incremento statisticamente significativo ($P < 0.05$) della necrosi è accompagnato dalla significativa riduzione della percentuale di cellule in apoptosi ($P < 0.05$), rispetto alle colture sottoposte a trattamento con il solo BEO (0,03%), mentre la percentuale di cellule vitali rimane inalterata. L'aumento della necrosi non è ascrivibile alla tossicità intrinseca dell'inibitore dal momento che nessuna delle concentrazioni utilizzate (5-50 μM), da sola, determina citotossicità.

In letteratura è stato descritto il coinvolgimento delle proteasi attivate dal calcio nel clivaggio di PARP in corso di apoptosi (McGinnis et al., 1999). Secondo questi studi le calpaine sarebbero responsabili della formazione del frammento di clivaggio di PARP del peso molecolare di 37 kDa, compatibile con il peso molecolare del frammento rilevato nelle nostre condizioni sperimentali a circa 40 kDa (fig. 4.11).

Per queste ragioni è stato indagato il ruolo delle proteasi attivate dal calcio nel mediare la citotossicità indotta dal BEO in colture di neuroblastoma umano.

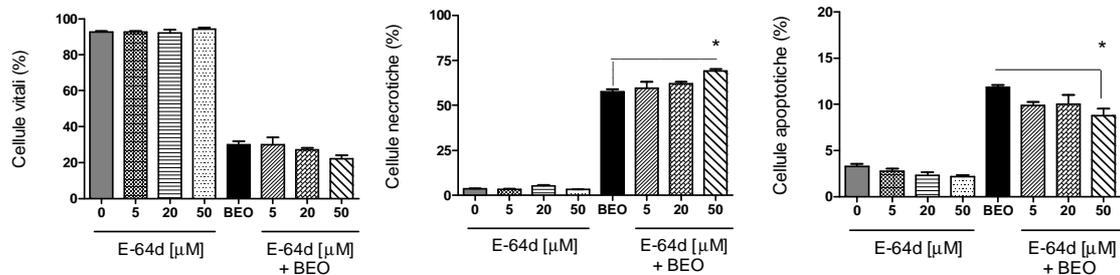
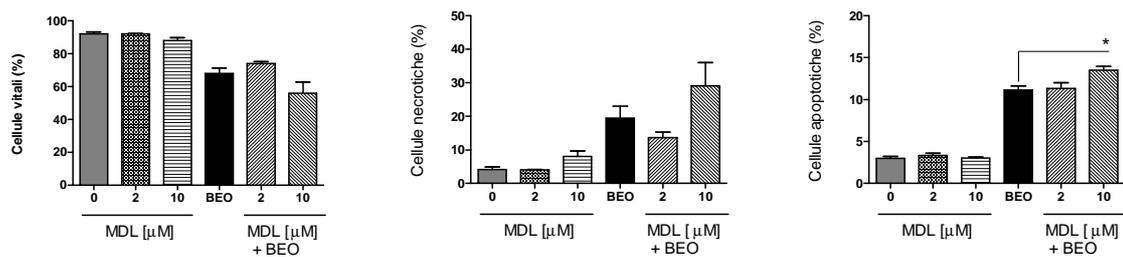
A**B**

Fig. 4.12) L'inibizione farmacologica delle catepsine e delle calpaine non previene la tossicità del BEO, in colture SH-SY5Y. A) Effetti dell'inibitore delle catepsine, E-64d, sulla percentuale di cellule vitali, necrotiche ed apoptotiche indotte dal BEO. Le cellule SH-SY5Y sono state preincubate per 1 h con l'E-64d (5-50 μM) e gli effetti sulla vitalità cellulare sono stati valutati mediante doppia colorazione con FDA/PI ed analisi citofluorimetrica 1 h dopo l'aggiunta di BEO (0.03%). I valori riportati rappresentano la media \pm errore standard dei dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti, * indica $p < 0.05$ rispetto al trattamento con il solo BEO (ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple). **B)** Effetti dell'inibitore delle calpaine MDL 28170 sulla percentuale di cellule vitali, necrotiche ed apoptotiche indotte dal BEO. Le cellule SH-SY5Y sono state preincubate per 1 h con MDL 28170 (2-10 μM) e gli effetti sulla vitalità cellulare sono stati valutati mediante doppia colorazione con FDA/PI ed analisi citofluorimetrica 1 h dopo l'aggiunta di BEO (0.02%). I valori riportati rappresentano la media \pm errore standard dei dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. * indica $p < 0.05$ rispetto al trattamento con il solo BEO (ANOVA seguita dal test di Tukey-Kramer per comparazioni multiple).

L'inibizione farmacologica dalla calpaina I con MDL 28170, tuttavia, non riduce gli effetti citotossici indotti dal BEO. In particolare, l'utilizzo di MDL 28170 a concentrazioni pari a 2 μ M, determina una tendenza alla riduzione della morte cellulare per necrosi e all'aumento della vitalità, lasciando inalterata la percentuale di cellule apoptotiche, rispetto alle colture sottoposte a trattamento con il solo BEO. Nessuno degli effetti risulta, comunque, statisticamente significativo (fig. 4.12b).

Impiegato ad una più alta concentrazione (10 μ M), l'MDL 28170 aumenta in maniera statisticamente significativa la percentuale di cellule apoptotiche indotta dal BEO e determina una tendenza all'aumento della percentuale delle cellule necrotiche. Il trattamento con il solo inibitore non determina alcuna tossicità in colture SH-SY5Y.

Gli effetti osservati, nel complesso, suggeriscono che il meccanismo di morte cellulare indotto dal BEO sia indipendente dall'attivazione delle calpaine.

A supporto di tale ipotesi, è stato osservato che l'impiego dell'EGTA per chelare il calcio extracellulare non previene la citotossicità indotta dal BEO. L'analisi citofluorimetrica ha evidenziato simili percentuali di cellule vitali dopo esposizione al BEO 0,02%, per 1h (64.7 ± 4.2 ; n=8) o in presenza di 0.25 (70.5 ± 6.7 ; n=4), 0.5 (61.4 ± 2.5 ; n= 4) o 1 mM (54.8 ± 5.6 ; n=3) di EGTA. Allo stesso modo, l'aggiunta di BAPTA (20 μ M), per chelare anche il calcio intracellulare si è rivelato inefficace nel ridurre la tossicità indotta dal BEO (dati non riportati).

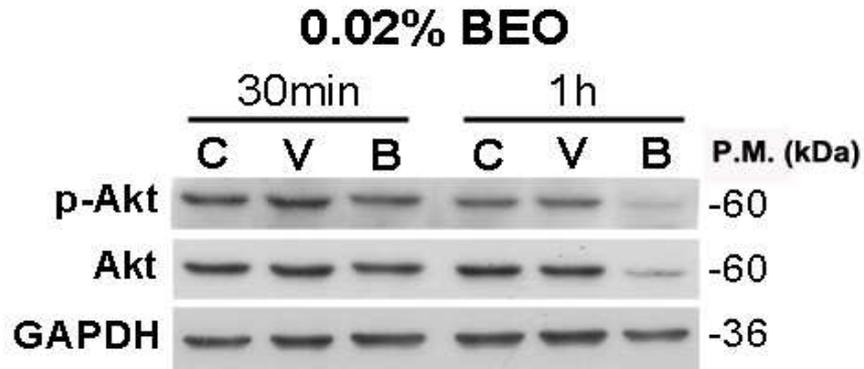
4.5 Il BEO determina la riduzione dei livelli della chinasi Akt, in cellule SH-SY5Y.

E' stato precedentemente documentato che, in cellule SH-SY5Y, il BEO, alla concentrazione 0.01%, promuove l'attivazione della chinasi Akt come meccanismo di sopravvivenza in risposta a stimoli lesivi quali la deprivazione da siero o l'eccitotossicità indotta da NMDA (Corasaniti et al., 2007). L'iperattivazione o la de-regolazione della via PI3K/Akt, tuttavia, è un fenomeno correlato all'insorgenza di tumori e alla chemioresistenza (Staal et al., 1987; Kim et al., 2007).

Nel presente studio è stato valutato come la chinasi Akt viene modulata dal trattamento con il BEO, impiegato a concentrazioni più elevate rispetto a quelle associate a citoprotezione. In particolare, mediante analisi western-blot, è stato studiato il grado di fosforilazione di Akt in colture SH-SY5Y esposte al BEO (0,02%) per 30 min e 1h.

Come riportato in figura 4.13, il BEO determina una tendenza alla riduzione dei livelli di fosforilazione della chinasi Akt in Ser473, già dopo 30 min di esposizione, effetto che diventa significativo ($P < 0.05$) ad 1 h; tuttavia, anche l'espressione della forma totale della proteina è significativamente ($P < 0.05$) ridotta dopo 1 h di esposizione al fitocomplesso rispetto al veicolo (etanolo 0,018%).

A



B

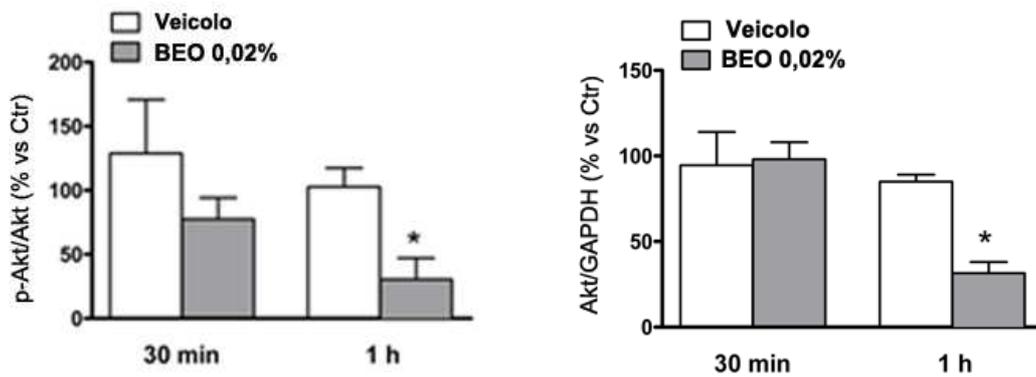


Fig 4.13) L'esposizione di colture di neuroblastoma SH-SY5Y al BEO riduce la fosforilazione e l'espressione di Akt. **A)** Colture SH-SY5Y sono state incubate con mezzo fresco (ctr) o esposte al BEO (0,02%) e al veicolo (etanolo 0,018%) per 30 min e 1 h. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante western-blot per la determinazione del grado di fosforilazione della chinasi Akt in Ser 473(p-Akt) e dei livelli di espressione della forma totale di Akt. **B)** Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande relative a p-Akt, normalizzati per i valori di Akt totale, e di Akt totale normalizzati per i valori densitometrici delle bande del controllo interno, GAPDH. I dati riportati rappresentano la media \pm errore standard dei valori ottenuti in 3 esperimenti indipendenti e sono espressi come percentuale rispetto al controllo. * indica $p < 0.05$ rispetto al veicolo (etanolo 0,018%) (test t di Student).

In letteratura è stato documentato il clivaggio della chinasi Akt mediato dalle caspasi, in particolare dalla caspasi 3 (Asselin et al., 2001; Rokudai et al., 2000; Xu et al., 2002).

Per verificare se la riduzione dei livelli di Akt fosse dovuta a degradazione della proteina, cellule di neuroblastoma trattate con BEO (0,03%) per 1 h sono state lisate utilizzando un tampone arricchito di detergenti per aumentare l'efficienza dell'estrazione proteica rispetto al tampone contenente solo Triton X-100 (fig. 4.14).

Come è possibile osservare in figura 4.14, l'esposizione per 1 h al BEO 0,03% determina una riduzione dell'immunoreattività di Akt, rispetto alle cellule trattate con il solo veicolo (etanolo 0,027%), in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y. Prolungando il tempo di esposizione della lastra autoradiografica è stato possibile osservare che la riduzione dei livelli della proteina è associata all'aumento dell'immunoreattività di un frammento proteolitico di Akt, sia nel caso dell'utilizzo del tampone arricchito di detergenti che con quello contenente lo 0,5% di Triton X-100. Il frammento osservato, che migra a circa 44 kDa, ha un peso molecolare compatibile con quello descritto per i frammenti che si formano in seguito a clivaggio di Akt operato dalle caspasi (40-45 kDa; Rokudai et al., 2000).

La banda dal peso molecolare inferiore, la cui espressione non è modulata dal trattamento con il BEO, potrebbe derivare dal legame aspecifico dell'anticorpo.

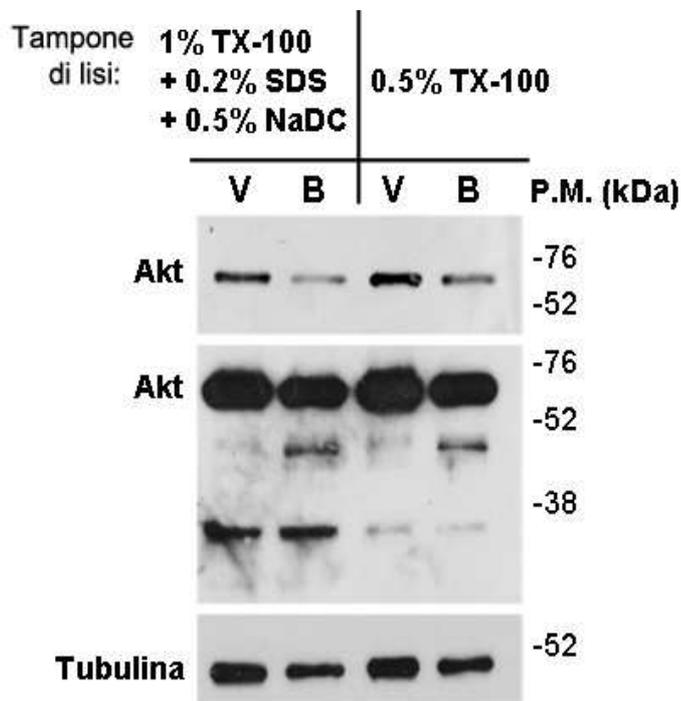


Fig 4.14) La riduzione dei livelli di Akt dopo 1 h di esposizione al BEO è associata a degradazione della chinasi. Analisi western-blot dei lisati cellulari preparati con un tampone di estrazione contenente Triton X-100, sodio dodecilsolfato (SDS) e sodio deossicolato (NaDC), al fine di incrementare l'efficacia dell'estrazione proteica. L'esposizione al BEO (0,03%, 1 h) determina una riduzione dei livelli di Akt che coincide con la comparsa di un frammento del peso molecolare di circa 44 kDa. Stessi risultati si ottengono impiegando condizioni di estrazione più blande (0.5% di Triton X-100). L'immagine è rappresentativa di 3 esperimenti indipendenti.

4.6 La caduta del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) precede la morte cellulare e le alterazioni delle caratteristiche morfologiche indotte dal BEO in colture di leucemia mieloide cronica, K-562.

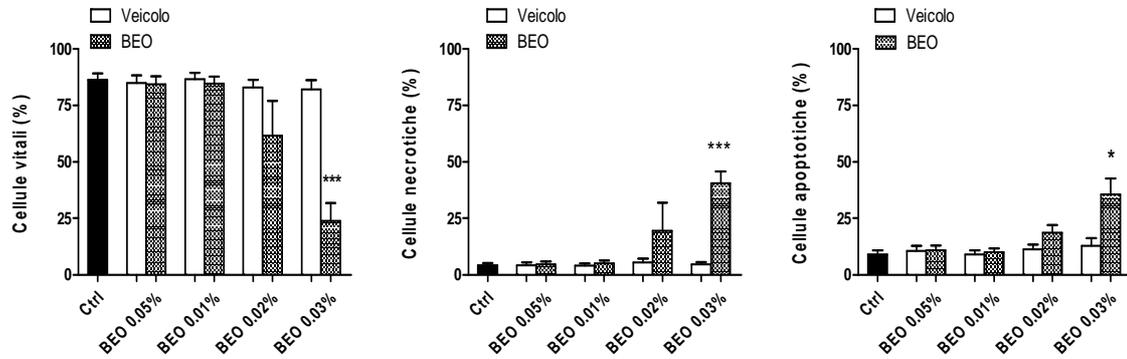
Colture cellulari in sospensione di leucemia mieloide cronica (CML) umana, K-562, sono state utilizzate nello studio al fine di stabilire se i meccanismi di adesione cellulare possano influenzare la sensibilità al BEO.

Dall'analisi di vitalità cellulare con l'utilizzo della doppia colorazione FDA/PI, è emerso che l'esposizione al BEO 0,03% per 1 h determina una riduzione statisticamente significativa ($P < 0,001$) della percentuale di cellule vitali, accompagnata da un aumento, anch'esso statisticamente significativo ($P < 0,001$; $P < 0,05$), della percentuale di cellule necrotiche ed apoptotiche, rispetto alle colture esposte al veicolo (etanolo 0,027%).

In questa linea cellulare si registra una tendenza alla riduzione della vitalità e all'aumento della morte cellulare per necrosi e apoptosi, dopo l'esposizione al BEO 0,02% per 1 h, mentre le concentrazioni più basse risultano inattive (fig. 4.15a).

Dopo 24 h di esposizione, come mostrato dai pannelli in figura 4.15b, rappresentativi dei dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti, si osserva una riduzione della vitalità cellulare pari a circa il 100% nelle colture esposte al BEO 0,03% e al 60 % nelle colture esposte al BEO 0,02%, rispettivamente. Dalla stessa analisi emerge che il tipo di morte cellulare indotta dal trattamento con il BEO (0,02-0,03%), presenta le caratteristiche della necrosi in parte delle cellule analizzate e dell'apoptosi in altre, come è possibile osservare dai *dot-plots* riportati in figura 4.15b.

A



B

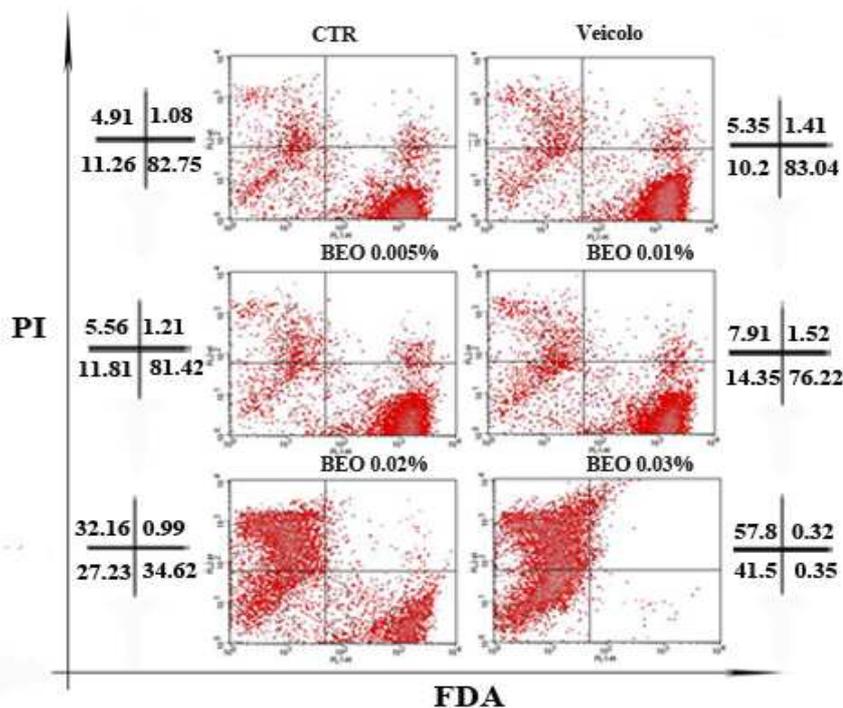
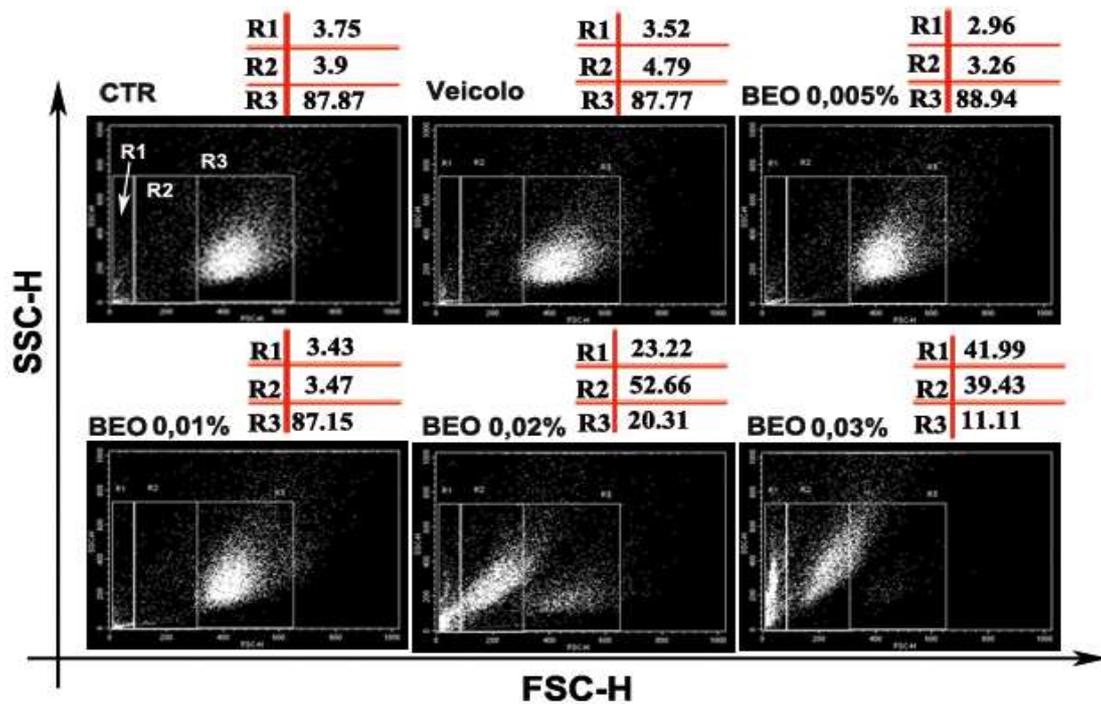


Fig. 4.15) La citotossicità indotta dal BEO in colture K-562 è associata a morte cellulare per necrosi e apoptosi. L'effetto è concentrazione- e tempo-dipendente. A) Effetti dell'incubazione di colture di leucemia mieloide cronica, K-562, con il (0,005-0,03%) per 1 h. Un aumento significativo della percentuale di cellule necrotiche e apoptotiche ed una riduzione statisticamente significativa della percentuale di cellule vitali, si osserva dopo esposizione al BEO 0,03%, rispetto alla popolazione trattata con il veicolo (etanolo 0,027%). I valori riportati in istogramma ed espressi come percentuale degli eventi acquisiti (10,000 eventi/campione)

corrispondono alla media \pm errore standard dei dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. * e *** denotano $P < 0.05$ e $P < 0.001$, rispetto al veicolo (test *t* di Student). **B**) Dot-plots rappresentativi ottenuti dall'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare (FDA/PI) di colture K-562 esposte al BEO (0,005-0,03%) per 24 h. Una importante riduzione della popolazione di cellule vitali, accompagnata da un aumento evidente della popolazione di cellule necrotiche e apoptotiche, è indotta dall'esposizione al BEO 0,02-0,03%. Il programma cellQuest è stato utilizzato per la quantificazione delle cellule apoptotiche (quadrante in basso a sinistra), necrotiche (quadrante in alto a sinistra) e vitali (quadrante in basso a destra), dopo l'acquisizione di 10,000 eventi/campione. (Veicolo: etanolo 0,027%).

La morte cellulare indotta dal BEO, in colture K-562, si associa ad alterazioni morfologiche quali raggrinzimento cellulare e/o aumento della granulosità, rilevabili dopo 1 h di esposizione al fitocomplesso. I dot-plots FSC/SSC ottenuti sono stati utilizzati per stabilire la distribuzione delle cellule nelle regioni arbitrariamente denominate R1, R2, R3.

Come mostrato in figura 4.16, dopo 1 h di esposizione al BEO 0,02-0,03% si osserva una notevole riduzione della percentuale di cellule localizzate nella regione R3, rispetto alle colture controllo o sottoposte a trattamento con il veicolo (etanolo 0,027%). L'effetto è accompagnato dall'aumento della percentuale di cellule localizzate nelle regioni a ridotto FSC (R1, R2). In particolare, dall'analisi dei dot-plots emerge che, dopo trattamento con BEO 0.02%, il 23% circa delle cellule è localizzato nella regione R1, mentre il 53% circa è localizzato nella regione R2; gli eventi compresi in tale regione presentano, inoltre, un modesto incremento della granulosità (SSC) rispetto alla popolazione residua in R3.



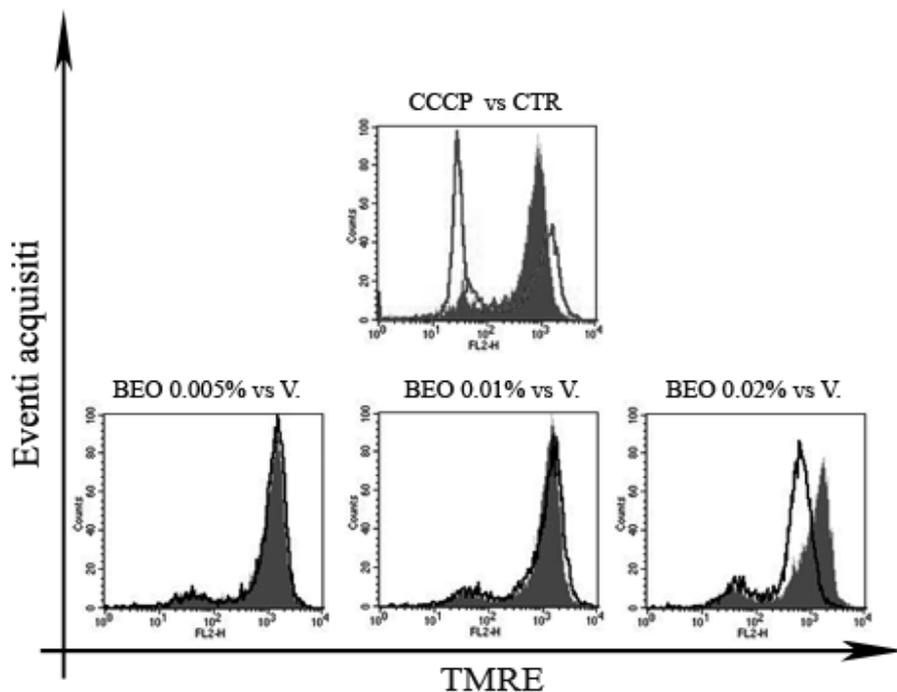
4.16) Il BEO (0,02-0,03%) induce raggrinzimento cellulare in colture di leucemia mieloide cronica K-562. Dot-plots FSC/SSC della distribuzione cellulare in base alle proprietà di diffrazione della luce incidente. Tre aree (R1, R2, R3) sono state delimitate sui dot-plots FSC/SSC per la valutazione delle alterazioni morfologiche. L'incubazione con il BEO (0,02-0,03%) per 1 h induce, in colture K-562, una redistribuzione concentrazione-dipendente della popolazione principale dalla regione R3 alle regioni R1 ed R2. I pannelli riportati e i valori indicati sono rappresentativi di quanto osservato in 3 esperimenti indipendenti, dopo l'acquisizione di 10,000 eventi/campione.

Nelle colture K-562 trattate per 1 h con BEO 0,03%, le cellule con ridotte dimensioni sono equamente distribuite nelle regioni a ridotto FSC (R1, R2); in tale regione, inoltre, si riscontra una tendenza all'aumento della granulosità cellulare (SSC), dopo esposizione al BEO (0,03%), rispetto alle colture controllo o trattate con il solo veicolo (etanolo 0,0027%). Il trattamento con concentrazioni inferiori di BEO (0,005-0,01%) non altera le caratteristiche morfologiche rispetto alle colture controllo e al veicolo.

L'evento che precede la riduzione della vitalità cellulare e le alterazioni morfologiche, osservate nelle colture K562 dopo 1 h di esposizione al BEO (0,02-0,03%), è la caduta del potenziale di membrana.

Gli istogrammi in figura 4.17 rappresentano la frequenza di distribuzione degli eventi acquisiti al citofluorimetro dopo colorazione con l'estere tetrametil-etilico della rodamina (TMRE).

Nelle colture K-562 la depolarizzazione mitocondriale si osserva dopo 30 min di esposizione al BEO (0,02%), come riportato negli istogrammi in figura 4.17, rappresentativi dell'effetto osservato in tre esperimenti indipendenti. L'impiego di concentrazioni inferiori del fitocomplesso (0,01%) non è associato ad alterazioni della funzionalità mitocondriale, rispetto al veicolo corrispondente (etanolo 0,009%). Il disaccoppiante mitocondriale CCCP (pannello in alto) è stato utilizzato come controllo positivo della metodica.



4.17) La caduta del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) precede le alterazioni morfologiche e la morte cellulare indotte dal BEO in colture K-562. Analisi del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) al citofluorimetro dopo l'esposizione di colture K-562 al BEO (0,005-0,02%) e alle corrispondenti concentrazioni di veicolo (etanolo 0,0045-0,018%), per 30 min. L'analisi è stata eseguita con l'utilizzo del software CellQuest e la distribuzione cellulare nel canale di fluorescenza FL2-H, in base alla ritenzione della sonda (TMRE), è rappresentata negli istogrammi di frequenza. Il disaccoppiante mitocondriale CCCP è stato utilizzato come controllo positivo della metodica. (veicolo: istogramma in grigio, BEO: istogramma in nero, CCCP: istogramma in grigio chiaro).

4.7 Effetti indotti dal BEO in colture di fibroblasti di cute umana, Hs 605.Sk

L'analisi citofluorimetrica della vitalità cellulare mediante doppia colorazione FDA/PI è stata impiegata anche per valutare gli effetti del BEO in colture di fibroblasti umani, Hs 605.Sk, aventi un fenotipo normale.

Le evidenze sperimentali ottenute dopo l'esposizione di colture Hs 605.Sk al BEO (0,01-0,04%) per 24 h, rivelano una riduzione della vitalità cellulare che risulta statisticamente significativa ($P < 0.01$) dopo l'esposizione al BEO 0,03-0,04%, mentre nessuna variazione della vitalità cellulare si osserva utilizzando concentrazioni più basse di BEO (0,01-0,02%), rispetto alle colture controllo. L'effetto osservato segue un andamento concentrazione dipendente. (Fig.4.18).

Dopo 24 h di esposizione al BEO (0.03-0.04%), la riduzione della vitalità cellulare è accompagnata da un aumento della percentuale di cellule necrotiche. L'effetto osservato risulta statisticamente significativo ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, rispettivamente).

La percentuale di cellule apoptotiche non varia significativamente in seguito a trattamento di cellule Hs 605.Sk con il fitocomplesso, sebbene si registri una tendenza all'aumento dopo 24 h di esposizione al BEO 0,03% e 0,04%. La percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche rilevata nelle colture trattate per 24 h con il veicolo (etanolo 0,036%) o con le concentrazioni inferiori di BEO (0,01-0,02%) non risulta alterata rispetto alle colture controllo.

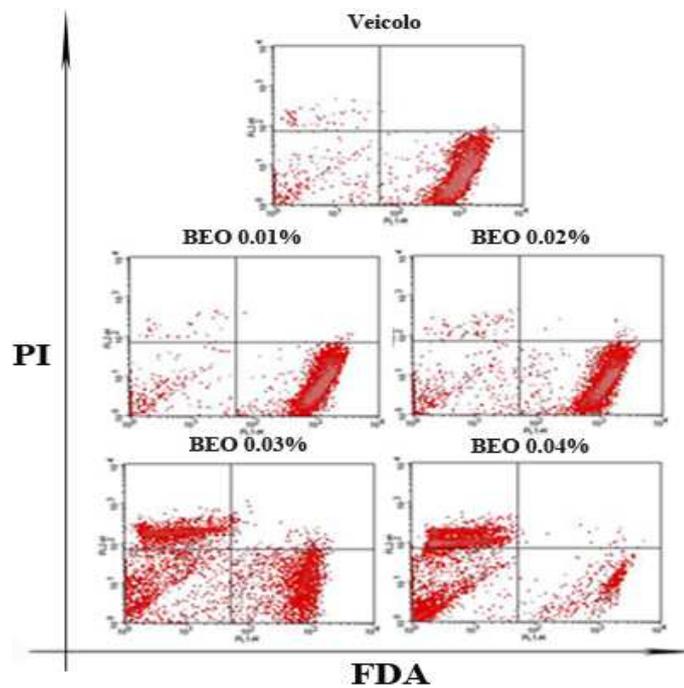
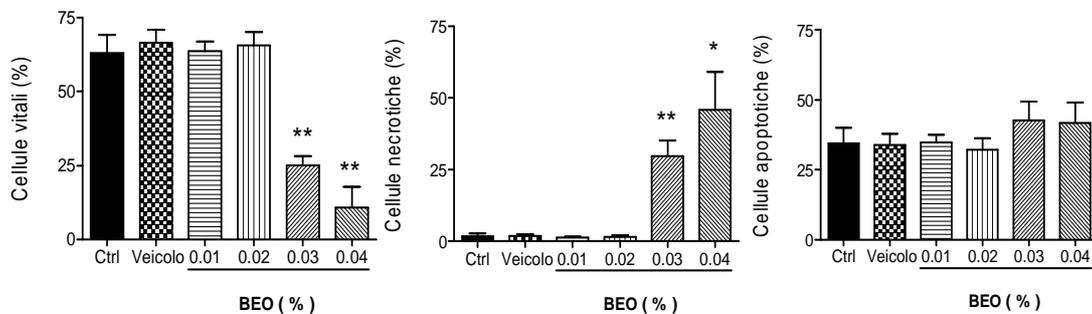
A**B**

Fig. 4.18) L'esposizione al BEO per 24 h induce morte cellulare di tipo necrotico in colture di fibroblasti di cute umana, Hs 605.Sk. A) Pannelli rappresentativi dell'analisi citofluorimetrica di vitalità condotta su colture di fibroblasti umani Hs 605.Sk, dopo esposizione al BEO (0,01-0,04%) per 24 h. Per l'analisi sono stati acquisiti 10,000 eventi/campione. L'elaborazione dei dati è stata condotta con l'utilizzo del programma cellQuest. B) Analisi statistica dei dati ottenuti dagli esperimenti di vitalità cellulare mediante doppia colorazione FDA/PI su colture Hs 605.Sk esposte al BEO (0,01-0,04%) per 24 h. Il BEO (0,03-0,04%) determina una riduzione statisticamente significativa della percentuale di cellule vitali, e un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule necrotiche, rispetto alle colture controllo. I valori riportati in istogramma ed espressi come percentuale rispetto agli eventi acquisiti, corrispondono alla media \pm errore stan-

*ard dei dati ottenuti in 3 esperimenti indipendenti. *e ** indicano $P < 0.05$ e $P < 0,01$, rispetto alle colture controllo (test t di Student)*

Le colture di fibroblasti umani Hs 605.Sk sono state sottoposte ad analisi morfologica con l'utilizzo delle tecniche citofluorimetriche precedentemente descritte.

Come riportato nei pannelli in figura 4.19, dopo l'esposizione al BEO (0,03-0,04%) per 24 h, si osserva una redistribuzione della popolazione principale normalmente localizzata nella regione R3 dei dot-plots FSC/SSC, rispetto alle cellule controllo o trattate con il veicolo (etanolo 0,036%). Tale effetto è accompagnato da un aumento evidente della percentuale di cellule nelle regioni R2 e R1 a ridotte dimensioni cellulari (FSC). All'interno della stessa regione R3 la popolazione residua cellulare non presenta una distribuzione omogenea, dopo 24 h di esposizione al BEO (0,03-0,04%).

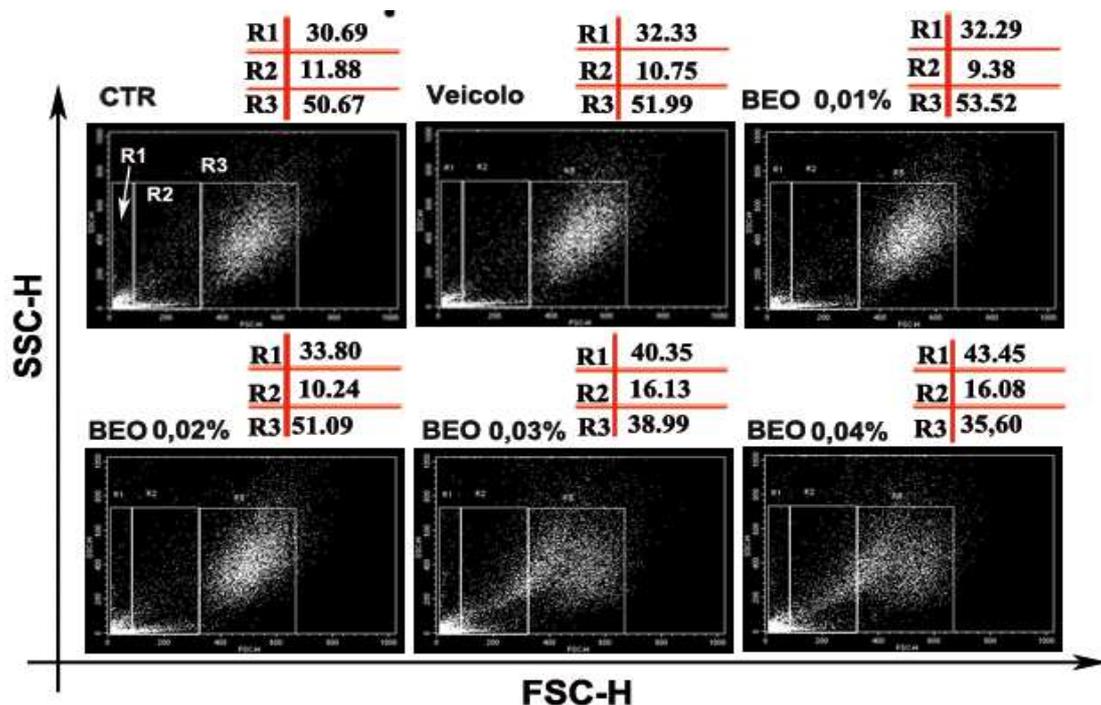


Fig. 4.19) Il BEO (0,03-0,04%) induce raggrinzimento cellulare in colture di fibroblasti umani, Hs 605.Sk, dopo 24 h di esposizione. Dot-plots FSC/SSC della distribuzione cellulare in base alle proprietà di diffrazione della luce incidente. Tre aree (R1, R2, R3) sono state delimitate sui dot-plots FSC/SSC per la valutazione delle alterazioni morfologiche. L'incubazione con il BEO (0,03-0,04%) per 24 h induce una redistribuzione della popolazione principale dalla regione R3 alle regioni R1 ed R2 a ridotte dimensioni cellulari (FSC), in maniera indipendente dalla concentrazione. I pannelli riportati e i valori indicati sono rappresentativi di quanto osservato in 3 esperimenti indipendenti, dopo l'acquisizione di 10,000 eventi/campione.

5. Discussione

Nel corso degli ultimi anni, diversi studi sperimentali hanno documentato interessanti proprietà terapeutiche del BEO (Amantea et al., 2009; Bagetta et al., 2010; Corasaniti et al.,

2007; Mollace et al., 2008; Saiyudthong & Marsden, 2011; Sakurada et al., 2009, 2011), un olio essenziale largamente impiegato nell'industria alimentare, farmaceutica, profumiera e cosmetica (www.bergamotoconsorzio.it) ed in aromaterapia (si veda Bagetta et al., 2010).

Tuttavia, in letteratura, le informazioni circa il profilo tossicologico del BEO *in vivo* o in colture cellulari umane sia normali che tumorali sono molto limitate e, comunque, relative alla fototossicità cutanea del bergaptene (Zaynoun et al., 1977).

Inoltre, recenti evidenze sperimentali, ottenute *in vitro* ed *in vivo*, documentano che il BEO esercita effetti neuroprotettivi da attribuire, almeno in parte, alla modulazione della via PI3K/Akt. In particolare, è stato osservato che il BEO previene la riduzione dell'attività di Akt indotta da stimoli eccitotossici sia *in vitro* (Corasaniti et al., 2007) che *in vivo* (Aman-tea et al., 2009) aumentando i livelli di fosforilazione della chinasi. Tuttavia, come documentato in letteratura, l'iperattivazione di tale via di sopravvivenza è associata al rischio di tumorigenesi (Staal et al., 1987) ciò che solleva dubbi circa la sicurezza nell'uomo dell'impiego di prodotti a base dell'olio essenziale per tempi prolungati.

Nel presente studio, allo scopo di valutare gli effetti del BEO sulla sopravvivenza e proliferazione cellulare, colture di cellule tumorali e di fibroblasti umani sono state esposte, per diverso periodo di tempo, a varie concentrazioni dell'olio essenziale.

I risultati ottenuti hanno permesso di caratterizzare il profilo tossicologico del BEO in sistemi *in vitro* e di stabilire come alcune delle principali vie biochimiche di sopravvivenza vengono modulate dal BEO, quando utilizzato a concentrazioni maggiori rispetto a quelle citoprotettive.

In particolare, è stato dimostrato che il BEO esplica effetti citotossici in cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, quando impiegato a concentrazioni superiori allo 0,01%.

In cellule SH-SY5Y esposte per 24 h al BEO (0,02-0,03%) è stata osservata una significativa riduzione dell'attività metabolica cellulare, come valutato mediante test MTT.

La ridotta capacità delle cellule di metabolizzare la sonda MTT e produrre cristalli di formazano, può essere imputabile al blocco dell'attività delle deidrogenasi mitocondriali, conseguente a *deficit* energetico o a morte cellulare (Yang et al., 2006).

L'analisi quantitativa delle cellule vitali, capaci di escludere il colorante *trypan blue* in virtù dell'integrità di membrana, ha permesso di chiarire che dopo 24h di esposizione al BEO (0,02-0,03%) la ridotta capacità di metabolizzare l'MTT è dovuta ad una significativa riduzione del numero di cellule vitali.

Una tecnica citofluorimetrica a cui spesso si ricorre per la caratterizzazione del processo di morte è l'analisi del contenuto di DNA di una popolazione cellulare. La fluorescenza emessa da cellule permeabilizzate e sottoposte a colorazione con l'agente intercalante 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 è rilevabile per la presenza di un accumulo di cellule a sinistra del picco *G0/G1* del ciclo cellulare, in una regione indicata come picco *sub-G1* (Darzynkiewicz et al., 1992) o come area *sub-G1* (Yang et al., 2005), a seconda della scala di fluorescenza utilizzata.

Nelle nostre condizioni sperimentali è stato rilevato che l'esposizione di colture SH-SY5Y al BEO (0,02-0,03%) determina un aumento significativo della popolazione ipodiploide già dopo 1h di esposizione al fitocomplesso e che l'effetto è concentrazione- e tempo-

dipendente. Anche questo approccio sperimentale ha confermato che le concentrazioni inferiori di BEO (0,005-0,01%) non sono associate a citotossicità.

La riduzione della fluorescenza emessa dal PI deriva dal ridotto contenuto in DNA delle cellule apoptotiche, in conseguenza dell'attivazione di specifiche endonucleasi che degradano il DNA in frammenti caratteristici di 180-220 bp (Walker et al., 1991). Questi frammenti a basso peso molecolare diffondono facilmente fuori dal nucleo e, successivamente, nell'ambiente extracellulare dopo la permeabilizzazione cellulare (Darzynkiewicz et al., 1992). Tuttavia, La frammentazione del DNA, non è una caratteristica esclusiva del processo apoptotico. Spesso, durante la necrosi si assiste alla frammentazione eterogenea del DNA (si veda Darzynkiewicz et al., 1997).

Per caratterizzare meglio il fenotipo cellulare di colture SH-SY5Y dopo trattamento con il BEO è stata, pertanto, utilizzata la doppia colorazione con i fluorofori FDA/PI. Tale metodica ha consentito la simultanea valutazione della percentuale di cellule vitali, apoptotiche e necrotiche (Ross et al., 1989). Dall'analisi è emerso che il BEO (0,02-0,03%) riduce la vitalità cellulare in conseguenza di un aumento della percentuale di cellule apoptotiche e necrotiche. L'effetto, rilevato già dopo 1h di esposizione, risulta concentrazione- e tempo-dipendente. Tali evidenze sperimentali portano ad ipotizzare che l'aumento della percentuale di eventi ipodiploidi (*sub-G1*) indotto dall'olio essenziale (0,02-0,03%) derivi in parte dall'attività di endonucleasi specifiche che si attivano in corso di apoptosi ed in parte dalla frammentazione *random* del DNA che caratterizza la necrosi.

L'utilizzo di tecniche citofluorimetriche ha consentito di rilevare le alterazioni della morfologia cellulare, attraverso l'analisi della diffrazione della luce incidente da parte di ogni singola cellula in direzione opposta rispetto alla fonte (FSC) o con un angolo di 90° (SSC)

rispetto alla stessa; tali parametri danno informazioni sulle dimensioni cellulari e sulla granulosità, rispettivamente (si veda Darzynkiewicz et al., 1997). È stato così osservato che l'esposizione al BEO (0,02-0,03%) per 1 h determina un'importante riduzione delle dimensioni cellulari (FSC).

Durante la morte per apoptosi, la perdita di ioni intracellulari e l'efflusso di acqua sono associati a riduzione delle dimensioni cellulari ed aumento della densità citoplasmatica (SSC); al contrario, la necrosi è caratterizzata da iniziale rigonfiamento cellulare seguito da riduzione del volume dovuta alla compromessa integrità della membrana plasmatica ed alla fuoriuscita dei costituenti intracellulari. Tuttavia, è possibile anche osservare l'effetto opposto; infatti, durante la morte cellulare per necrosi è stato descritto un aumento della granulosità e le cellule in tarda apoptosi possono andare incontro a riduzione della densità cellulare (Lizard et al., 1995).

Pertanto, i cambiamenti dei parametri FSC/SSC osservati dopo esposizione di colture di neuroblastoma alle concentrazioni citotossiche di BEO, sono indicativi della morte cellulare, ma non possono essere considerati parametri distintivi del tipo di morte cellulare indotta.

Combinando l'analisi morfologica e la doppia colorazione con i fluorofori FDA/PI è emerso che, in seguito a trattamento con il BEO per 1 h, le cellule localizzate nelle regioni con ridotto FSC, quindi con ridotte dimensioni cellulari, sono in parte apoptotiche ed in parte necrotiche.

Sono state descritte in letteratura condizioni in cui la morte cellulare non presenta le caratteristiche classiche dell'apoptosi o della necrosi, ma di entrambe, come riscontrato in cellule di leucemia acuta, MOLT-4, esposte a radiazioni di varia entità, che determinano la

comparsa di aspetti tipici della necrosi a livello citoplasmatico e alterazioni nucleari associate alla morte cellulare per apoptosi, rilevate al microscopio elettronico (Akagi et al., 1995) o come dimostrato in colture di carcinoma ovarico umano, CH-1, dopo il trattamento con cisplatino dove le caratteristiche dell'apoptosi rilevate non sono accompagnate dai tagli intranucleosomali del DNA (Ormerod et al., 1994). Inoltre, sono state descritte in letteratura condizioni in cui, all'interno della stessa popolazione, uno stimolo citotossico è capace di indurre morte cellulare di tipo necrotico in alcune cellule e apoptotico in altre (Ankarcrona et al., 1995).

I dati fin qui ottenuti permettono di concludere che l'effetto citotossico del BEO, in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y, è concentrazione- e tempo-dipendente e che la morte cellulare indotta presenta per alcune cellule i tratti dell'apoptosi, per altre quelli della necrosi.

Inoltre, dalle indagini condotte è emerso che l'intervallo tra concentrazioni citotossiche e quelle non tossiche risulta estremamente ristretto, evidenza che può essere attribuibile all'elevato numero di costituenti presenti nel fitocomplesso i cui *target* cellulari non sono ad oggi completamente noti.

Come mostrato dall'analisi citofluorimetrica, il primo effetto osservato dopo l'esposizione delle colture SH-SY5Y al BEO è la caduta del potenziale mitocondriale ($\Delta\Psi_m$), evento associato ad alterazioni della morfologia dei mitocondri, apprezzate al microscopio confocale, dopo 20 min di esposizione al fitocomplesso. Tale evento non sembra essere ascrivibile alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), dato confermato dall'inefficacia del pretrattamento con l'antiossidante N-acetil cisteina nel prevenire la tossicità dell'olio essenziale. L'applicazione di tecniche di microscopia ha permesso di apprezzare alterazioni

della morfologia cellulare come la riorganizzazione del citoscheletro che interessa sia i microfilamenti che i microtubuli, dopo 1 h di esposizione al fitocomplesso (0,02-0,03%). Queste alterazioni risultano particolarmente marcate nelle cellule che presentano nuclei condensati. Inoltre, appare evidente che l'integrità dei microtubuli è quella maggiormente compromessa come dimostrato dalla perdita dell'immunoreattività per la tubulina nelle cellule trattate con il BEO 0,03%. Tale dato è confermato dall'analisi western blot dove, nuovamente, è possibile osservare la riduzione dell'immunoreattività per l' α -tubulina in colture SH-SY5Y sottoposte ad 1h di trattamento con il BEO 0,03%.

I microtubuli, costituiti da α -tubulina e β -tubulina, sono componenti del citoscheletro che svolgono numerose funzioni nelle cellule eucariotiche, dal mantenimento della morfologia, alla migrazione dei cromosomi, ai meccanismi eso-endocitotici (Dutcher, 2001).

Alcuni farmaci antitumorali come il paclitaxel hanno un'azione diretta sui microtubuli. L'azione di questi farmaci è accompagnata dalla perdita del potenziale di membrana mitocondriale e dal rilascio di citocromo c; al contrario, farmaci che agiscono con un meccanismo indipendente dall'alterazione dei microtubuli non determinano il rilascio di citocromo c, come nel caso della doxorubicina (Andrè et al., 2000). È stato documentato che la tubulina è un componente della membrana mitocondriale dove si trova associata, in maniera specifica, a canali anionici voltaggio-dipendenti che partecipano alla formazione del poro transmembrana, contribuendo alla permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna (MOMP), quindi alla caduta del potenziale di membrana mitocondriale (Carrè et al., 2002).

Le evidenze sperimentali ottenute e i dati presenti in letteratura suggerirebbero che le profonde alterazioni a carico dei microtubuli, osservate nelle colture trattate con BEO

0,03%, siano responsabili della caduta del potenziale di membrana mitocondriale; tuttavia, le alterazioni citoscheletriche rilevate nelle cellule sottoposte a trattamento con BEO 0,02%, per 1 h, non sono tali da giustificare le alterazioni morfologiche e funzionali dei mitocondri, rilevate dopo 20 min di esposizione.

È stato ampiamente descritto in letteratura che l'evento immediatamente successivo alla caduta del potenziale di membrana mitocondriale è il rilascio del citocromo c nel compartimento citoplasmatico dove esso si associa ad Apaf-1 (*fattore 1 attivante le proteasi apoptotiche*) e alla caspasi 9, formando il complesso macromolecolare dell'*apoptosoma* che, in presenza di ATP (adenosintrifosfato), media il clivaggio e l'attivazione delle caspasi effettive e l'esecuzione dell'apoptosi (si veda Kroemer et al., 2007).

Nelle nostre condizioni sperimentali, dopo la caduta del potenziale di membrana mitocondriale ed in particolare dopo 1 h di esposizione al BEO, l'analisi western blot ha permesso di apprezzare i frammenti derivanti dalla maturazione proteolitica della caspasi 3, del peso molecolare di 17 e 19 kDa (Nicholson et al., 1995). Nello studio condotto, inoltre, è stata apprezzata la frammentazione della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP), substrato canonico della caspasi 3 (Lazebnik et al., 1994; Tewari et al., 1995). L'immunoreattività del frammento di PARP del peso molecolare di 89 kDa, derivante dall'attività proteolitica della caspasi 3, così come l'immunoreattività dei frammenti della stessa caspasi, aumentano in funzione della concentrazione di BEO utilizzata.

Il ruolo della caspasi 3 nella citotossicità indotta dal BEO è stato confermato dal pretrattamento con l'inibitore non selettivo delle caspasi, z-VAD-fmk, che riduce significativamente la percentuale di cellule apoptotiche, lasciando inalterata la percentuale di cellule necro-

tiche. Tali evidenze suggeriscono la complessità dei meccanismi citotossici modulati dal BEO.

Le alterazioni della funzionalità e della struttura dei mitocondri possono determinare l'attivazione della via apoptotica; tuttavia, è stato documentato che, in caso di danno mitocondriale eccessivo, il *deficit* energetico dovuto alla massiccia deplezione di ATP intracellulare non consente l'esecuzione della cascata apoptotica e la morte cellulare assume i tratti distintivi della necrosi (Leist et al., 1997).

Diverse evidenze sperimentali hanno documentato per l'enzima nucleare PARP un *pattern* di clivaggio associato alla morte cellulare per necrosi. In particolare, in uno studio condotto nel 2004 da Aikin e collaboratori è stata rilevata la presenza di un frammento di PARP del peso molecolare di 50 kDa conseguente al processo di isolamento delle cellule del pancreas; studi precedenti hanno documentato la presenza di alcuni frammenti di clivaggio di PARP diversi da quelli prodotti dall'attività delle caspasi, in linee cellulari sottoposte a stimoli necrotici. È stato, inoltre, dimostrato che l'inibizione delle caspasi non previene la formazione dei frammenti associati alla morte cellulare per necrosi il cui peso molecolare è compreso tra 35 e 72 kDa, in dipendenza dallo stimolo e dal tipo cellulare (Aikin et al., 2004; Casiano et al., 1998; Gobeil et al., 2001; Shah et al., 1996).

Nelle nostre condizioni sperimentali, dopo 30 min di esposizione di colture SH-SY5Y all'olio essenziale, è stata riscontrata la presenza di frammenti di clivaggio di PARP il cui peso molecolare è compatibile con quello dei frammenti descritti in altre linee cellulari durante la morte per necrosi. Inoltre, nelle stesse condizioni sperimentali, si assiste al progressivo clivaggio dei frammenti prodotti con la più alta concentrazione di BEO utilizzata (0,03%).

Il completo *pattern* di clivaggio della proteina è stato apprezzato utilizzando, per la preparazione dei lisati cellulari, un tampone ricco di Triton X-100. La differenza tra i frammenti di clivaggio apprezzati dopo 1 h di esposizione e quelli rilevati dopo 30 minuti di esposizione al BEO è, pertanto, da attribuire ad una diversa efficacia di estrazione; tuttavia, non è da escludere che i frammenti associati alla necrosi vengano totalmete degradati dopo 1 h di esposizione al fitocomplesso. L'analisi western-blot dei lisati cellulari ottenuti impiegando un tampone ricco di detergenti ha evidenziato la presenza di una banda del peso molecolare di circa 45 kDa sia nei campioni trattati con BEO che in quelli trattati con il solo veicolo e nelle cellule controllo. La ridotta immunoreattività di tale banda nelle cellule trattate con BEO 0,03% sembrerebbe escludere che tale frammento non sia correlato al clivaggio di PARP.

La parziale efficacia di z-VAD-fmk nel prevenire la morte cellulare indotta dal trattamento con il BEO insieme al complesso *pattern* di frammentazione di PARP, hanno portato ad ipotizzare che l'attivazione di altre proteasi possa contribuire alla citotossicità indotta dall'olio. Infatti, secondo quanto riportato in letteratura, proteasi lisosomiali incluse le cathepsine B e G (Gobeil et al., 2001), ma non le caspasi (Casiano et al., 1998), sono responsabili del clivaggio di PARP durante la necrosi.

Per indagare il coinvolgimento delle cathepsine nella tossicità indotta dal BEO è stato utilizzato l'inibitore non selettivo E-64d. Nelle nostre condizioni sperimentali, il pretrattamento con l'inibitore non previene la citotossicità indotta dal BEO in colture SH-SY5Y. Al contrario, il pretrattamento con E-64d, impiegato alla concentrazione di 50 μ M, determina un aumento della percentuale di cellule necrotiche e riduzione della percentuale di cellule in apoptosi, rispetto alle colture sottoposte a trattamento con il solo BEO.

Si può ipotizzare che l'aumento della necrosi sia legato alla deplezione di ATP, i cui livelli intracellulari sono un fattore discriminante per l'esecuzione della morte per apoptosi o per necrosi (Nicotera et al.,2000).

La proteina ubiquitaria PARP svolge funzioni strutturali e regolatorie del genoma, fungendo da "sensore del danno" in risposta a stimoli che alterano la struttura del DNA. L'attivazione di PARP è indispensabile per la sintesi di omopolimeri di poli-ADPribosio a partire dal precursore NAD^+ , quindi per la poli-ADP-ribosilazione, una modificazione post-traslazionale cui vanno incontro numerosi enzimi coinvolti nella riparazione del DNA (Herceg & Wang 2001).

Nelle nostre condizioni sperimentali, è possibile che l'inibizione delle catepsine mediata da E-64d, in presenza di BEO, se da un lato previene il clivaggio e l'inattivazione di PARP, favorendo i meccanismi di riparazione del DNA e inibendo l'apoptosi, dall'altro comporta deplezione del cofattore NAD^+ con conseguente blocco di alcuni importanti processi metabolici intracellulari, come la glicolisi e la respirazione mitocondriale. Questi eventi aggravano la deplezione intracellulare di ATP le cui riserve vengono sfruttate per la nuova sintesi di NAD^+ (Ha & Snider 1999). Nelle nostre condizioni sperimentali, dunque, lo *shift* della morte cellulare da apoptosi a necrosi, in presenza di E-64d (50 μM), potrebbe essere una conseguenza della deplezione delle riserve energetiche intracellulari.

L'analisi western blot dei lisati di cellule SH-SY5Y precedentemente esposte al BEO ha evidenziato la presenza di un frammento di clivaggio di PARP del peso molecolare di circa 37 kDa. Secondo quanto riportato in letteratura, dall'attività proteolitica delle calpaine deriva un frammento di PARP del peso molecolare di 40 kDa (McGinnis et al., 1999). Pertanto, ipotizzando il coinvolgimento delle calpaine nella tossicità indotta dal BEO, è stata

valutata la capacità dell'inibitore delle calpaine, MDL 12870, di prevenire la citotossicità indotta dal fitocomplesso. Nelle nostre condizioni sperimentali, il pretrattamento con MDL 12870 non si è rivelato efficace nel prevenire la citotossicità del BEO, al contrario, la più alta concentrazione utilizzata nello studio (10 μ M), induce un incremento significativo della percentuale di cellule che vanno incontro a morte per apoptosi, rispetto alla percentuale di cellule apoptotiche rilevata dopo trattamento con il solo BEO. In letteratura è stato documentato che la calpaina I previene l'attivazione delle caspasi 3 e 9 (Lankiewicz et al., 2000, Neumar et al., 2003). È pertanto possibile ipotizzare che nelle colture esposte a concentrazioni citotossiche BEO, l'inibizione delle calpaine indotta dal pretrattamento con MDL 28170, favorisca l'attività delle caspasi, in particolar modo della caspasi 3, aumentando la morte cellulare per apoptosi. I risultati ottenuti negli esperimenti condotti con l'MDL 28170 suggeriscono che le proteasi neutre Ca^{2+} -attivate, calpaine, non sono implicate nella morte cellulare indotta dal BEO. In accordo con questi dati, il pretrattamento con EGTA, per chelare il calcio extracellulare e con BAPTA, per chelare lo ione presente all'interno dei compartimenti cellulari, si è rivelato inefficace nel prevenire la tossicità indotta dal fitocomplesso, suggerendo un meccanismo di tossicità non dipendente dal calcio. Come precedentemente documentato da studi condotti nel nostro laboratorio, l'azione citoprotettiva del BEO (0,01%) in colture SH-SY5Y è associata all'attivazione della via dei fosfoinositidi, in particolare alla fosforilazione in serina 473 della chinasi Akt, come meccanismo di sopravvivenza allo stimolo eccitotossico indotto da NMDA (Corasaniti et al., 2007).

Nel presente lavoro, è stato valutato in che modo tale via di sopravvivenza viene modulata dall'azione del BEO, quando utilizzato a concentrazioni più elevate rispetto a quelle citoprotettive e per intervalli di tempo maggiore.

Come rilevato dall'analisi western blot, la riduzione dei livelli della forma fosforilata in serina 473 della chinasi Akt, dopo 1 h di esposizione al BEO (0,02%), è accompagnata dalla significativa riduzione dei livelli della forma totale della proteina. Analisi successive hanno permesso di concludere che, nelle nostre condizioni sperimentali, la riduzione dei livelli di Akt è ascrivibile all'aumentata attività proteolitica, conseguente all'esposizione al BEO.

Infatti, la riduzione dell'immunoreattività per la forma totale di Akt indotta dal BEO (0,03%), rispetto alle colture trattate con il veicolo corrispondente (etanolo 0,027%), è associata all'aumento dell'espressione di un frammento di clivaggio della chinasi, del peso molecolare di circa 44 kDa.

In letteratura è stata descritta la frammentazione di Akt dipendente dall'attività delle caspasi in corso di apoptosi mediata dal ligando di Fas (Widmann et al., 1998), dopo trattamento con cisplatino di alcune linee cellulari (Asselin et al., 2001) e nella deprivazione di citochine (Xu et al., 2002). In questi studi è stato rilevato un frammento di Akt del peso molecolare compreso tra 40 e 50 kDa derivante dall'attività proteolitica della caspasi 3 (Rokudai et al., 2000). Si può ipotizzare, pertanto, che nelle nostre condizioni sperimentali la chinasi Akt possa essere clivata in maniera specifica dalla caspasi 3. Queste osservazioni suggeriscono che l'effetto citotossico del BEO in colture di neuroblastoma umano sia legato all'inattivazione delle vie di sopravvivenza, processo che favorisce la progressione della morte cellulare.

L'indagine del profilo tossicologico del BEO è stata estesa e colture di leucemia mieloide cronica, K-562, una linea cellulare tumorale che cresce in sospensione, a differenza delle colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y.

L'impiego di tecniche citofluorimetriche ha permesso di stabilire che l'esposizione al BEO determina una rapida caduta del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) che precede le alterazioni della morfologia cellulare e l'aumento della percentuale di cellule con fenotipo apoptotico e necrotico osservati dopo 1 h di esposizione delle cellule K-562 al fitocomplesso. Tali effetti sono dipendenti dalla concentrazione utilizzata e dal tempo di esposizione.

In letteratura sono riportati dati riguardanti l'effetto pro-apoptotico indotto dal limonene in colture K-562. In particolare, è stato dimostrato che il limonene 0,1-0,8 mM induce una riduzione concentrazione-dipendente della vitalità cellulare dopo 48 h. Inoltre, l'esposizione delle colture al limonene 0,4 mM per 12-24-36-48-60 e 72 h causa un incremento della mortalità cellulare proporzionale al tempo di esposizione; tale incremento risulta statisticamente significativo già dopo 24 h (Ji et al., 2006).

Le percentuali di BEO che risultano citotossiche nelle nostre condizioni sperimentali (0,02-0,03%) contengono concentrazioni di d-limonene pari a 0,56 mM e 0,84 mM, rispettivamente. Tali valori rientrano nell'intervallo di concentrazioni associate a morte cellulare per apoptosi nelle colture di leucemia mieloide cronica K-562.

Tuttavia, il tipo di morte cellulare indotta dal BEO nelle colture K-562 non presenta esclusivamente i tratti dell'apoptosi e la tossicità osservata risulta statisticamente significativa già dopo 1 h di esposizione al fitocomplesso. Tali differenze portano ad ipotizzare un effetto sinergico di alcuni costituenti del BEO.

Uno studio più recente, infatti, ha documentato l'attività antitumorale del linalolo in colture cellulari di leucemia, tra cui le K-562. I dati ottenuti dimostrano che la concentrazione di linalolo necessaria per ridurre la proliferazione cellulare del 50% nelle cellule esprimenti p53 *wild-type* è compresa tra 50 e 130 μM . Nello stesso studio è stato documentato che linee cellulari esprimenti la forma mutata della proteina p53, tra cui le colture K-562 (Durland-Busbice & Reisman, 2002), o risultano insensibili all'effetto o richiedono concentrazioni e tempi di esposizione maggiori (Gu et al., 2010). Nelle nostre condizioni sperimentali, il BEO induce effetti citotossici già dopo 1 h di esposizione ed a concentrazioni nelle quali il linalolo corrisponde a circa 50 μM . Complessivamente, i risultati ottenuti nel presente studio ed i dati precedentemente riportati in letteratura rafforzano la tesi dell'effetto sinergico tra i costituenti del BEO, sia in colture di leucemia mieloide cronica K-562 che in colture di neuroblastoma umano SH-SY5Y, il cui profilo tossicologico è sovrapponibile. Tuttavia, è probabile che il tipo di sinergismo differisca tra le varie linee cellulari e che i bersagli molecolari modulati dai vari costituenti siano diversi. Inoltre, dai dati ottenuti, è possibile ipotizzare che i meccanismi di adesione cellulare non siano determinanti per la sensibilità all'effetto citotossico del fitocomplesso.

Gli effetti del BEO sono stati valutati anche in colture di fibroblasti di cute umana, Hs 605.Sk. La scelta è stata dettata dall'esigenza di verificare la sensibilità di cellule con un fenotipo normale all'olio essenziale di bergamotto; inoltre, considerando il diffuso impiego di prodotti a base di BEO, è opportuno indagarne il potenziale citotossico per un impiego più sicuro.

I dati ottenuti dimostrano che le colture di fibroblasti umani, Hs 605.Sk, manifestano una sensibilità inferiore all'azione citotossica del BEO, rispetto alle colture tumorali utilizzate

nello studio. La riduzione della vitalità cellulare è stata, infatti, osservata dopo 24 h di esposizione al BEO 0,03%. La morte cellulare indotta presenta principalmente le caratteristiche della necrosi ed è accompagnata da alterazioni della morfologia come documentato dalla redistribuzione della popolazione principale in regioni caratterizzate da più bassi valori di FSC, indice di ridotte dimensioni cellulari.

Nel lavoro condotto da Baik e collaboratori sono state studiate le proprietà antibatteriche degli oli essenziali estratti da quattordici tipi di piante del genere *Citrus*; inoltre, sono stati documentati gli effetti degli stessi estratti in colture di fibroblasti umani per valutarne il potenziale impiego in campo dermatologico. In questi studi è emerso che gli oli essenziali derivanti da 8 delle piante del genere *Citrus* (*C. tangerina*; *C. unshiu*; *C. grandis*; *C. aurantium*; *C. erythrosa*; *C. pseudogulgul*; *C. paradisi*; *C. sinensis*) manifestano una modesta citotossicità, riducendo la vitalità cellulare del 20% circa, dopo 24h di esposizione a 10 µl/ml di olio (Baik et al., 2008).

Nelle nostre condizioni sperimentali le colture di fibroblasti manifestano una sensibilità più elevata al BEO dopo 24 h di esposizione, pur avendo utilizzato una diluizione maggiore di olio essenziale (0,4 µl/ml). È importante considerare, tuttavia, che gli oli essenziali impiegati nel lavoro citato differiscono profondamente in quanto a composizione rispetto al BEO. Ad eccezione del limonene e del mircene, composti come il linalolo, l'acetato di linalile ed il bergaptene risultano poco espressi. Pertanto, è possibile ipotizzare che la maggiore tossicità del BEO rispetto ad altri oli estratti da piante del genere *Citrus*, in colture di fibroblasti umani, sia imputabile alla presenza contemporanea di monoterpeni idrocarburi e di derivati ossigenati, quali il linalolo e l'acetato di linalile .

In uno studio del 2004, condotto per l'identificazione del profilo tossicologico dell'olio essenziale di lavanda (*Lavandula Augustifolia*), è stata dimostrata la sensibilità di colture di fibroblasti umani all'acetato di linalile e al linalolo che sono i costituenti principali dell'olio. Lo studio ha documentato che il fitocomplesso (0,25%), l'acetato di linalile (0,03% circa) e il linalolo (0,08% circa), riducono la vitalità cellulare già dopo 1 h di esposizione (Prashar et al., 2004). Le percentuali di acetato di linalile (0,009%) e linalolo (0,003%), presenti nella concentrazione citotossica di BEO (0,03%), risultano inattive sui fibroblasti nello studio di Prashar e collaboratori; tuttavia, nelle nostre condizioni sperimentali, la tossicità del BEO è stata osservata dopo un tempo di esposizione maggiore (24 h), pertanto, non è da escludere che la tossicità del BEO sia ascrivibile a questi monoterpeni.

Dallo studio di Prashar e collaboratori (2004), scaturiscono considerazioni sulla necessità di approfondire le conoscenze del profilo farmacologico e tossicologico dei prodotti di origine naturale che spesso vengono utilizzati senza documentate indicazioni di sicurezza; infatti, benché l'olio essenziale di lavanda venga incluso nella categoria dei prodotti "sicuri" (Tisserand & Balacs 2000), tanto da essere applicato non diluito sulla pelle, nessuno studio precedente a quello del 2004 era stato condotto per caratterizzarne il profilo tossicologico.

I dati ottenuti nel nostro modello sperimentale, sebbene rivelino una sensibilità inferiore delle colture cellulari aventi un fenotipo normale all'azione citotossica del BEO, suggeriscono l'utilizzo dell'olio essenziale di bergamotto ad elevate diluizioni, specialmente se applicato direttamente sulla cute e per periodi prolungati di tempo.

I dati ottenuti dimostrano, inoltre, che il BEO non attiva i meccanismi di sopravvivenza cellulare, che favoriscono la crescita e la proliferazione, se non in risposta ad uno stimolo

citotossico (Corasaniti et al., 2007, Amantea et al., 2009). Al contrario, dopo l'esposizione al fitocomplesso (0,02-0,03%) è stata osservata una importante riduzione della vitalità cellulare accompagnata dall'inattivazione di alcuni dei principali fattori *pro survival*, come dimostrato dalla ridotta fosforilazione di Akt e dalla degradazione proteolitica di Akt e PARP.

In letteratura sono state documentate proprietà antiproliferative o citotossiche, *in vitro*, di alcuni dei principali costituenti del BEO. Le evidenze documentate possono dare indicazioni indirette sul/i costituente/i del fitocomplesso responsabile/i degli effetti osservati.

Relativamente al limonene, è stato dimostrato che esso esercita un'attività antiproliferativa in colture di tumore pancreatico (PANC-1) e prostatico (DU-145) con un IC₅₀ di 5 e 2,5 mM, rispettivamente (Karlson et al., 1996; Rabi et al., 2009). Tali concentrazioni sono superiori rispetto alla concentrazione di d-limonene presente nel BEO 0,02% (circa 0,56 mM). In uno studio condotto da Itani e collaboratori è stata documentata la citotossicità dell'acetato di linalile che determina una significativa riduzione della vitalità in una linea cellulare di cancro al colon-retto, HCT-116, alla concentrazione di 1 mM (Itani et al., 2008). Anche questo costituente, tuttavia, si è rivelato efficace a concentrazioni superiori a quella presente nel BEO 0,02% (circa 250 µM).

Altri costituenti del BEO hanno dimostrato un potenziale citotossico *in vitro*. È stata, infatti, documentata la citotossicità del linalolo, impiegato a concentrazioni comprese tra 0,4 e 100 µM, in diverse linee cellulari tumorali (Usta et al., 2009). La concentrazione di linalolo presente nel BEO (0,02%) è pari a 50 µM e rientra nell'intervallo di concentrazioni per cui è stata documentata tossicità; tuttavia, come precedentemente discusso, le colture di leucemia K-562, sensibili all'effetto citotossico del BEO, richiedono concentrazioni di li-

nalolo maggiori di 50 μM per andare incontro a morte cellulare (Gu et al., 2010). Pertanto è possibile ipotizzare che la tossicità del BEO non sia imputabile all'azione di un singolo costituente.

Il bergaptene, sostanza presente nella frazione non volatile del BEO, è responsabile della fototossicità dell'olio essenziale (Zaynoun et al., 1977). E' stato recentemente dimostrato che tale sostanza, impiegata alla concentrazione di 6 μM , riduce solo del 20% la vitalità cellulare in colture di carcinoma mammario MCF-7. L'effetto diventa significativo solo con la contemporanea esposizione ai raggi UVA (Panno et al., 2010). Considerando queste osservazioni e la concentrazione relativamente bassa di bergaptene presente nel BEO 0,02% (1,2 μM) è possibile ipotizzare che tale sostanza non sia responsabile dell'effetto citotossico dell'olio nelle colture cellulari analizzate nel presente studio.

Nonostante le evidenze sperimentali riportate, ulteriori indagini sono necessarie al fine di identificare i costituenti responsabili degli effetti del BEO e caratterizzare possibili loro interazioni farmacologiche.

Un aspetto interessante del profilo tossicologico del BEO riguarda il tipo di morte cellulare indotta che presenta i tratti dell'apoptosi e della necrosi ad indicare che molteplici meccanismi intracellulari vengono attivati.

Sia le cellule apoptotiche che quelle necrotiche possono rilasciare mediatori dell'infiammazione che incrementano la risposta citotossica (Tesniere et al., 2008).

In ambito oncologico esiste una controversa correlazione tra infiammazione e cancro. Se da un lato il processo infiammatorio favorisce la citotossicità dei chemioterapici e il riassorbimento della massa tumorale, dall'altro può contribuire al rischio di metastasi (Lotze & Tracey, 2005).

Esistono evidenze sperimentali derivanti da studi condotti *in vitro* che documentano le proprietà antiossidanti del BEO e di alcuni dei suoi costituenti come il limonene.

L'inibizione della lipossigenasi (Wei & Shibamoto, 2010), della produzione di citochine proinfiammatorie come il TNF- α , IL-1 β e IL-6, dell'espressione della iNOS (*nitrossido-sintasi inducibile*) e della COX-2 (*ciclossigenasi-2*) quindi della produzione di NO e PEG₂ (Hotta et al., 2010, Yoon et al., 2010) da parte del BEO o del limonene sono fenomeni descritti in letteratura.

Inoltre, evidenze delle proprietà anti-infiammatorie del linalolo e del linalil acetato sono state riportate in studi condotti *in vivo* (si veda Sakurada et al., 2009). Nelle nostre condizioni sperimentali non è stato rilevato alcun aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno e l'antiossidante N-acetil cisteina non previene la citotossicità indotta dal BEO in colture SH-SY5Y.

Considerando le diverse vie di morte attivate dal BEO, e la ridotta sensibilità di cellule aventi un fenotipo normale all'azione del fitocomplesso, la comprensione dei meccanismi attraverso i quali i diversi costituenti del BEO interagiscono per ridurre la proliferazione cellulare potrebbe essere utilmente sfruttata in chemioterapia antitumorale nell'ambito di un approccio farmacologico combinato (Hopkins, 2008) mirato ad interferire con diversi bersagli molecolari.

6. Parte speciale:

Attività di ricerca svolta durante lo stage formativo all'estero.

Nella parte finale del corso di dottorato di ricerca, è stato svolto uno stage formativo presso il German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) di Bonn.

L'attività di ricerca svolta durante tale periodo ha riguardato lo studio di alcuni modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*, che consentono l'analisi dei meccanismi patologici associati al morbo di Parkinson e permettono di riprodurre la sintomatologia nell'animale.

Il morbo di Parkinson (MP) è il secondo disordine neurodegenerativo a decorso progressivo dopo l'Alzheimer, caratterizzato dalla perdita selettiva dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra pars compacta (SNpc) che proiettano allo striato. L'insorgenza della patologia è rara sotto i 50 anni e nel 95% dei casi, definiti sporadici, non sono presenti alterazioni geniche riscontrate, invece, nelle forme ereditarie della patologia.

Dal punto di vista clinico il Parkinson, come ogni altro tipo di condizione patologia che compromette il sistema nigrostriatale e determina deplezione dei livelli di dopamina (DA) nello striato, è caratterizzato da bradicinesia, tremore, rigidità posturale e *freezing*, cioè impossibilità di iniziare un movimento volontario. Tra le caratteristiche neurochimiche e neuropatologiche oltre alla perdita dei neuroni dopaminergici nigro-striatali e la depigmentazione della SNpc, particolarmente ricca di neuromelanina, si annovera la presenza di inclusioni citoplasmatiche di aggregati proteici denominate "corpi di Lewy".

Le ipotesi sull'eziologia del MP derivano dall'impiego di modelli sperimentali che riproducono alcune delle caratteristiche della patologia.

Dalle osservazioni dei tessuti umani post-mortem e dall'utilizzo di alcuni approcci sperimentali sono state proposte due cause scatenanti della patologia di Parkinson: le disfunzioni mitocondriali con conseguente stress ossidativo e l'anomala aggregazione proteica.

Tra i modelli sperimentali che consentono di riprodurre le caratteristiche neuropatologiche della malattia troviamo approcci basati sull'utilizzo di sostanze neurotossiche tra cui il rotenone, il paraquat, l'MPTP e la 6-idrossidopamina, il cui potenziale patogeno è ascrivibile alla capacità di indurre stress ossidativo aumentando i livelli intracellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Il modello sperimentale basato sull'utilizzo del rotenone è dovuto all'azione selettiva di questa sostanza lipofila (Talpadè et al., 2000) a livello mitocondriale, dove inibisce il complesso I della catena respiratoria. L'utilizzo di questo modello si deve agli studi epidemiologici che correlano positivamente il rischio d'insorgenza del Parkinson all'esposizione ai pesticidi. Nel ratto la somministrazione di basse dosi di rotenone determina la selettiva degenerazione dei neuroni dopaminergici del tratto nigro-striatale associata all'aumento della deposizione di aggregati proteici simili ai corpi di Lewy.

Tuttavia, non è stato chiaramente stabilito se la somministrazione di L-DOPA migliora i disturbi motori osservati nell'animale (Betarbet et al., 2000); inoltre, l'intossicazione acuta con rotenone sembra risparmiare i neuroni dopaminergici (Ferrante et al., 1997), mentre la somministrazione cronica produce una perdita neuronale diffusa, non circoscritta ai neuroni dopaminergici della SN (Hoglinger et al., 2003).

Tra tutti i modelli, quello che dà maggiori informazioni sulle alterazioni funzionali derivanti dalla compromissione del circuito dei gangli della base dopo deplezione di DA a livello striatale è il parkinsonismo indotto da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

(MPTP) nei primati, che rimane il modello più utilizzato negli studi preclinici per testare nuove strategie terapeutiche (si veda Dauer et al., 2003).

Negli anni '80 si diffuse una sindrome simile al Parkinson tra i giovani consumatori di droghe, indotta dall'utilizzo dell'MPTP, un analogo del narcotico meperidina. La sintomatologia riscontrata in questi soggetti e nei primati iniettati con la sostanza è sovrapponibile a quella riscontrata nei pazienti affetti da MP. I soggetti rispondono al trattamento con L-DOPA e sviluppano le stesse complicazioni motorie a lungo termine. Una buona correlazione tra parkinsonismo indotto da MPTP e morbo di Parkinson scaturisce anche dall'osservazione delle caratteristiche neuropatologiche, infatti, l'MPTP induce una selettiva perdita dei neuroni dopaminergici nella SNpc invece che nella contigua area ventrale tegmentale (VTA). A dispetto di queste similitudini, tuttavia, il parkinsonismo indotto da MPTP non è accompagnato dalla deposizione di aggregati proteici nel citoplasma simili ai corpi di Lewy, come osservato dall'analisi post-mortem del cervello di soggetti deceduti in seguito ad intossicazione dalla neurotossina (Forno et al., 1993).

Il primo tra i modelli animali di Parkinson ad essere introdotto fu quello indotto dalla somministrazione di 6-idrossidopamina (6-OHDA) (Ungerstedt, 1968). Si tratta di una sostanza polare che non attraversa la barriera emeto-encefalica e necessita di essere somministrata direttamente nel SNC dove, ad opera dei trasportatori della dopamina e noradrenergici, viene introdotta nei neuroni provocandone una perdita selettiva (Luthman et al., 1989). Il meccanismo dell'azione citotossica di tale sostanza è ascrivibile alla produzione di specie reattive dell'ossigeno. Mentre l'applicazione a livello della substantia nigra induce una rapida degenerazione dei neuroni dopaminergici, che non presentano un fenotipo apoptotico (Jeon et al., 1995), l'iniezione a livello striatale produce una degenerazione dei

neuroni della SN più progressiva e retrograda che si osserva dopo settimane (2-3) dall'insulto (Sauer & Oertel, 1994). In nessun caso, comunque è possibile apprezzare la formazione di aggregati proteici intracitoplasmatici simili ai corpi di Lewy.

Uno dei vantaggi dell'iniezione intrastriatale di 6-OHDA consiste nella possibilità di produrre alterazioni morfologiche e funzionali asimmetriche, potendo utilizzare il lato controlaterale all'iniezione come controllo interno. La severità del danno prodotto dall'iniezione unilaterale di questa sostanza può essere apprezzato attraverso specifici test comportamentali che permettono di valutare e quantificare le funzioni motorie dell'animale. In particolare, con il cylinder test è possibile valutare il deficit motorio quantificando il numero di tocchi che l'animale effettua sulla parete di un cilindro con la zampa ipsilaterale e controlaterale all'emisfero di iniezione della neurotossina (si veda Ulusoy et al., 2009). Il rotator test permette, invece, di valutare nell'animale lo sviluppo della tendenza alla rotazione, indotta dal danno unilaterale mediato da 6-OHDA, dopo la somministrazione di agonisti dopaminergici come l'apomorfina (Ungerstedt, 1968).

Oltre ai test comportamentali l'esame istologico di alcune aree del SNC è indispensabile per quantificare la severità del danno e la validità del modello.

Nel corso dello stage formativo presso il DZNE, sono stati acquisiti i principi della contastereologica applicati alla valutazione del danno indotto, nel ratto, dalla somministrazione unilaterale di 6-OHDA a livello striatale (7 µg) o a livello delle fibre dopaminergiche ascendenti (MFB, 4µg) .

La stereologia è una tecnica che consente di valutare in maniera rigorosa parametri come il numero, la dimensione o la distribuzione degli oggetti, in particolare, è possibile effettuare,

con elevata precisione ed accuratezza, misurazioni assolute del numero di cellule/processi presenti in un'intera struttura anatomica o in popolazioni cellulari fissate.

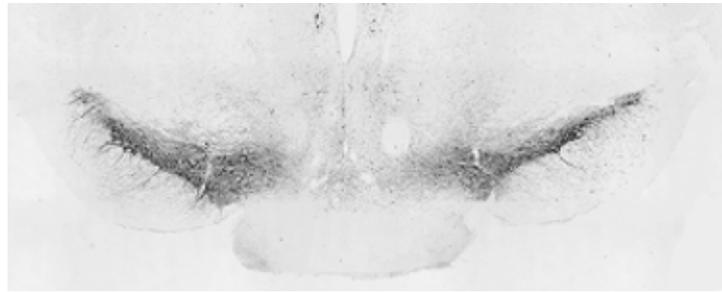
Questo metodo consente anche un'analisi quantitativa delle diverse strutture cellulari (i.e. conta dei processi assonali, dendritici, dei nuclei, dei corpi cellulari) e di valutare le alterazioni morfologiche cui le cellule sono soggette in tessuti patologici (West, 2002).

In particolare, nelle nostre condizioni sperimentali, ci si è serviti del Frazionatore Ottico per la stima dei neuroni dopaminergici presenti nella *substantia nigra* di ratto, nella regione ipsilaterale (destra) o controlaterale al sito di iniezione della neurotossina.

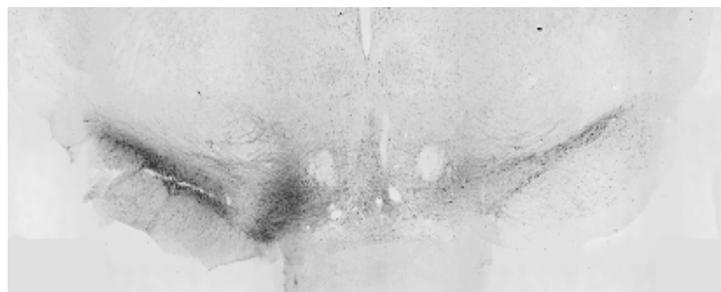
Fettine coronali (40 μ m) del cervello di ratti trattati con 6-OHDA, sono state realizzate al vibratomo, eseguendo un campionamento sistematico e *random* delle fettine da analizzare, criteri indispensabili per l'applicazione del Frazionatore Ottico. Ciò che rende sistematica la raccolta dei campioni è l'ordine rigoroso delle fettine, in base alla frazione di campionamento, mentre viene definita *random* per via della casualità del punto iniziale. Nelle nostre condizioni, in particolare, ciascun campione ottenuto conteneva un numero di fettine pari ad 1/6 (frazione di campionatura) dell'intera area.

I campioni ottenuti sono stati, quindi, sottoposti ad analisi immunoenzimatica per marcare i neuroni dopaminergici della SN e dall'area ventrale tegmentale (VTA). In particolare, è stato utilizzato un anticorpo primario policlonale di coniglio diretto contro la tirosina idrossilasi (anti TH, 1:2000, Millipore) e, successivamente, un anticorpo secondario biotinilato di capra (1:200, Millipore) il cui segnale è stato amplificato con l'utilizzo di un sistema avidina-biotina coniugato a perossidasi di rafano (ABC Kit, Vector Laboratories' Vectastain Universal Elite).

A



B



C

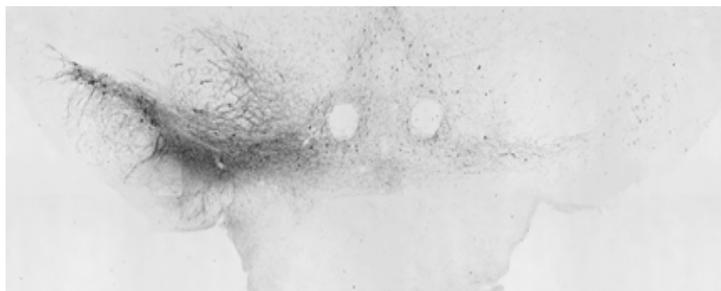


Fig. 6.1) Sezioni coronali di cervello di ratto sottoposte a reazione immunoenzimatica per lo staining dei neuroni dopaminergici della SN e VTA con l'anticorpo diretto contro l'enzima tirosina idrossilasi. **A)** Sham **B)** Iniezione intrastriatale, unilaterale (Dx,) di 6-OHDA (7 μ g/ 3 siti di iniezione) **C)** Iniezione unilaterale (Dx) di 6-OHDA a livello delle fibre dopaminergiche ascendenti (4 μ g).

Il segnale dell'anticorpo è stato rilevato mediante ossidazione della diaminobenzidina tetracloruro (DAB), mediata dalla perossidasi di rafano (HRP). Dopo colorazione le fettine sono state montate su vetrino, quindi ricoperte con un vetrino coprioggetto utilizzando un mezzo montante non acquoso.

L'analisi è stata eseguita al microscopio ottico (Nikon) dotato del software per la conta stereologica (Stereo Investigator, MBF Bioscience). Dopo aver delineato l'area d'interesse (SN) su ciascuna fettina è importante stabilire i parametri che verranno mantenuti costanti per tutta l'analisi e che permettono la stima del numero totale di cellule nella regione anatomica d'interesse. Tali parametri comprendono lo spessore della regione di interesse all'interno del quale le cellule verranno contate (Optical Dissector) per l'analisi tridimensionale del tessuto; le dimensioni del reticolo di conta che ricopre l'intera area d'interesse, le cui maglie avranno dimensioni omogenee in direzione x/y; le dimensioni della *probe* di conta, ossia dell'area all'interno della quale, seguendo opportune regole, le cellule verranno contate. Anche la fase di conta risulta sistematica, per via dei parametri stabiliti e *random* grazie alla rotazione casuale del reticolo di conta su ciascuna fettina.

La stima del numero totale di cellule nell'area esaminata, secondo i principi del Frazionatore Ottico, sarà data dalla seguente formula matematica:

popolazione cellulare totale = numero di cellule contate x $1/ssf$ x $1/asf$ x $1/hsf$

dove *ssf* (*section sampling fraction*) corrisponde alla frazione di campionatura, *asf* (*area sampling fraction*) corrisponde al rapporto tra l'area della *probe* di conta rispetto all'area della griglia di conta; e *hsf* (*height sampling fraction*) corrisponde al rapporto tra lo spessore del tessuto effettivamente sottoposto all'analisi (Optical Dissector) e lo spessore medio delle fettine processate (Glaser et al., 2007).

Tre mutazioni *missense* (A53T; A30P e E46K) a carico della proteina α -sinucleina sono state documentate nei casi ereditari di Parkinson (Polymeropoulos et al., 1997 Kruger et al., 1998). Nel SNC la proteina è ampiamente espressa e localizzata prevalentemente a livello delle vescicole presinaptiche dove contribuisce alla modulazione delle funzioni sinaptiche. È stato dimostrato in vitro che tale proteina manifesta una forte tendenza all'aggregazione (Uversky, 2003), infatti, sebbene nessuna mutazione sia stata rilevata nei casi sporadici di MP l' α -sinucleina è il principale costituente dei corpi di Lewy (Spillantini et al 1998), specialmente la forma fosforilata in serina 129 (Fujiwara et al., 2002). Inoltre, il potenziale neurotossico della proteina è stato documentato in numerosi modelli sperimentali (Kirik et al., 2003).

Durante lo stage formativo all'estero sono stati studiati gli effetti del farmaco ipoglicemizzante Metformina sul grado di fosforilazione della proteina α -sinucleina in modelli sperimentali in vitro.

In un lavoro recente è stata dimostrata la capacità della Metformina di ridurre la fosforilazione della proteina tau che si trova normalmente associata al citoscheletro ed è indispensabile per l'assemblaggio e la stabilizzazione dei microtubuli (Kickstein et al., 2010). La forma iperfosforilata della proteina è il principale componente degli aggregati proteici neurofibrillari caratteristici della patologia di Alzheimer e delle taupatie (Gong et al., 2005).

Nelle nostre condizioni sperimentali, colture cellulari con un fenotipo dopaminergico come le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y e le colture di feocromocitoma di ratto PC12 sono state indotte ad esprimere la proteina α -sinucleina umana *wild-type*, attraverso tecniche di trasfezione transiente. La tecnica utilizzata sfrutta la possibilità di inserire il plasmide all'interno della cellula attraverso la formazione di liposomi, piccole vescicole lipidiche

che inglobano il DNA e sono indotte ad entrare con esso nella cellula simulando i processi di endocitosi cellulare. Nello specifico il reagente di trasfezione utilizzato è la lipofectamina 2000 (Invitrogen), contenente subunità lipidiche in grado di formare liposomi in mezzo acquoso. In alternativa sono stati applicati metodi chimici di trasfezione come quello che utilizza il fosfato di calcio. La procedura prevede il mescolamento di una soluzione tampone contenente ioni fosfato insieme a una soluzione di cloruro di calcio (CaCl_2) e il DNA da trasfettare. Il mescolamento delle due soluzioni produce un precipitato di calcio fosfato, che andrà a legare la molecola di DNA. Il precipitato viene prelevato, risospeso e aggiunto al terreno di coltura. Con un processo ancora non ben noto le cellule legano il precipitato e permettono l'ingresso del DNA.

Il grado di espressione della proteina e le modificazioni post-traslazionali sono state valutate attraverso analisi western-blot. In particolare sono stati utilizzati un anticorpo monoclonale di topo in grado di riconoscere la forma totale della proteina (1:1000, BD Transduction Laboratories) e un anticorpo monoclonale di topo diretto contro la forma fosforilata in serina 129 della sinucleina (1:1000, Wako). Come anticorpi secondari sono stati utilizzati immunoglobuline di capra coniugate con HRP (1:10000) o con fosfatasi alcalina (PA; 1:5000) e dirette contro immunoglobuline di topo.

Le tecniche apprese e le attività svolte durante lo stage formativo, hanno permesso di approfondire lo studio della morte cellulare e dei suoi meccanismi.

BETARBET R, SHERER TB, MACKENZIE G, GARCIA-OSUNA M, PANOV AV, GREENAMYRE JT. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.*; **3**:1301-6.

DAUER W, PRZEDBORSKI S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.*; **39**:889-909. Review.

FERRANTE RJ, SCHULZ JB, KOWALL NW, BEAL MF. (1997) Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. *Brain Res.* **753**:157-62.

FUJIWARA H, HASEGAWA M, DOHMAE N, KAWASHIMA A, MASLIAH E, GOLDBERG MS, SHEN J, TAKIO K, IWATSUBO T. (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.*; **4**:160-4.

FORNO LS, DELANNEY LE, IRWIN I, LANGSTON JW. (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations *Adv Neurol.*; **60**:600-8

GLASER J, GREENE G, HENDRICKS S. (2007) Stereology for Biological Research Wiliston: MBF Press

GONG CX, LIU F, GRUNDKE-IQBAL I, IQBAL K. (2005) Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.*; **112**:813-38. Review.

HÖGLINGER GU, FÉGER J, PRIGENT A, MICHEL PP, PARAIN K, CHAMPY P, RUBERG M, OERTEL WH, HIRSCH EC. (2003) Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem.*; **84**:491-502.

JEON B.S., JACKSON-LEWIS V., BURKE R.E. (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.*; **4**:131-7.

KICKSTEIN E, KRAUSS S, THORNHILL P, RUTSCHOW D, ZELLER R, SHARKEY J, WILLIAMSON R, FUCHS M, KÖHLER A, GLOSSMANN H, SCHNEIDER R, SUTHERLAND C, SCHWEIGER S. (2010) Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **107**:21830-5.

KIRIK D, ANNETT LE, BURGER C, MUZYCZKA N, MANDEL RJ, BJÖRKLUND A. (2003) Nigrostriatal alpha-synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human alpha-synuclein: a new primate model of Parkinson's disease *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **100**:2884-9.

KRÜGER R., KUHN W., MÜLLER T., WOITALLA D., GRAEBER M., KÖSEL S., PRZUNTEK H., EPPLEN J.T., SCHÖLS L., RIESS O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.*; **18**:106-8.

- LUTHMAN J, FREDRIKSSON A, SUNDSTRÖM E, JONSSON G, ARCHER T. (1989) Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage *Behav Brain Res.*;33:267-77.
- POLYMEROPOULOS MH, LAVEDAN C, LEROY E, IDE SE, DEHEJIA A, DUTRA A, PIKE B, ROOT H, RUBENSTEIN J, BOYER R, STENROOS ES, CHANDRASEKHARAPPA S, ATHANASSIADOU A, PAPAPETROPOULOS T, JOHNSON WG, LAZZARINI AM, DUVOISIN RC, DI IORIO G, GOLBE LI, NUSSBAUM RL. (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.*;276:2045-7.
- SAUER H., OERTEL W.H. (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience.*;59:401-15.
- SPILLANTINI MG, CROWTHER RA, JAKES R, HASEGAWA M, GOEDERT M. (1998) alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;95:6469-73.
- TALPADE DJ, GREENE JG, HIGGINS DS JR, GREENAMYRE JT. (2000) In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *J Neurochem.*75:2611-21.
- ULUSOY A, SAHIN G, BJÖRKLUND T, AEBISCHER P, KIRIK D. (2009) Dose optimization for long-term rAAV-mediated RNA interference in the nigrostriatal projection neurons. *Mol Ther.*;17:1574-84.
- UNGERSTEDT U. (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol.*;5:107-10.
- UVERSKY VN. (2003) A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders *J Biomol Struct Dyn.*; 21:211-34. Review.
- WEST MJ. (2002) Design-based stereological methods for counting neurons. *Prog Brain Res.*;135:43-51. Review.

7. Bibliografia

AIKIN R., ROSENBERG L., PARASKEVAS S., AND MAYSINGER D. (2004) Inhibition of caspase-mediated PARP-1 cleavage results in increased necrosis in isolated islets of Langerhans. *J. Mol. Med.* **82**: 389-397.

AITA V.M., LIANG X.H., MURTY V.V., PINCUS D.L., YU W., CAYANIS E., KALACHIKOV S., GILLIAM T.C., LEVINE B. (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* **59**:59-65.

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.

AMANTEA D., RUSSO R., BAGETTA G., CORASANITI M.T. (2005) From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol Res*;**52**:119–32.

AMANTEA D., FRATTO V., MAIDA S., ROTIROTI D., RAGUSA S., NAPPI G., BAGETTA G., CORASANITI M.T. (2009) Prevention of glutamate accumulation and upregulation of phospho-akt may account for neuroprotection afforded by bergamot essential oil against brain injury induced by focal cerebral ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol*;**85**:389–405.

ANDRÉ N., BRAGUER D., BRASSEUR G., GONÇALVES A., LEMESLE-MEUNIER D., GUISE S., JORDAN M.A., BRIAND C. (2000) Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells. *Cancer Res.*; **60**:5349-53.

ANKARCRONA M., DYPBUKT J.M., BONFOCO E., ZHIVOTOVSKY B., ORRENIUS S., LIPTON S.A., NICOTERA P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron.*;**15**:961-73.

ASHKENAZI A., PAI R.C., FONG S., LEUNG S., LAWRENCE D.A., MARSTERS S.A., BLACKIE C., CHANG L., MCMURTREY A.E., HEBERT A., DEFORGE L., KOUMENIS I.L., LEWIS D., HARRIS L., BUSSIÈRE J., KOEPPEN H., SHAHROKH Z., SCHWALL R.H. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest.* **104**: 155-62.

ASSELIN E., MILLS G.B., AND TSANG B.K. (2001) XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.* **61**: 1862-1868.

ATTWELL D., BARBOUR B., SZATKOWSKI M. (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*; **11**:401–7.

- BAGETTA G., DE SARRO G., PRIOLO E., NISTICÒ G. (1988) Ventral tegmental area: site through which dopamine D2-receptor agonists evoke behavioural and electrocortical sleep in rats. *Br J Pharmacol*; **95**:860–6.
- BAGETTA G., MORRONE L.A., ROMBOLÀ L., AMANTEA D., RUSSO R., BERLIOCCHI L., SAKURADA S., SAKURADA T., ROTIROTI D., CORASANITI M.T.. (2010) Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*. **81**:453-61. Review.
- BAI X., CERIMELE F., USHIO-FUKAI M., WAQAS M., CAMPBELL P.M., GOVINDARAJAN B., DER C.J., BATTLE T., FRANK D.A., YE K., MURAD E., DUBIEL W., SOFF G., ARBISER J.L. (2003) Honokiol, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. *J Biol Chem*. **278**:35501-7.
- BAIK J.S, KIM S.S., LEE J.A., OH T.H., KIM J.Y., LEE N.H., HYUN C.G. (2008) Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic citrus species. *J Microbiol Biotechnol.*; **18**:74-9.
- BARTKOWIAK D., HOGNER S., BAUST H., NOTHDURFT W., AND ROTTINGER E. M. (1999) Comparative analysis of apoptosis in HL60 detected by annexin-V and fluorescein-diacetate. *Cytometry* **37**: 191-196.
- BERLIOCCHI L., RUSSO R., LEVATO A., FRATTO V., BAGETTA G., SAKURADA S., SAKURADA T., MERCURI N.B., CORASANITI M.T. (2009) (-)-Linalool attenuates allodynia in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in C57/BL6 mice. *Int Rev Neurobiol*; **85**:221–35.
- BIEDLER J.L., HELSON L., SPENGLER B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.*; **33**:2643-52.
- BJORNSTI M.A., HOUGHTON P.. (2004) The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; **4**:335–348.
- BODNAR A.G., OUELLETTE M., FROLKIS M., HOLT S.E., CHIU C.P., MORIN G.B., HARLEY C.B., SHAY J.W., LICHTSTEINER S., WRIGHT W.E.. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. **279**:349-52.
- BRAZIL D.P., HEMMINGS B.A. (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*; **26**:657–64.
- BROGNARD J., CLARK A.S., NI Y., DENNIS P.A. (2001) Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.*; **61**:3986-97.
- BROOKER D.J., SNAPE M., JOHNSON E., WARD D., PAYNE M. (1997) Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. *Br J Clin Psychol.*; **36**:287-96.

- BRUM L.F., ELISABETSKY E., SOUZA D. (2001) Effects of linalool on [(3)H]MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytother Res.*:**15**:422-5.
- BYKOV V.J., ISSAEVA N., SELIVANOVA G., WIMAN K.G. (2002) Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis*. **23**: 2011-8.
- CAL K. & SZNITOWSKA M. (2003). Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes- in vitro studies. *J. Control. Release* **93**: 369-376.
- CARDONE M.H., ROY N., STENNICKE H.R., SALVESEN G.S., FRANKE T.F., STANBRIDGE E., FRISCH S., REED J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*; **282**:1318–21.
- CARRÉ M., ANDRÉ N., CARLES G., BORGHI H., BRICHESE L., BRIAND C., BRAGUER D. (2002) Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem.*; **277**:33664-9.
- CASIANO, C.A., OCHS, R.L., AND TAN, E.M. (1998) Distinct cleavage products of nuclear proteins in apoptosis and necrosis revealed by autoantibody probes. *Cell Death Differ.*; **5**:183-190.
- CASTEDO M., PERFETTINI J.L., ROUMIER T., ANDREAU K., MEDEMA R., KROEMER G. (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. **23**: 2825-37. Review.
- CHABNER B.A., LONGO D.L., eds. (2006) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practices*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- CHARASSON V., BELLOTT R., MEYNARD D., LONGY M., GORRY P., ROBERT J. (2004) Pharmacogenetics of human carboxylesterase 2, an enzyme involved in the activation of irinotecan into SN-38. *Clin Pharmacol Ther.*; **76**:528-35
- CHEN H., YANG Y., XUE J., WEI J., ZHANG Z., CHEN H. (2011) Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) gilg trees. *Molecules*.; **16**:4884-96.
- 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**:1500-4.
- CHINNAIYAN A.M., PRASAD U., SHANKAR S., HAMSTRA D.A., SHANAIAH M., CHENEVERT T.L., ROSS B.D., REHEMTULLA A. (2000) Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 1754-9.

CHUNTHARAPAI A., DODGE K., GRIMMER K., SCHROEDER K., MARSTERS S.A., KOEPPEN H., ASHKENAZI A., KIM K.J. (2001) Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J Immunol.* **166**: 4891-8.

COFFER PJ & WOODGETT JR (1991) Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* **201**:475-81.

COLDMAN A.J., GOLDIE J.H.. (1987) Impact of dose-intense chemotherapy on the development of permanent drug resistance. *Semin Oncol.*;**14**:29-33.

COLE S.P., BHARDWAJ G., GERLACH J.H., MACKIE J.E., GRANT C.E., ALMQUIST K.C., STEWART A.J., KURZ E.U., DUNCAN A.M., DEELEY R.G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line *Science.*; **258**:1650-4.

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**:518–29.

COSME-BLANCO W., SHEN M.F., LAZAR A.J., PATHAK S., LOZANO G., MULTANI A.S., CHANG S. (2007) Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence *EMBO Rep.* **8**:497-503.

CROWELL P.L., REN Z., LIN S., VEDEJS E., GOULD M.N. (1994) Structure-activity relationships among monoterpene inhibitors of protein isoprenylation and cell proliferation. *Biochem Pharmacol.*; **47**:1405-15.

DATTA SR, BRUNET A, GREENBERG ME. (1999) Cellular survival: A play in three Acts. *Genes Dev*; **13**: 2905–2927.

DALTON W.S., CROWLEY J.J., SALMON S.S., GROGAN T.M., LAUFMAN L.R., WEISS G.R., BONNET J.D.. (1995) A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study. *Cancer.*;**75**:815-20.

DANIAL N.N., KORSMEYER S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell.*; **116**: 205-19. Review

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

DARZYNKIEWICZ, Z., JUAN, G., LI, X., GORCZYCA, W., MURAKAMI, T., AND TRAGANOS, F. (1997) Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**: 1-20.

- DI CRISTOFANO A., PESCE B., CORDON-CARDO C., PANDOLFI P.P. (1998) Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet.*; **19**:348-55.
- DIEHL J.A., CHENG M., ROUSSEL M.F., SHERR C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.*; **12**:3499-511.
- DI MARZO V., BLUMBERG P.M., SZALLASI A. (2002) Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol.*; **12**:372-9.
- DIMRI G.P. (2005) What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell.*; **7**: 505-12. Review.
- DIVE, C., GREGORY, C.D., PHIPPS, D.J., EVANS, D.L., MILNER, A.E., WYLLIE, A.H., (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta*; **1133**: 275-285.
- DONEHOWER L.A., HARVEY M., SLAGLE B.L., MCARTHUR M.J., MONTGOMERY C.A. JR, BUTEL J.S., BRADLEY A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*; **356**: 215-21.
- DRORI S., JANSEN G., MAURITZ R., PETERS G.J., ASSARAF Y.G. (2000) Clustering of mutations in the first transmembrane domain of the human reduced folate carrier in GW1843U89-resistant leukemia cells with impaired antifolate transport and augmented folate uptake. *J Biol Chem.*; **275**:30855-63.
- DUGO P., MONDELLO L., DUGO L., STANCANELLI R., DUGO G. (2000) LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J Pharm Biomed Anal.* **24**:147-54.
- DURLAND-BUSBICE S., REISMAN D. (2002) Lack of p53 expression in human myeloid leukemias is not due to mutations in transcriptional regulatory regions of the gene. *Leukemia.* **16**:2165-7.
- DUTCHER S.K. (2001) The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr Opin Cell Biol.* **13**:49-54. Review.
- EDRIS A.E. (2007) Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res.* **21**:308-23. Review.
- 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.Catl. Cancer Inst.* **76**:323-325.
- ELISABETSKY E., BRUM L.F., SOUZA D.O. (1999) Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine.*; **6**:107-13.

- 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.
- ENGELMAN J.A., LUO J., CANTLEY L.C. (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.*;7:606-19.
- FENG J., PARK J., CRON P., HESS D., HEMMINGS B.A. (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase *J Biol Chem.*; **279**:41189-96.
- FERRELL-TORRY A.T., GLICK O.J. (1993) The use of therapeutic massage as a nursing intervention to modify anxiety and the perception of cancer pain. *Cancer Nurs*; **16**:93–101.
- 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.
- FORBES S. A., TANG G., BINDAL N., BAMFORD S., DAWSON E., COLE C., KOK C. Y., JIA M., EWING R., MENZIES A., TEAGUE J.W., STRATTON M.R., FUTREAL P.A. (2010). COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* **38**: D652-D657.
- FREY T. (1997) Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. *Cytometry* **28**: 253-263.
- FUJITA N., SATO S., KATAYAMA K., TSURUO T. (2002) Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem.*; **277**:28706-13.
- FUKUNAGA K., KAWANO T. (2003) Akt is a molecular target for signal transduction therapy in brain ischemic insult. *J Pharmacol Sci*; **92**:317–27.
- GARLICH J.R., DE P., DEY N., SU J.D., PENG X., MILLER A., MURALI R., LU Y., MILLS G.B., KUNDRA V., SHU H.K., PENG Q., DURDEN D.L. (2008) A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity *Cancer Res.*; **68**:206-15.
- 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.
- GERLAND L.M., PEYROL S., LALLEMAND C., BRANCHE R., MAGAUD J.P., FFRENCH M. (2003) Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging *Exp Gerontol.*; **38**:887-95.

- GIACCONE G.(1994) Small cell lung cancer and topoisomerases. *Anticancer Res.*; **14**:269-76. Review.
- GIACCONE G., PINEDO H.M.(1996) Drug Resistance. *Oncologist.*;1:82-87.
- GILMAN A., PHILIPS F.S. (1946) The biological actions and therapeutic applications of the B-chloroethyl amines and sulfides. *Science*. **103**: 409-15.
- GOBEIL, S., BOUCHER, C. C., NADEAU, D., AND POIRIER, G. G. (2001) Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ*. **8**: 588-594.
- GORBUNOVA V., SELUANOV A., PEREIRA-SMITH O.M. (2002) Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis *J Biol Chem*. **277**: 38540-9.
- GRAVES P.R., YU L., SCHWARZ J.K., GALES J., SAUSVILLE E.A., O'CONNOR P.M., PIWNICA-WORMS H. (2000) The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01 *J Biol Chem*. **275**:5600-5.
- GREEN D.R., AND KROEMER G. (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629.
- GRIMES C.A., JOPE R.S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*;65:391–426.
- GU Y., TING Z., QIU X., ZHANG X., GAN X., FANG Y., XU X., XU R. (2010) Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Toxicology.*;268:19-24.
- GUNN J.M., CLARK M.G., KNOWLES S.E., HOPGOOD M.F., BALLARD F.J. (1977) Reduced rates of proteolysis in transformed cells. *Nature*. **266**:58-60.
- HA H.C., SNYDER S.H. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 13978-82.
- HERCEG Z., WANG Z.Q.(2001) Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *MUTAT RES* , **477**:97-110
- HERSH E.M., METCH B.S., MUGGIA F.M., BROWN T.D., WHITEHEAD R.P., BUDD G.T., RINEHART J.J., CRAWFORD E.D., BONNET J.D., BEHRENS B.C. (1991) Phase II studies of recombinant human tumor necrosis factor alpha in patients with malignant disease: a summary of the Southwest Oncology Group experience. *J Immunother* . **10**: 426-31.
- HIGUCHI Y., ASAUMI J., MURAKAMI J., MATSUZAKI H., WAKASA T., INOUE T., KONOUCHI H., HISATOMI M., YANAGI Y., HONDA Y., SHIGEHARA H., KISHI K.

(2003) Thermoradiotherapy combined with adenoviral p53 gene therapy in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncol Rep.***10**: 415-20.

HOLLSTEIN M., SHOMER B., GREENBLATT M., SOUSSI T., HOVIG E., MONTE-SANO R., HARRIS C.C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.* **24**: 141-6.

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.

HOPKINS A.L. (2008) Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat Chem Biol.*; **4**:682-90. Review

HOTTA M., NAKATA R., KATSUKAWA M., HORI K., TAKAHASHI S., AND INOUE H. (2010) Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *J. Lipid Res.* **51**: 132-139.

HOWLADER N., RIES L.A., MARIOTTO A.B., REICHMAN M.E., RUHL J., CRONIN K.A. (2010) Improved estimates of cancer-specific survival rates from population-based data. *J Natl Cancer Inst.***102**:1584-98.

HSIEH Y.J., WU C.C., CHANG C.J., YU J.S. (2003) Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol.* **194**:363-75

HUANG S., HOUGHTON P.J. (2003) Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol.*; **3**:371-7. Review

HUANG S.M., TEMPLE R.. (2008) Is this the drug or dose for you? Impact and consideration of ethnic factors in global drug development, regulatory review, and clinical practice. *Clin Pharmacol Ther.*; **84**:287-94. Review

ICHIKAWA K., LIU W., ZHAO L., WANG Z., LIU D., OHTSUKA T., ZHANG H., MOUNTZ J.D., KOOPMAN W.J., KIMBERLY R.P., ZHOU T.. (2001) Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med.* **7**: 954-60.

ITANI W.S., EL-BANNA S.H., HASSAN S.B., LARSSON R.L., BAZARBACHI A., GALIMUHTASIB H.U.(2008).Anti colon cancer components from lebanese sage (*Salvia libanotica*) essential oil: Mechanistic basis. *Cancer Biol Ther* **7**.

IWAMARU A., KONDO Y., IWADO E., AOKI H., FUJIWARA K., YOKOYAMA T., MILLS G.B., KONDO S. (2007) Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene.* **26**:1840-51.

IZQUIERDO M.A., SCHEFFER G.L., FLENS M.J., SCHROEIJERS A.B., VAN DER VALK P., SCHEPER R.J.(1996) Major vault protein LRP-related multidrug resistance. *Eur J Cancer.* ;**32A**:979-84. Review.

JAMIESON E.R., LIPPARD S.J. (1999) Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev.* **99**: 2467-98.

JANSSEN K., HORN S., NIEMANN M.T., DANIEL P.T., SCHULZE-OSTHOFF K., FISCHER U. (2009) Inhibition of the ER Ca²⁺ pump forces multidrug-resistant cells deficient in Bak and Bax into necrosis. *J Cell Sci.* **122**: 4481-91.

JEMAL A., SIEGEL R., WARD E., HAO Y., XU J., MURRAY T., THUN M.J. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* **58**: 71-96.

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.

KANOVSKY M., RAFFO A., DREW L., ROSAL R., DO T., FRIEDMAN F.K., RUBINSTEIN P., VISSER J., ROBINSON R., BRANDT-RAUF P.W., MICHL J., FINE R.L., PINCUS M.R. (2001) Peptides from the amino terminal mdm-2-binding domain of p53, designed from conformational analysis, are selectively cytotoxic to transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 12438-43.

KANZAWA T., GERMANO I.M., KOMATA T., ITO H., KONDO Y., KONDO S. (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* **11**:448-57.

KANZAWA T., ZHANG L., XIAO L., GERMANO I.M., KONDO Y., KONDO S.. (2005) Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene.* **24**:980-91.

KARLBERG A.-T., MAGNUSSON K., NILSSON U., (1992). Air oxidation of D-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens. *Contact Dermatitis*; **26**: 332–340.

KARLSON J., BORG-KARLSON A. K., UNELIUS R., SHOSHAN M. C., WILKING N., RINGBORG U., AND LINDER S. (1996) Inhibition of tumor cell growth by monoterpenes in vitro: evidence of a Ras-independent mechanism of action. *Anticancer Drugs*; **7**: 422-429.

KAVALLARIS M., TAIT A.S., WALSH B.J., HE L., HORWITZ S.B., NORRIS M.D., HABER M. (2001) Multiple microtubule alterations are associated with vinca alkaloid resistance in human leukemia cells. *Cancer Res*, **61**:5803-5809.

KAWATA S., NAGASE T., YAMASAKI E., ISHIGURO H., MATSUZAWA Y. (1994) Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Br J Cancer.*; **69**:1015-20.

- KIM S.H., JUHNN Y.S., SONG Y.S.(2007) Akt involvement in paclitaxel chemoresistance of human ovarian cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.*; **1095**:82-9.
- KIM M. S., JEONG E. G., YOO N. J. AND LEE S. H. (2008). Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br. J. Cancer* **98**: 1533-1535.
- KONISHI H, SHINOMURA T, KURODA S, ONO Y AND KIKKAWA U (1994) Molecular cloning of rat RAC protein kinase alpha and beta and their association with protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun* **205**:817-25.
- KORSMEYER S.J. (1999) Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lect.* **95**: 21-41.
- KOTO R., IMAMURA M., WATANABE C., OBAYASHI S., SHIRAISHI 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
- KROEMER G., GALLUZZI L., BRENNER C. (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.*; **87**:99-163. Review.
- KUMMAR S., CHEN H.X., WRIGHT J., HOLBECK S., MILLIN M.D., TOMASZEWSKI J., ZWEIBEL J., COLLINS J., DOROSHOW J.H. (2010) Utilizing targeted cancer therapeutic agents in combination: novel approaches and urgent requirements. *Nat Rev Drug Discov.* **9**:843-56.
- KURZ D.J., DECARY S., HONG Y., ERUSALIMSKY J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* **113**:3613-22.
- LANKIEWICZ S., MARC LUETJENS C., TRUC BUI N., KROHN A.J., POPPE M., COLE G.M., SAIDO T.C., PREHN J.H. (2000) Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem.*; **275**:17064-71.
- LAWRENCE Y.R., WERNER-WASIK M., DICKER A.P. (2008) Biologically conformal treatment: biomarkers and functional imaging in radiation oncology. *Future Oncol.* **4**: 689-704. Review.
- LAZEBNIK Y.A., KAUFMANN S.H., DESNOYERS S., POIRIER G G., AND EARNSHAW W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**: 346-347.
- LEIST M., SINGLE B., CASTOLDI A.F., KÜHNLE S., AND NICOTERA P. (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.*; **185**:1481-1486.

- LEVI G., RAITERI M. (1993) Carrier-mediated release of neurotransmitters. *Trends Neurosci*; **16**:415–9.
- LI L., HAN W., GU Y., QIU S., LU Q., JIN J., LUO J., HU X. (2007) Honokiol induces a necrotic cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Res.* **67**:4894-903.
- LIANG X.H., JACKSON S., SEAMAN M., BROWN K., KEMPKES B., HIBSHOOSH H., LEVINE B. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* **402**:672-6.
- LIANG J., SLINGERLAND J.M. (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*; **2**:339-45. Review.
- LIU S.Y., HWANG B.D., HARUNA M., IMAKURA Y., LEE K.H., CHENG Y.C. (1989) Podophyllotoxin analogs: effects on DNA topoisomerase II, tubulin polymerization, human tumor KB cells, and their VP-16-resistant variants. *Mol Pharmacol.*; **36**:78-82.
- LIZARD G., FOURNEL S., GENESTIER L., DHEDIN N., CHAPUT C., FLACHER M., MUTIN M., PANAYE G., AND REVILLARD J. P. (1995) Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry*; **21**: 275-283.
- LOCK R.B., STRIBINSKIENE L. (1996) Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res.* **56**:4006-12.
- LOEW L.M., TUFT R.A., CARRINGTON W., FAY F.S. (1993) Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria. *Biophys J.*; **65**:2396-407.
- LOTZE M.T., TRACEY K.J. (2005) High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* **5**:331-42. Review
- LOZZIO B.B., LOZZIO C.B. (1977) Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia *Int J Cancer.*; **19**:136.
- LU X.G., FENG B.A., ZHAN L.B., YU Z.H.(2003) D-limonene induces apoptosis of gastric cancer cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi (Chin J Oncol)* **25**:325-327.
- LU X.G., ZHAN L.B., FENG B.A., QU M.Y., YU L.H., XIE J.H.(2004). Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene. *World J Gastroenterol* **10**: 2140-2144.
- LUM J.J., BAUER D.E., KONG M., HARRIS M.H., LI C., LINDSTEN T., THOMPSON C.B. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* **120**: 237-48.

- LUNDBERG A.S., HAHN W.C., GUPTA P., WEINBERG R.A. (2000) Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol.* **12**:705-9. Review
- MAKIN G., DIVE C. (2001) Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol.* **11**:22-6. Review.
- 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.
- MAO J., PRICE D.D., MAYER D.J. (1995) Experimental mononeuropathy reduces the antinociceptive effects of morphine: Implications for common intracellular mechanisms involved in morphine tolerance and neuropathic pain. *Pain*;**61**:353–64.
- MARONE R., CMILJANOVIC V., GIESE B., WYMAN M.P. (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta.*;**1784**:159-85. Review
- MCGINNIS K.M., GNEGY M.E., PARK Y.H., MUKERJEE N., AND WANG K.K. (1999) Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 94-99.
- MCGLYNN L.M., KIRKEGAARD T., EDWARDS J., TOVEY S., CAMERON D., TWELVES C., BARTLETT J.M., COOKE T.G. (2009) Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients *Clin Cancer Res* **15**:1487-95.
- 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.
- 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.
- MICCOLI L., BEURDELEY-THOMAS A., DE PINIEUX G., SUREAU F., OUDARD S., DUTRILLAUX B., POUPON M.F. (1998) Light-induced photoactivation of hypericin affects the energy metabolism of human glioma cells by inhibiting hexokinase bound to mitochondria. *Cancer Res.* **58**: 5777-86.
- MILROY R., (1993) A randomised clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small cell lung cancer. West of Scotland Lung Cancer Research Group, and the Aberdeen Oncology Group. *Br J Cancer*; **68**:813-818
- MINCHINTON A.I., TANNOCK I.F..(2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer.*; **6**:583-92. Review

MIZOGUCHI M., NUTT C. L., MOHAPATRA G. AND LOUIS D. N. (2004). Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol.* **14**: 372-377.

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 injuryrelated neointima formation. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* **13**:120-9.

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., DUGO P., BARTLE K.D., DUGO G., COTRONEO A., (1995). Automated HPLCHRGC: a powerful method for essential oils analysis. Part V. Identification of terpene hydrocarbons of bergamot, lemon, mandarin, sweet orange, bitter orange, grapefruit, clementine and mexican lime oils by coupled HPLC-HRGCMS(ITD). *Flavour Frag. J.* **10**: 33-42.

MONDELLO L., VERZERA A., PREVITI P., CRISPO F. AND DUGO G. (1998) Multi-dimensional 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.

MORRIS S.M., MCGARRITY L.J., DOMON O.E., CHEN J.J., HINSON W.G., BUCCI T.J., WARBRITTON A.R., AND CASCIANO, D.A. (1994) The role of programmed cell death in the toxicity of the mutagens, ethyl methanesulfonate and N-ethyl-N'-nitrosourea, in AHH-1 human lymphoblastoid cells. *Mutat. Res.* **306**: 19-34.

MORRONE L.A., ROMBOLA L., 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**:255-62.

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

NABHA S.M., MOHAMMAD R.M., DANDASHI M.H., COUPAYE-GERARD B., AB-OUKAMEEL A., PETTIT G.R., AL-KATIB A.M. (2002) Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage *Clin Cancer Res.* **8**:2735-41.

NAKATANI K., SAKAUE H., THOMPSON D.A., WEIGEL R.J. AND ROTH R.A. (1999) Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* **257**:906-10

NEUENSCHWANDER U., GUIGNARD F., HERMANS I. (2010) Mechanism of the aerobic oxidation of alpha-pinene. *ChemSusChem.*; **3**:75-84.

NEUMAR R.W., XU Y.A., GADA H., GUTTMANN R.P., SIMAN R. (2003) Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem.*; **278**:14162-7.

NICHOLSON D. W., ALI A., THORNBERRY N. A., VAILLANCOURT J. P., DING C. K., GALLANT M., GAREAU Y., GRIFFIN P. R., LABELLE M., LAZEBNIK Y.A., MUNDAY N. A., RAJU S. M., SMULSON M. E., YAMIN T.-T., YU V. L., AND MILLER D. K. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.

NICOTERA P., LEIST M., FAVA E., BERLIOCCHI L., VOLBRACHT C. (2000) Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol.*; **10**:276-82. Review.

NIGG E.A. (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**:21-32. Review

O'BRIEN S.M., CLAXTON D.F., CRUMP M., FADERL S., KIPPS T., KEATING M.J., VIALLET J., CHESON B.D. (2009) Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **113**: 299-305.

OGASAWARA J., WATANABE-FUKUNAGA R., ADACHI M., MATSUZAWA A., KASUGAI T., KITAMURA Y., ITOH N., SUDA T., NAGATA S. (1993) Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature.* **364**: 806-9.

OKADA H., MAK T.W.. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.* **4**:592-603. Review.

ORMEROD M.G., SUN X.M., BROWN D., SNOWDEN R.T., AND COHEN G.M. (1993) Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol.* **32**:417-424.

ORMEROD M.G., O'NEILL C.F., ROBERTSON D., HARRAP K.R. (1994) Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp Cell Res.* **211**:231-7.

OSSIPOV M.H., LOPEZ Y., NICHOLS M.L., BIAN D., PORRECA F. (1995) The loss of antinociceptive efficacy of spinal morphine in rats with nerve ligation injury is prevented by reducing spinal afferent drive. *Neurosci Lett*; **199**:87-90.

PAGLIN S., HOLLISTER T., DELOHERY T., HACKETT N., MCMAHILL M., SPHICAS E., DOMINGO D., YAHALOM J.(2001) A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*; **61**:439-444.

PANNO M.L., GIORDANO F., MASTROIANNI F., PALMA M.G., BARTELLA V., CARPINO A., AQUILA S., ANDÒ S. (2010) Breast cancer cell survival signal is affected by bergapten combined with an ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.*; **584**:2321-6.

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

PEANA A.T., DE MONTISM G., NIEDDU E., SPANO T.M., SECHI S., D'AQUILA P.S., PIPPIA P. (2004) Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur J Pharmacol*; **485**:165–74.

PERRY N., PERRY E. (2006) Aromatherapy in the management of psychiatric disorders: clinical and neuropharmacological perspectives. *CNS Drugs*; **20**:257–80.

PINEDO H.M., GIACCONE G..(1995) P-glycoprotein--a marker of cancer-cell behavior. *N Engl J Med.*; **333**:1417-9.

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.

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

RABI T., AND BISHAYEE A. (2009) d-Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *J. Carcinog.* **8**: 9.

RAITERI M., BONANNO G., MARCHI M., MAURA G. (1984) Is there a functional linkage between neurotransmitter uptake mechanisms and presynaptic receptors? *J Pharmacol Exp Ther*; **231**:671–7.

RATNAM K., LOW J.A. (2007) Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res.* **13**: 1383-8. Review

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

REARDON D.A., AKABANI G., COLEMAN R.E., FRIEDMAN A.H., FRIEDMAN H.S., HERNDON J.E. 2ND, MCLENDON R.E., PEGRAM C.N., PROVENZALE J.M., QUINN J.A., RICH J.N., VREDENBURGH J.J., DESJARDINS A., GURURANGAN S., BADRUDDOJA M., DOWELL J.M., WONG T.Z., ZHAO X.G., ZALUTSKY M.R., BIGNER D.D. (2006) Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* **12**:860–868.

RESTUCCIA DF& HEMMING S BA. (2010) From man to mouse and back again: advances in defining tumor AKTivities in vivo. *Dis Model Mech.*; **3**:705-20. Review.

REKHA G.K., SLADEK N.E. (1997) Multienzyme-mediated stable and transient multi-drug resistance and collateral sensitivity induced by xenobiotics. *Cancer Chemother Pharmacol.*; **40**:215-24

RICCI M.S., ZONG W.X. (2006) Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* **11**: 342-57. Review.

ROBERSON R.S., KUSSICK S.J., VALLIERES E., CHEN S.Y., WU D.Y. (2005) Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.*; **65**:2795-803.

ROKUDAI S., FUJITA N., HASHIMOTO Y., AND TSURUO T. (2000) Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **182**: 290-296.

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**:110-4.

ROMBOLÁ L., CORASANITI M.T., ROTIROTI D., TASSORELLI C., SAKURADA S., BAGETTA G., MORRONE L.A. (2009) Effects of systemic administration of the essential oil of bergamot (BEO) on gross behaviour and EEG power spectra recorded from the rat hippocampus and cerebral cortex. *Funct Neurol*; **24**:107–12.

RONINSON I.B., CHIN J.E., CHOI K.G., GROS P., HOUSMAN D.E., FOJO A., SHEN D.W., GOTTESMAN M.M., PASTAN I. (1986) Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **83**:4538-42.

RONINSON I.B., BROUDE E.V., CHANG B.D. (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells *Drug Resist Updat.* **4**:303-13. Review.

ROSS D.D., JONECKIS C.C., ORDONEZ J.V., SISK A.M., WU R.K., HAMBURGER A.W., AND NORA R.E. (1989) Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res.* **49**: 3776-3782.

ROSSI D.J., OSHIMA T., ATTWELL D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*; **403**:316–21.

RÖSSIG L., JADIDI A.S., URBICH C., BADORFF C., ZEIHNER A.M., DIMMELER S. (2001) Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol.*; **21**:5644-57.

ROTMAN B., AND PAPERMASTER B. W. (1966) Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **55**: 134-141.

SAIYUDTHONG S., MARSDEN C.A. (2011) Acute effects of bergamot oil on anxiety-related behaviour and corticosterone level in rats. *Phytother Res.*; **25**:858-62.

SAKOWICZ R., FINER J.T., BERAUD C., CROMPTON A., LEWIS E., FRITSCH A., LEE Y., MAK J., MOODY R., TURINCIO R., CHABALA J.C., GONZALES P., ROTH S., WEITMAN S., WOOD K.W. (2004) Antitumor activity of a kinesin inhibitor *Cancer Res.* **64**:3276-80.

SAKURADA T., KATSUMATA K., TAN-NO K., SAKURADA S., KISARA K. (1992) The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*; **31**:1279–85.

SAKURADA T., YOGO H., KATSUMATA K., TAN-NO K., SAKURADA S., KISARA K. (1994) Differential antinociceptive effects of sendide, a NK1-receptor antagonist, and morphine in the capsaicin test. *Brain Res*; **646**:319–22.

SAKURADA T., KUWAHATA H., KATSUYAMA H., KATSUYAMA S., KOMATSU T., MORRONE L.A. (2009) Intraplantar injection of bergamot essential oil into the mouse hindpaw: effects on capsaicin-induced nociceptive behaviors. *Int Rev Neurobiol*; **85**:235–46.

SAKURADA T., MIZOGUCHI H., KUWAHATA H., KATSUYAMA S., KOMATSU T., MORRONE L.A., CORASANITI M.T., BAGETTA G., SAKURADA S. (2011) Intraplantar injection of bergamot essential oil induces peripheral antinociception mediated by opioid mechanism. *Pharmacol Biochem Behav.*; **97**:436-43.

SALOMON A.R., VOEHRINGER D.W., HERZENBERG L.A., KHOSLA C. (2000) Understanding and exploiting the mechanistic basis for selectivity of polyketide inhibitors of F(0)F(1)-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**:14766-71.

SARBASSOV D.D., GUERTIN D.A., ALI S.M., SABATINI D.M. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.*; **307**:1098-101.

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

SCHEFFER G.L., WIJNGAARD P.L., FLENS M.J., IZQUIERDO M.A., SLOVAK M.L., PINEDO H.M., MEIJER C.J., CLEVERS H.C., SCHEPER R.J.(1995) The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med.*; **1**:578-82.

SCHEPER R.J., BROXTERMAN H.J., SCHEFFER G.L., KAAIJK P, DALTON W.S., VAN HEIJNINGEN T.H., VAN KALKEN C.K., SLOVAK M.L., DE VRIES E.G., VAN DER VALK P. (1993) Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.*; **53**:1475-9.

SCHULER M., HERRMANN R., DE GREVE J.L., STEWART A.K., GATZEMEIER U., STEWART D.J., LAUFMAN L., GRALLA R., KUBALL J., BUHL R., HEUSSEL C.P., KOMMOSS F., PERRUCHOUD A.P., SHEPHERD F.A., FRITZ M.A., HOROWITZ J.A., HUBER C., ROCHLITZ C. (2001) Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol.* **19**: 1750-8.

SCHWARTZ P.S., WAXMAN D.J. (2001) Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells. *Mol Pharmacol.* **60**: 1268-79.

SCHWARTZ P.S., HOCKENBERY D.M. (2006) Bcl-2-related survival proteins. *Cell Death Differ.* **13**: 1250-5.

SHAH G.M., SHAH R.G., AND POIRIER G.G. (1996) Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **229**: 838-844.

SHIMAMOTO K., LEBRUN B., YASUDA-KAMATANI Y., SAKAITANI M., SHIGERI Y., YUMOTO N., NAKAJIMA T. (1998) DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol*;**53**:195–201.

SMILEY S.T., REERS M., MOTTOLA-HARTSHORN C., LIN M., CHEN A., SMITH T.W., STEELE G.D. JR, CHEN L.B. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**:3671-5.

STAAL S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5034-5037.

STATTI G.A., CONFORTI F., SACCHETTI G., MUZZOLI M., AGRIMONTI C., MENICHINI F. (2004) Chemical and biological diversity of Bergamot (*Citrus bergamia*) in relation to environmental factors. *Fitoterapia.*;**75**:212-6.

SZALLASI A., CORTRIGHT D.N., BLUM C.A., EID S.R. (2007) The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof- concept. *Nat Rev*;**6**:357–72.

TAGLIARINO C., PINK J.J., DUBYAK G.R., NIEMINEN A.L., BOOTHMAN D.A. (2001) Calcium is a key signaling molecule in beta-lapachone-mediated cell death. *J Biol Chem.* **276**: 19150-9.

TAKIMOTO R., WANG W., DICKER D.T., RASTINEJAD F., LYSSIKATOS J., EL-DEIRY W.S. (2002) The mutant p53-conformation modifying drug, CP-31398, can induce apoptosis of human cancer cells and can stabilize wild-type p53 protein. *Cancer Biol Ther.* **1**: 47-55.

TESNIERE A., PANARETAKIS T., KEPP O., APETOH L., GHIRINGHELLI F., ZIT-VOGEL L., KROEMER G. (2008) Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ.* **15**:3-12.

TEWARI M., QUAN L.T., O'ROURKE K., DESNOYERS S., ZENG Z., BEIDLER D.R., POIRIER G.G., SALVESEN G.S., AND DIXIT, V.M.(1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*; **81**: 801-809.

THORNBERRY N.A., LAZEBNIK Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*; **281**: 1312-6. Review.

TISSERAND R, BALACS T (2000) Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals. London: Churchill Livingstone.

TOLCHER A.W., CHI K, KUHN J., GLEAVE M., PATNAIK A., TAKIMOTO C., SCHWARTZ G., THOMPSON I., BERG K., D'ALOISIO S., MURRAY N., FRANKEL S.R., IZBICKA E., ROWINSKY E. (2005) A phase II, pharmacokinetic, and biological correlative study of oblimersen sodium and docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res.* **11**: 3854-61.

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.

TROTMAN LC, WANG X, ALIMONTI A, CHEN Z, TERUYA-FELDSTEIN J, YANG H, PAVLETICH NP, CARVER BS, CORDON-CARDO C, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, CHI SG, KIM HJ, MISTELI T, JIANG X, PANDOLFI PP. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* **128**: 141-156.

TROTTI D., DANBOLT N.C., VOLTERRA A. (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.*; **19**:328-34. Review

USTA J., KREYDIYYEH S., KNIO K., BARNABE P., BOU-MOUGHLABAY Y., AND DAGHER S. (2009) Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. *Chem. Biol. Interact.* **180**: 39-46.

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

VALKOV N.I., SULLIVAN D.M. (1997) Drug resistance to DNA topoisomerase I and II inhibitors in human leukemia, lymphoma, and multiple myeloma. *Semin Hematol.*; **34**:48-62. Review.

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.

VLAHOS C.J., MATTER W.F., HUI K.Y., BROWN R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*; **269**:5241-8.

VOGELSTEIN B., LANE D., LEVINE A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*.**408**: 307-10.

WALENSKY L.D., KUNG A.L., ESCHER I., MALIA T.J., BARBUTO S., WRIGHT R.D., WAGNER G., VERDINE G.L., KORSMEYER S.J. (2004) Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*. **305**: 1466-70.

WALKER P.R., SMITH C., YONDALE T., LEBLANC J., WHITFIELD JF., SIKORSKA M. (1991). Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in oligonucleotides: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* **1002**: 217-35.

WANG H., OLIVER P., ZHANG Z., AGRAWAL S., ZHANG R. (2003) Chemosensitization and radiosensitization of human cancer by antisense anti-MDM2 oligonucleotides: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* **1002**: 217-35

WANG, S., GAO, J., LEI, Q., ROZENGURT, N., PRITCHARD, C., JIAO, J., THOMAS, G. V., LI, G., ROY-BURMAN, P., NELSON, P. S., LIU X., WU H (2003). Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* **4**, 209- 221.

WEAVER B.A., CLEVELAND D.W. (2005) Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell.* **8**:7-12. Review

WEI A., AND SHIBAMOTO T. (2010) Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 7218-7225.

WEINSTEIN R.S., JAKATE S.M., DOMINGUEZ J.M., LEOVITZ M.D., KOUKOULIS G.K., KUSZAK J.R., KLUSENS L.F., GROGAN T.M., SACLARIDES T.J., RONINSON I.B. (1991) Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res.*; **51**:2720-6.

WIDMANN C., GIBSON S., AND JOHNSON G. L. (1998) Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J. Biol. Chem.* **273**: 7141-7147.

- WILKINSON S.M., LOVE S.B., WESTCOMBE A.M., GAMBLES M.A., BURGESS C.C., CARGILL A. (2007) Effectiveness of aromatherapy massage in the management of anxiety and depression in patients with cancer. A multi center randomized controlled trial. *J Clin Oncol*; **25**:532–9.
- WYMAN MP, ZVELEBIL M AND LAFFARGUE M (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling. Which way to target? *Trends Pharmacol Sci* **24**:366-76.
- XIE X., ZHAO X., LIU Y., ZHANG J., MATUSIK R.J., SLAWIN K.M., SPENCER D.M. (2001) Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res.* **61**: 6795-804.
- XU J., LIU D., AND SONGYANG Z. (2002) The role of Asp-462 in regulating Akt activity. *J. Biol. Chem.* **277**: 35561-35566.
- YANG Y.P., KUO H.S., TSAI H.D., PENG Y.C., LIN Y.L. (2005) The p53-dependent apoptotic pathway of breast cancer cells (BC-M1) induced by the bis-type bio-reductive compound aziridinyl-naphthoquinone *Breast Cancer Res.* **7**:R19-27
- YANG M.S., TSE W.K., YU L.C., LI K.M., MAK N.K., GUPTA R.C. (2006) Energy and redox States in the c6 glioma cells following acute exposure to Zn, Se(+4), and Se(+6) and the correlation with apoptosis. *Toxicol Mech Methods.*; **16**:13-9.
- YOON W.J., LEE N.H., AND HYUN C.G. (2010) Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J. Oleo Sci.* **59**: 415-421.
- ZAYNOUN S.T., JOHNSON B.E., AND FRAIN-BELL W. (1977) A study of oil of bergamot and its importance as a phototoxic agent. I. Characterization and quantification of the photoactive component. *Br. J. Dermatol.* **96**: 475-482.
- ZHAO H., SHIMOHATA T., WANG J.Q., SUN G., SCHAAL D.W., SAPOLSKY R.M., STEINBERG G.K. (2005) Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*; **25**:9794–806.
- ZHOU J., GIANNAKAKOU P. (2005) Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.*; **5**:65-71. Review.
- ZONG W.X., DITSWORTH D., BAUER D.E., WANG Z.Q., THOMPSON C.B.(2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.***18**: 1272-82.
- ZONG W.X., THOMPSON C.B. (2006) Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* **20**: 1-15. Review

Produzione scientifica

Comunicazioni a congressi

MAIDA S. , CIOCIARO A. , SAKURADA S. , SAKURADA T. , ROTIROTI D. , BAGETTA G. , CORASANITI M. T. , " Evaluation of cytotoxicity of bergamot essential oil and of its major constituents in human neuroblastoma cell cultures: components of the phytochemical synergize to cause cell death". Atti del convegno "XI Workshop On Apoptosis in Biology and Medicine", Educational Building, Tohoku Pharmaceutical University, Sendai, Japan, September 12th-14th, 2008.

RUSSO R. , CAVALIERE F. , CIOCIARO A. , MAZZEI C. , NUCCI C. , BAGETTA G. , CORASANITI M. T. , MORRONE L. A. , " PI-3K/Akt pro-survival pathway is modulated by retina ischemia/reperfusion induced by high intraocular pressure (HIOP) in rat.". Contributo a 6th FENS forum of European Neuroscience, Geneva, Switzerland, 12-16 July 2008.

RUSSO R. , NUCCI C. , CIOCIARO A. , CAVALIERE F. , CERULLI A. , FAZZI E. , BAGETTA G. , CORASANITI M. T. , " Evidence That High Intraocular Pressure (IOP)-Induced Retina Ischemia/Reperfusion Modulates PI-3K/Akt Pro-Survival Pathway in Rat". Contributo a ARVO 2008 Annual Meeting, Fort Lauderdale, Florida, 27/04 -01/05 2008

CIOCIARO A. , MAIDA S. , RUSSO R. , BERLIOCCHI L. , RAGUSA S. , ROTIROTI D. , BAGETTA G. , CORASANITI M. T. , " Antiproliferative and cytotoxic effects elicited by the essential oil of bergamot in human neuroblastoma cell cultures". Contributo a XII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine, Parghelia(VV), Calabria, Italy, May 20-22 2009.

CIOCIARO A. , MAIDA S. , RUSSO R. , BERLIOCCHI L. , RAGUSA S. , ROTIROTI D. , BAGETTA G. , CORASANITI M. , " Exploitation of the essential oil of bergamot in cell-cycle progression, cell proliferation and viability studies in cultured human SH-SY5Y neuroblastoma cells". Contributo a 34' Congresso Nazionale della Societa' di Farmacologia, Rimini, October 14-17 2009.

Pubblicazioni

BERLIOCCHI L, CIOCIARO A, RUSSO R, CASSIANO MG, BLANDINI F, ROTIROTI D, MORRONE LA, CORASANITI MT. (2011) Toxic profile of bergamot essential oil on survival and proliferation of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Food Chem Toxicol.*; **49**:2780-92.