

ALOE EMODINA: UNA MOLECOLA AD AZIONE CITOTOSSICA DI POTENZIALE INTERESSE NELLA TERAPIA ONCOLOGICA

Giorgio Cinque (a), Marisa Colone (b), Maria Luisa Dupuis (b), Annarita Stringaro (b)
(a) *Dipartimento di Medicina, Laboratorio di Biochimica, Università degli Studi di Udine, Udine*
(b) *Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Introduzione

Il termine “tumore”, o più generalmente “neoplasia”, indica un gruppo di cellule che crescono in maniera incontrollata rispetto ai tessuti sani e continuano tale crescita anche dopo la cessazione degli stimoli che ne hanno causato lo sviluppo anomalo. Questa la definizione coniata dal patologo australiano Rupert Allan Willis. Tale definizione è tuttavia oggi molto contrastata e criticata poiché non sempre tale patologia è progressiva. Il termine “tumore” nasce dal fatto che frequentemente esso si presenta sotto forma di una massa cellulare come se si trattasse di un rigonfiamento (*tumor*=rigonfiamento). Il termine neoplasia invece mette in risalto le caratteristiche biologiche di tale patologia costituita da cellule di “nuova formazione”.

Attualmente con tale termine si fa riferimento a un processo patologico caratterizzato dall’abnorme accrescimento di un tessuto, che determina la comparsa di una tumefazione localizzata, con disturbi legati a distruzione del tessuto normale preesistente e quindi a perdita di funzioni specifiche, o legati a compressione di strutture vicine, o a ostruzione di visceri cavi con ristagno dei secreti in essi contenuti. Così definiti i tumori comprendono processi patologici di natura diversa, quali iperplasie, displasie, malformazioni, cisti, processi infiammatori cronici: in senso più ristretto il termine è inteso, in patologia, come sinonimo di neoformazione o neoplasia, a indicare un particolare tipo di proliferazione cellulare caratterizzata dal fatto di essere più o meno autonoma rispetto ai meccanismi che in condizioni normali regolano la proliferazione dei tessuti, e dal fatto di presentare alterazioni di vario tipo nella differenziazione cellulare e nell’organizzazione del tessuto. Ciò dipende da una o più mutazioni a carico del DNA. Questa è la caratteristica comune a tutte le forme di tumore. Esistono tuttavia differenze, anche significative, tra un tumore e un altro a seconda degli organi o dei tessuti in cui si sviluppa. Il tumore può presentarsi in forma solida e liquida. Nel primo caso le cellule che diventano tumorali appartengono a tessuti, come quello polmonare o le ossa. I tumori liquidi sono invece quelli del sangue. Così, il tumore può svilupparsi in qualsiasi distretto corporeo e, sebbene l’incidenza sia maggiore con l’avanzare dell’età, nemmeno gli individui più giovani ne sono immuni. In base al loro grado di aggressività, possiamo distinguere due tipologie di tumore: quelli benigni, a crescita lenta e non in grado di invadere gli altri distretti corporei, e quelli maligni, comunemente chiamati cancro, caratterizzati da crescita rapida e alta capacità di invasione degli altri organi.

Il processo che trasforma una cellula sana in una neoplastica prende il nome di “carcinogenesi”. L’innesco di questo sviluppo anomalo è causato da una o più mutazioni a carico delle unità funzionali del nostro DNA, i geni: quando risultano alterati proprio quelli deputati al controllo della replicazione della cellula, è lì che il processo di carcinogenesi ha inizio. I fattori che causano tali mutazioni possono essere intrinseci che estrinseci alla cellula, tra questi ultimi i più famosi sono senz’altro: gli inquinanti ambientali, gli agenti industriali, la dieta, il tabacco e

l'alcol. Una cellula trasformata non costituisce di per sé un pericolo a meno che uno stimolo esterno non ne promuova la crescita selettiva. Questo dà origine a un clone preneoplastico che, se non trattato, può evolvere ulteriormente fino alla sua conversione maligna: è in questo stadio che il tumore può stimolare la formazione di un proprio circolo sanguigno (angiogenesi) e invadere altri organi all'interno del nostro organismo mediante il processo di metastatizzazione.

Il nostro organismo è in grado di mettere in atto una serie di risposte per contrastare la crescita neoplastica. I primi eventi di trasformazione delle cellule sono le mutazioni a carico dei geni, la cellula interrompe il ciclo cellulare per consentire la riparazione di tali geni e la proteina che media l'intero processo si chiama p53. Anche il sistema immunitario interviene per arginare lo sviluppo delle neoplasie, ma spesso le cellule neoplastiche sono in grado di "evadere" alla sua azione. Una delle risposte più efficaci è rappresentata dall'innescò dell'apoptosi, un programma di morte cellulare programmata operato da alcuni geni, inducendo la degenerazione progressiva del nucleo e successivamente della membrana cellulare che si conclude con l'eliminazione della cellula stessa.

Laddove le risposte dell'organismo non sono sufficienti a fermare lo sviluppo del tumore, l'intervento terapeutico esterno si rivela necessario. Le terapie variano a seconda del tipo di neoplasia e del suo grado di sviluppo e i trattamenti oggi più comuni per debellare il cancro includono:

1. Chirurgia: rimozione del tessuto tumorale e prelievi biotici di campioni istologici da analizzare in istopatologia, immunoistochimica e biologia molecolare.
2. Radioterapia: uccisione delle cellule tumorali mediante le radiazioni ionizzanti come i raggi X.
3. Chemioterapia: impiego di sostanze citotossiche in grado di interferire con la crescita cellulare; la loro azione sarà maggiore nei confronti delle cellule tumorali, proprio perché si riproducono più velocemente rispetto alle cellule sane.
4. Immunoterapia: attivazione del sistema immunitario, mediante anticorpi costruiti "ad hoc" che sono in grado di modulare il funzionamento del sistema immunitario.

Per quanto riguarda la chemioterapia purtroppo questa non è specifica per le cellule neoplastiche, anche le cellule sane vengono danneggiate inducendo una serie di effetti collaterali che possono essere più o meno gravi. Per ovviare a questo problema e per aggredire le neoplasie "resistenti" negli ultimi anni si sono sviluppate nuove terapie "a bersaglio cellulare" che utilizzano gli anticorpi o molecole designate per colpire solo le cellule tumorali e, più recentemente, con meccanismi di azione diversi, l'immunoterapia ha ottenuto significativi successi nella terapia di molti tumori tra cui i melanomi.

Molecole di origine naturale

In questi ultimi anni, sempre più spesso recentemente si fa ricorso anche alla terapia integrata, in cui la chemioterapia viene affiancata dall'utilizzo di sostanze di origine naturale che agiscono rinforzando il sistema immunitario. Tra queste ricordiamo la *Boswellia serrata* (Ammon, 2010) e il Resveratrolo (Feng, 2002).

Negli ultimi anni la ricerca in campo biomedico si è concentrata sullo studio delle sostanze di origine naturale come possibili agenti chemiosensibilizzanti.

Piante, funghi, organismi marini e batteri

Piante e funghi sono gli organismi da cui si recupera la frazione maggiore di molecole candidate a questi studi. Nel 1940 è stato isolato il primo antibiotico antitumorale, l'actinomicina D, dal fungo *Actinomyces antibioticus* (Waksman, 1941). Da allora, molte sostanze di origine naturale sono state sottoposte a studi *in vitro* e *in vivo* per valutarne la capacità di contrastare lo sviluppo dei tumori o migliorare l'indice terapeutico della chemioterapia a cui sono sottoposti i pazienti oncologici. Negli ultimi anni i tassani, derivati dalle piante appartenenti al genere *Taxus*, sono stati oggetto di numerosi studi; il paclitaxel, un semi-sintetico del tassolo, è utilizzato per la cura di numerosi tumori, tra cui quello al seno; il gruppo di ricerca del dottor Bernardo ha condotto dei *trials* clinici per dimostrare l'efficacia delle nanoparticelle di paclitaxel, legate all'albumina, per contrastare i tumori al seno in stadio avanzato, e i risultati sono stati molto incoraggianti (Bernardo, 2017). Ricordiamo inoltre, che anche dalla *Vinca roseus* si ottengono alcuni alcaloidi oggi approvati per l'utilizzo contro numerosi tumori: la vincristina, la vinblastina e la vinorelbina. Più recentemente la vinflunina, un alcaloide ottenuto dalla fluorazione della vinblastina, è stato registrato tramite procedura centralizzata europea per il trattamento di seconda linea del tumore della vescica, dopo fallimento di un regime a base di 4-6 cicli di cisplatino e gemcitabina (Sidaway, 2017).

Inoltre, da numerosi organismi marini derivano sostanze che oggi sono oggetto di studio in *trials* clinici per il trattamento di numerose tipologie di cancro. Tra le sostanze di origine marina citiamo: l'aplidina, la dolastatina 10, la didemmina B, il kahalalide F e l'elasidepsina (Negi, 2016).

Altre sostanze naturali sono state isolate anche dai batteri; tra questi ricordiamo gli eptiloni, provenienti da *Sorangium cellulosum*; gli eptiloni A e B sono oggetto di *trials* clinici (Nobili, *et al.*, 2009). Dall'albero cinese *Camptotheca acuminata* si possono ottenere due derivati semi-sintetici: il topotecano e l'irinotecano. Quest'ultimo, veicolato nei liposomi, è stato approvato per l'utilizzo nei pazienti affetti da adenocarcinoma del pancreas in fase metastatica, in combinazione con altri due composti, il 5-fluorouracile e la leucovorina (Lamb, 2017). Tra le molecole oggetto di numerosissimi studi c'è la curcumina, estratta dalla *Curcuma longa*: diversi gruppi di ricerca stanno mettendo a punto una formulazione ideale per la cura del cancro al seno (Tajbakhsh, 2017).

Anche sul resveratrolo, un polifenolo presente nell'uva rossa, soprattutto nei suoi acini, si stanno conducendo numerosi *trials* clinici per valutarne l'efficacia contro alcuni tumori, sebbene questa molecola, a fronte di un'alta attività biologica, mostri una bassa biodisponibilità (Tomè-Carneiro, 2013).

Aloe emodina

Tra le sostanze naturali in grado di inibire la vitalità delle cellule neoplastiche vi è anche l'aloemodina che è stata protagonista di numerosi studi negli ultimi anni.

Questa molecola si ottiene dal gel dell'aloè, una pianta a fiore tipica dei climi secchi e aridi. Delle circa 600 specie di *Aloe* classificate, quella più nota è senza dubbio *Aloe vera*. Il gel contenuto nelle sue foglie, le cui proprietà organolettiche sono note sin dai tempi dell'antichità, racchiude ben 75 principi potenzialmente attivi (Atherton, 1997; Shelton 1991; Atherton, 1998) appartenenti a diverse classi molecolari tra cui: minerali, enzimi, zuccheri, acidi grassi, ormoni e metaboliti secondari.

Tra le molecole appartenenti a quest'ultima classe sono presenti gli antrachinoni, di cui fa parte l'aloemodina. È stata già ampiamente dimostrata la capacità di questa molecola di contrastare lo sviluppo di molte neoplasie attraverso diversi meccanismi come l'avvio del processo apoptotico delle cellule tumorali (Chen, 2007) e l'induzione del differenziamento cellulare (Guo, 2007). Inoltre, è stato dimostrato che l'aloemodina è in grado di inibire la

proliferazione delle cellule murine B16-F10 (melanoma della pelle) aumentando la loro capacità di adesione al substrato (Tabolacci, 2010).

L'obiettivo principale del nostro lavoro è stato quello di studiare il meccanismo di azione dell'aloè emodin su una linea cellulare tumorale di adenocarcinoma mammario umano, denominata SKBR3. Lo studio è stato condotto trattando questa linea con l'aloè emodina a diversi tempi e concentrazioni. Per valutare l'effetto che questa molecola ha sulle cellule SKBR3 è stato condotto un saggio biochimico-colorimetrico chiamato MTT. Inoltre, per visualizzare le alterazioni morfologico-ultrastrutturali a carico di queste cellule, dopo il trattamento con aloè emodina, sono state condotte osservazioni al microscopio elettronico a scansione (*Scanning Electron Microscope*, SEM).

Inoltre l'aloè emodina ha la capacità di modulazione dell'immunità e potrebbe essere utile nel trattamento di varie malattie infiammatorie (Lu, 2009). Tuttavia il ruolo della aloè emodina nella modulazione delle risposte immunitarie umane non è ancora del tutto noto. L'altro obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la capacità dell'aloè emodina di modulare la risposta immunitaria delle cellule T. A questo scopo, sono stati reclutati soggetti sani per valutare la capacità dell'aloè emodina di modulare i suoi effetti sulle funzioni delle cellule T (cioè apoptosi, proliferazione e produzione di citochine) attraverso l'analisi citofluorimetrica.

Materiali e metodi

Colture cellulari

Gli esperimenti sono stati condotti su cellule SKBR3, una linea tumorale umana isolata per la prima volta nel 1970 da un versamento pleurico in una donna caucasica di 43 anni affetta da adenocarcinoma della mammella. Questa linea, in particolare, è stata fornita dalla ATCC (*American Type Culture Collection*).

Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (*EuroClone*) addizionato con il 10% di siero fetale bovino (Fetal Bovine Serum, FBS) (*HyClone*, *Thermo Scientific*), 1% di penicillina-streptomina, 1% di L-glutammina (*EuroClone*), 1% di amminoacidi non essenziali (*EuroClone*), incubate a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂ e sub-coltivate a confluenza usando tripsina/ acido etilendiamminotetraacetico (EDTA).

Aloè emodina

L'aloè emodina (1,8-diidrossi-3-(idrossimetil)-9,10-antracenedione) (Figura 1) della Sigma-Aldrich è mantenuta in una soluzione 50 mg/mL con DMSO (dimetilsolfossido).

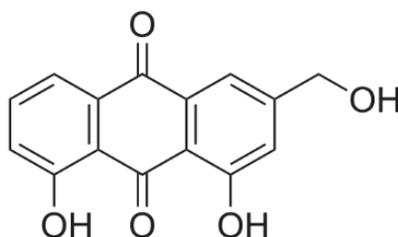


Figura 1. Struttura dell'aloè emodina (1,8-diidrossi-3-(idrossimetil)-9,10-antracenedione)

Test di citotossicità

La citotossicità è la capacità posseduta da un agente di tipo chimico, fisico o biologico di causare danno a una cellula. Per valutare l'entità di questo danno, sono stati messi a punto alcuni saggi, tra cui quello da noi utilizzato, è il saggio con MTT. L'acronimo indica il composto chimico utilizzato per eseguirlo (bromuro di dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio). Le cellule sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti e trattate a concentrazioni e tempi crescenti, in triplicato. Terminato il trattamento, viene aggiunta la soluzione di MTT 0,5 mg/mL in tampone fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) e le cellule vengono nuovamente incubate per 1-3 ore a 37°C affinché si formi il sale di formazano. Le cellule vive sono in grado di assumere questo composto e convertirlo, grazie a un enzima contenuto nei mitocondri, in cristalli di formazano dal colore blu-violaceo. Quante più cellule sono sopravvissute, tanto maggiore sarà la frazione di mitocondri metabolicamente attivi e, di conseguenza, la proporzione di MTT convertito in formazano. Al termine, il sale viene solubilizzato in una soluzione di DMSO e la piastra viene letta al luminometro per misurare l'assorbanza a 570 nm. Quello utilizzato per la lettura è un *Fusion Universal Microplate Analyzer* della *Packard* in dotazione presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Analisi statistica

Il saggio con MTT è stato ripetuto in maniera indipendente per tre volte per ogni linea cellulare. I risultati sono stati quindi rappresentati come media \pm deviazione standard. L'analisi statistica è stata effettuata con il t-test e le differenze sono state considerate significative per $p < 0,05$.

Microscopia elettronica a scansione

La microscopia elettronica a scansione permette lo studio della morfologia di superficie di campioni biologici opportunamente preparati e delle eventuali modificazioni indotte, ad esempio, dal trattamento con agenti di varia natura.

L'osservazione delle cellule al SEM prevede una preparazione del campione. Le cellule sono state seminate nelle piastre da 12 pozzetti su vetrini da microscopia da 13 mm. Dopo aver rimosso il terreno, la fissazione è stata effettuata con glutaraldeide al 2,5% (si lega alle proteine delle cellule) e tetrossido di osmio (OsO₄) all'1% preparati entrambi in tampone cacodilato 0,2 M (pH 7,2).

Dopo i lavaggi con lo stesso tampone, è stata effettuata la disidratazione dei campioni in concentrazioni crescenti di etanolo in acqua. La successiva fase di essiccamento è stata eseguita mediante l'essiccamento da punto critico (*Critical Point Dryer*, CPD). I campioni quindi sono stati montati sugli stubs di alluminio e resi conduttivi grazie alla ricopertura con d'oro utilizzando lo *Sputtering* (SCD 040 Balzers). I campioni sono stati osservati e fotografati al SEM. Nel nostro studio è stato utilizzato il SEM FEI Quanta Inspect FEG (FEI, USA) in dotazione presso l'ISS.

Isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico e colture cellulari

Le cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC), ottenute da campioni di sangue di donatori sani trattati con l'eparina, sono state isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità *Ficoll-Hypaque* e coltivate in terreno RPMI-1640 (Gibco

BRL, Grand Island, NY, USA) addizionato con il 10% di siero fetale bovino (Hyclone Laboratories, South Logan, UT, USA), 2 mM di glutammina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 50 µg/mL di gentamicina (Sigma). Per l'attivazione dei linfociti, i PBMC sono stati coltivati in presenza di anticorpo monoclonale anti-CD3 legato alla piastra (mAb, clone UCHT1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) a 4 µg/mL per 72 h e trattati con Aloe Emodin per le ultime 48 h di coltura. Per la produzione di citochine, le PBMC non trattate o trattate sono state stimolate come segue: per l'analisi di IFN- γ e TNF- α , 25 ng/mL di forbolo miristato acetato (PMA, Sigma) e 1 µg/mL di ionomicina (Sigma) per l'ultimo 16 h di coltura; per l'analisi dell'IL-17, 50 ng/mL di PMA (Sigma) e 1 µg/mL di ionomicina (Sigma) per le ultime 4 ore di coltura; e per IL-10, 2,5 µg/mL di fitoemoagglutinina (Sigma) per le ultime 16 ore di coltura. Per inibire la secrezione di citochine, sono stati aggiunti 10 µg/mL di brefeldina A (Sigma) a ciascuna condizione all'inizio della stimolazione.

Citofluorimetria

La fenotipizzazione della superficie cellulare è stata eseguita mediante citometria a flusso. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (mAb): anti-CD4 coniugati con allofococianina (APC), anticorpi anti-CD8 coniugati con peridina clorofilla (PerP) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). La stessa quantità dell'isotipo di controllo, IgG di topo, è stata usata in parallelo. Per l'analisi della produzione di citochine, le cellule trattate sono state fissate con paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con soluzione permeabilizzante FACS (BD Biosciences) per il rilevamento dell'IFN- γ , TNF- α , e IL-10 mentre per l'IL-17 le cellule sono state fissate e permeabilizzate con fissativo intracellulare e tampone di permeabilizzazione dell'*eBioscience* (eBioscience, San Diego, CA, USA). Sono stati utilizzati i seguenti mAb specifici per le citochine: anti-IFN- γ marcato con fluoresceina isotiocianato (FITC), anti-TNF- α marcato con PE, anti-IL-10 marcato PE (tutti da BD Biosciences) e anti-IL-17 marcato FITC (eBioscience). In parallelo sono stati utilizzati appropriati controlli isotipici negativi. L'apoptosi è stata quantificata utilizzando il kit di rilevamento dell'annessina V (AV) coniugata con FITC e dello ioduro di propidio (PI) (Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, USA) secondo il protocollo della casa produttrice. La proliferazione è stata valutata misurando l'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 utilizzando mAb Ki-67 marcato con FITC secondo il protocollo della casa produttrice (BD Biosciences). L'acquisizione è stata eseguita su un citometro a flusso FACSCalibur (BD Biosciences) e sono stati eseguiti almeno 50.000 eventi per campione. I dati sono stati analizzati utilizzando il software Cell Quest Pro (BD Biosciences).

Risultati

Effetto dell'aloë emodina sulla vitalità delle cellule SKBR3

Nella Figura 2 sono mostrati i risultati del saggio MTT ottenuti dopo incubazione (per 24 e 48 ore) con aloë emodina alla concentrazione di 6,25; 12,5 e 25,0 µM. Come si può osservare l'aloë emodina è in grado di inibire la crescita delle cellule SKBR3 in maniera tempo e dose-dipendente. Infatti, l'effetto citotossico dell'aloë emodina, con una significativa riduzione della vitalità cellulare, è maggiore nelle cellule SKBR3 trattate con aloë emodina alla concentrazione più alta (25,0 µM) per 48 ore. La percentuale di vitalità cellulare (esaminata con test MTT) è stata calcolata considerando il valore di controllo come 100%.

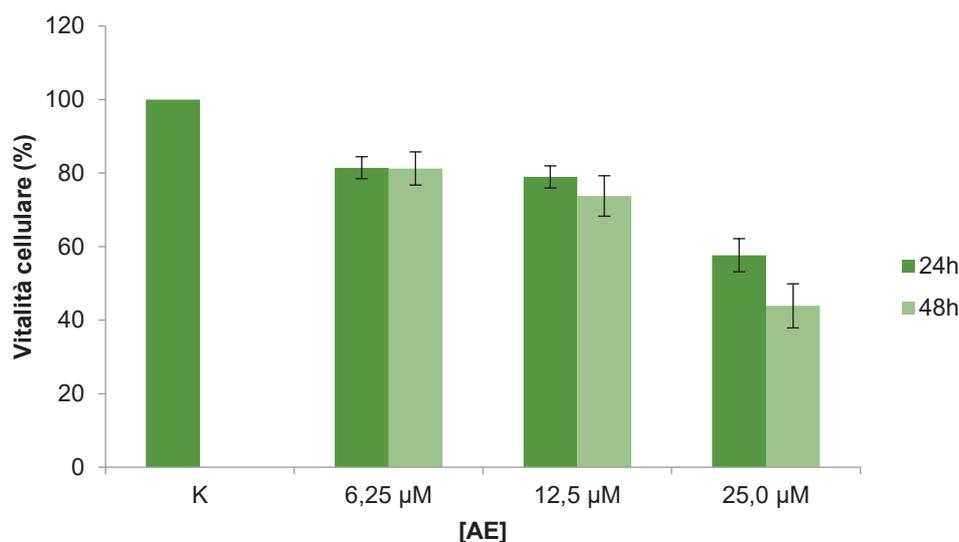


Figura 2. Saggio MTT ottenuti sulle cellule di adenocarcinoma mammario umano, SKBR3 dopo incubazione (24 e 48 ore) con aloe emodina alla concentrazione di 6,25; 12,5 e 25,0 µM

Alterazioni morfologiche indotte dal trattamento con Aloe emodin

Nel corso del nostro lavoro sperimentale abbiamo inoltre osservato al SEM le alterazioni morfologico-ultrastrutturali delle cellule SKBR3 dopo incubazione con aloe emodina (6,25; 12,5 e 25,0 µM per 24 e 48 ore). La Figura 3a mostra le cellule SKBR3 di controllo con la loro tipica morfologia poligonale. Sulla superficie cellulare sono ben visibili i numerosi microvilli e “ruffles” distribuiti in modo casuale sulla loro superficie cellulare. Il trattamento con aloe emodina a 6,25 µM per 24 ore non causa significative alterazioni morfologiche, infatti in Figura 3b le cellule SKBR3 appaiono molto simili alle cellule di controllo (Figura 3a) confermando che l’aloe emodina a questa concentrazione non è citotossica come già dimostrato dai dati ottenuti con il saggio MTT (Figura 2). Minime alterazione morfologiche (cellule meno adese al substrato con microvilli non uniformemente distribuiti sulla superficie cellulare) si possono rilevare nelle cellule tumorali trattate per 24 ore con aloe emodina alla concentrazione più alta (25,0 µM), come mostrato nelle Figure 3c e d (ingrandimento dell’inserto della Figura 3c). Le alterazioni morfologiche ultrastrutturali più evidenti, si osservano invece nelle cellule SKBR3, trattate con aloe emodina al 25,0 µM per 48 ore, (Figure 4c-d). Le microfotografie acquisite al SEM mostrano che alcune cellule appaiono arrotondate e parzialmente staccate dal substrato; in altre si possono osservare anche le “bolle” (*bleb* in inglese) ovvero i caratteristici rigonfiamenti della membrana cellulare presenti sulla superficie delle cellule in cui si è attivato il processo di morte cellulare per apoptosi (Figura 4c, frecce). È noto infatti che durante il processo apoptotico il citoscheletro della cellula subisce dei seri danni che causano il rigonfiamento della membrana plasmatica con la formazione delle “blebs” di superficie. In Figura 4d, l’ingrandimento dell’inserto evidenziato nella Figura 4c, mostra che il trattamento con aloe emodina a 25,0 µM causa in alcune cellule delle alterazioni morfologiche molto particolari: queste mostrano delle estroflessioni filiformi che escono dalla membrana.

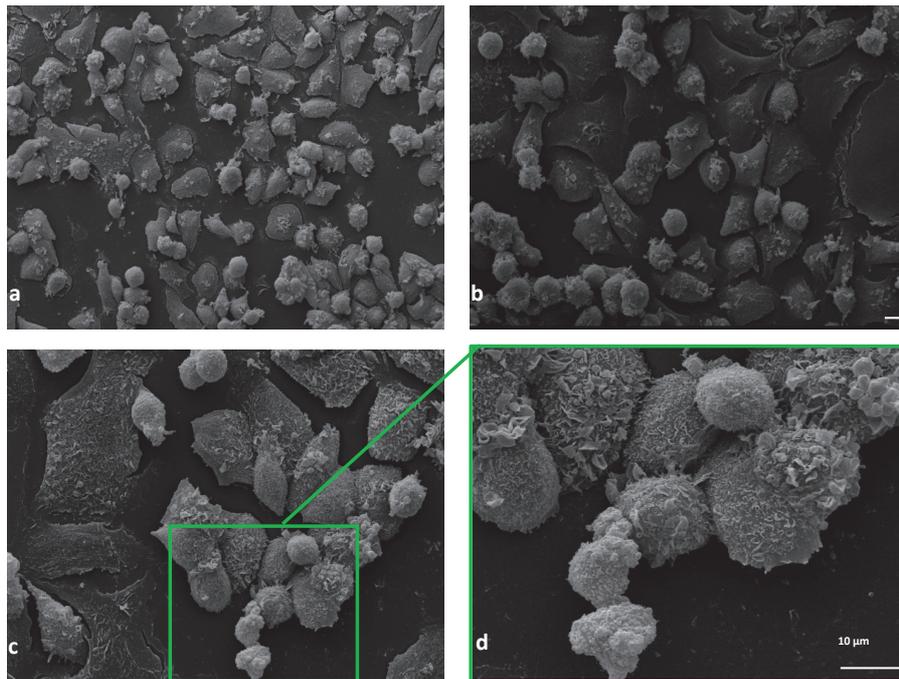


Figura 3. Microfotografie SEM delle cellule SKBR3: a) cellule di controllo; b) cellule SKBR3 trattate con 6,25 µM di aloe emodina per 24 ore; c) cellule SKBR3 trattate con 25,0 µM di aloe emodina per 24 ore e d) ingrandimento dell'inserto della Figura 3c

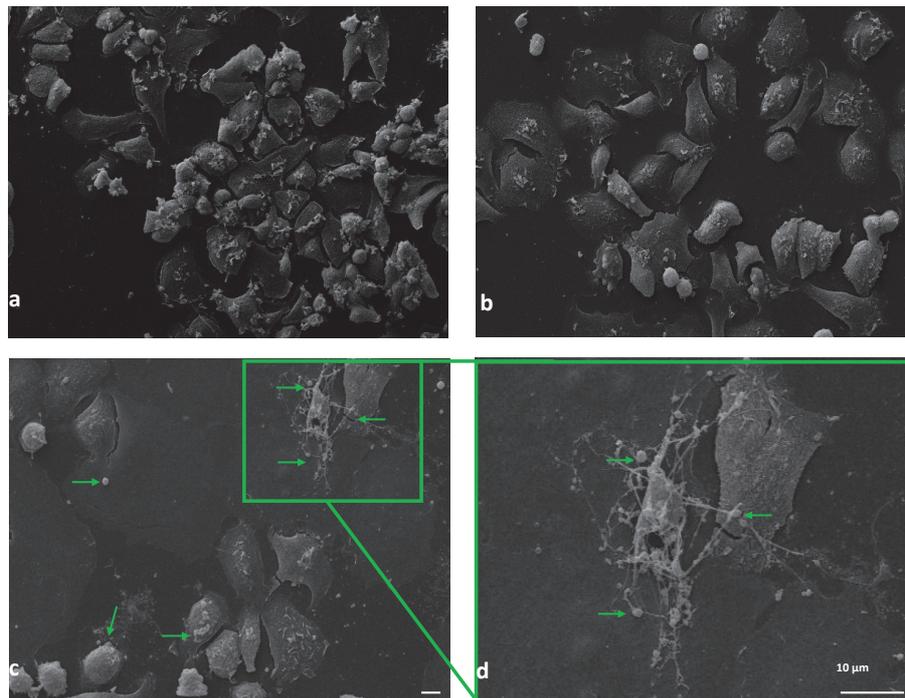


Figura 4. Microfotografie SEM delle cellule SKBR3: a) cellule di controllo; b) cellule SKBR3 trattate con 6,25 µM di AE per 48 ore; c) cellule SKBR3 trattate con 25,0 µM di aloe emodina per 48 ore; le frecce indicano le blebs presenti sulla superficie delle cellule sofferenti; d) ingrandimento dell'inserto della Figura 4c

Effetti dipendenti dall'aloë emodina sull'apoptosi, sulla proliferazione e sulla produzione di citochine nei linfociti T del sangue periferico da donatori sani

Successivamente abbiamo valutato la capacità dell'aloë emodina di influenzare l'omeostasi dei linfociti T in termini di apoptosi cellulare, proliferazione e produzione di citochine. L'aloë emodina è stata in grado di indurre un aumento dell'apoptosi e una riduzione della proliferazione nei linfociti T, misurata attraverso il saggio di apoptosi che prevede la doppia colorazione con annessina V (AV) e ioduro di propidio (PI) e l'analisi dell'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 dopo trattamento con l'aloë emodina. Sono state studiate anche le citochine pro-infiammatorie (IFN γ , TNF- α e IL-17) e anti-infiammatorie (IL-10). In particolare, l'aloë emodina ha ridotto il livello di espressione intracellulare delle citochine pro-infiammatorie IL-17, IFN γ e TNF- α nei linfociti T CD4+ e CD8+ e ha aumentato il livello di IL-10+.

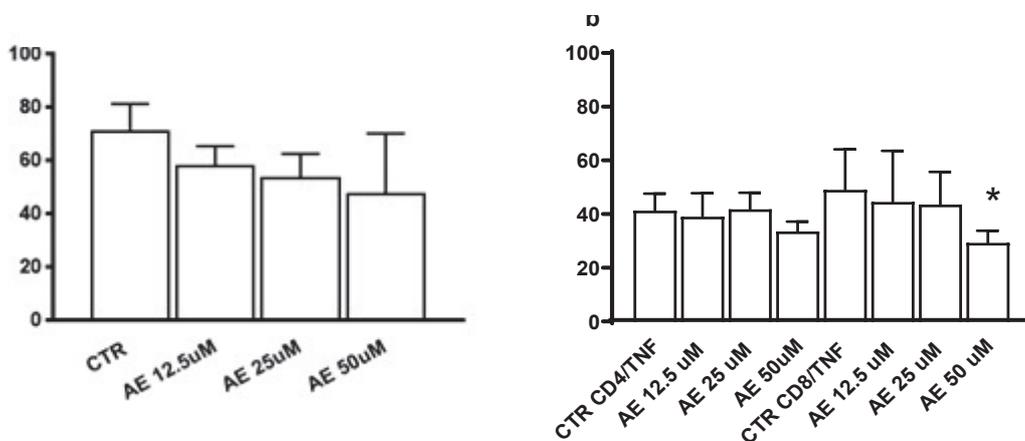


Figura 5. Effetti dell'aloë emodina sulla proliferazione dei linfociti T nel sangue periferico di soggetti sani. I dati sono riportati come media \pm SD (B). *P < 0,05 verso le cellule non trattate. A: analisi dell'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 dopo trattamento con l'aloë emodina; B: valutazione dell'espressione delle citochine pro-infiammatorie dopo trattamento con l'aloë emodina

In Figura 5 sono mostrati gli effetti dell'aloë emodina sulla proliferazione dei linfociti T nel sangue periferico di soggetti sani. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante citometria a flusso misurando l'espressione dell'antigene nucleare Ki-67 sui linfociti T dopo attivazione con mAb anti-CD3 per 72 ore e trattamento con diverse concentrazioni di aloë emodina per le ultime 48 ore di coltura. I dati sono riportati come media \pm SD (A). Per la produzione di citochine, i dati mostrano che l'aloë emodina riduce l'espressione della citochina pro-infiammatoria TNF- α nei linfociti T CD4+ e CD8+ di donatori sani.

Discussione

L'Aloe (gen. *Aloe*) identifica un gruppo di piante succulente appartenente alla famiglia delle *Aloaceae*. La maggior parte originarie dell'Africa. Sono piante perenni, con fusto semplice o

ramificato, alto anche qualche metro in alcune specie. Il fusto e i rami terminano con un ciuffo di foglie carnose, spesso aculeate al margine; queste presentano vari adattamenti al clima arido, come cuticola spessa, cera o mucillagine nei tessuti interni. I fiori sono in grappoli semplici o composti, hanno i sei tepali saldati in un tubo e sono rossi, gialli o verdicci. Il fusto presenta struttura secondaria.

Dalla specie oggi più nota, *Aloe vera*, si ricava un gel dalle numerose proprietà organolettiche. Tra i composti contenuti al suo interno, l'aloè emodina presenta proprietà curative di grande interesse biomedico. Molti studi hanno individuato un suo ruolo nella cura della retinopatia diabetica (Wu, 2013), nella protezione delle cellule β del pancreas dalla glucotossicità (Alshatwi, 2016), nella lotta alla leishmaniosi (Dalimi, 2015) e alla psoriasi (Divya, 2016). L'aloè emodina è inoltre in grado di stimolare, nelle cellule ATDC5 (una linea cellulare condrogenica), la sintesi della cartilagine (Yang, 2016).

In ambito oncologico, è noto che l'aloè emodina è in grado di indurre l'apoptosi in molti tipi di cellule tumorali (Pecere, 2000; Suboj, 2012; Adamczyk, 2015; Chihara, 2015).

In questo studio abbiamo valutato l'attività dell'aloè emodina sulla vitalità e sulla morfologia della linea cellulare SKBR3 di adenocarcinoma mammario umano.

La valutazione della vitalità cellulare ottenuta mediante il saggio MTT ha dimostrato che la vitalità cellulare decresce in maniera dose/tempo dipendente. Inoltre, le osservazioni eseguite al SEM dopo 24 ore di incubazione hanno dimostrato che a basse concentrazioni l'aloè emodina (6,25 μ M) non induce cambiamenti ultrastrutturali significativi, mentre a concentrazioni più alte (25,0 μ M) le cellule risultano maggiormente alterate: alcune di queste, ancora adese al substrato, presentano numerose lunghe e sottili estroflessioni dalla superficie cellulare. Si può quindi ipotizzare che l'Aloè emodin sia in grado di alterare anche il citoscheletro delle cellule tumorali SKBR3 favorendo la loro adesione al substrato e riducendone in questo modo la loro capacità invasiva a livello tissutale. Inoltre, i risultati preliminari ottenuti hanno dimostrato che l'aloè emodina è in grado di ridurre l'espressione della citochina pro-infiammatoria TNF- α nelle popolazioni linfocitarie T, sia CD4+ e CD8+ di donatori sani.

Conclusioni

Questo lavoro sperimentale ha confermato che l'Aloè emodin è in grado di ridurre sensibilmente la proliferazione delle cellule tumorali di adenocarcinoma mammario SKBR3. Il nostro obiettivo futuro sarà quello di chiarire quale sia il processo biochimico attivato dall'aloè emodina in modo tale da poter meglio spiegare i risultati ottenuti. Dalla letteratura scientifica si evince infatti che nelle cellule tumorali trattate con aloè emodina sono state valutate ad esempio l'espressione delle caspasi, del citocromo c e della proteina PARP (Suboj, 2012; Lee, 2001).

Il nostro interesse sarà quindi di studiare, in modo più approfondito, l'espressione delle molecole coinvolte nel processo apoptotico.

Inoltre, saranno eseguiti degli esperimenti in microscopia a fluorescenza per studiare le alterazioni del citoscheletro delle cellule SKBR3 dopo incubazione con l'aloè emodina per valutare se e come questa molecola possa andare a interferire con il citoscheletro cellulare. In conclusione, il nostro studio *in vitro* ha fornito informazioni sulle attività antinfiammatorie dell'aloè emodina. Tuttavia, sono necessari ulteriori test per confermare il potenziale ruolo di questo composto come strumento terapeutico.

Bibliografia

- Adamczyk A, Niemiec J, Janecka A, Harazin-Lechowska A, Ambicka A, Grela-Wojewoda A, Domagala-Haduch M, Cedrych I, Majchrzyk K, Kruczak A, Rys J, Jakubowicz J. Prognostic value of PIK3CA mutation status, PTEN and androgen receptor expression for metastasis-free survival in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab in adjuvant setting. *Pol J Pathol* 2015;66:133-41.
- Alshatwi AA, Subash-Babu P. Aloe-Emodin protects RIN-5F (Pancreatic β -cell) cell from glucotoxicity via regulation of pro-inflammatory cytokine and downregulation of bax and caspase 3. *Biol Ther* 2016;24(1):49-56.
- Ammon HPT. Modulation of the immune system by *Boswellia serrata* extracts and boswellic acids. *Phytomed* 2010;17:862-7.
- Atherton P. (Ed.) *The essential Aloe vera: The actions and the evidence*. 2nd ed Mill Enterprises;1997.
- Atherton P. *Aloe vera* revisited. *Br J Phytother* 1998;4:76-83.
- Bernardo A, Palumbo R, Pedersini R, Rota Caremoli E, Gambaro AR, Ferzi A, Riva F, Grasso D, Danova M, Tarenzi E, Torri V, Cazzaniga ME. Nab-Paclitaxel in advanced HER2-negative breast cancer patients: efficacy and safety beyond clinical trials. *Clin Breast Cancer* 2017;8:433-40.
- Chen SH, Lin KY, Chang CC, Fang CL, Lin CP. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *FoodChem Toxicol* 2007;45(11):2296-303.
- Chihara T, Shimpo K, Beppu H, Yamamoto N, Kaneko T, Wakamatsu K, Sonoda S. Effects of Aloe-emodin and emodin on proliferation of the mkn45 human gastric cancer cell line. *Asian Pac J Cancer P* 2015;16(9):3887-91.
- Dalimi A, Delavari M, Ghaffarifar F, Sadraei J. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial effects of aloe-emodin on *Leishmania major*. *J Tradit Complement Med* 2015;5(2):96-9.
- Divya G, Panonnummal R, Gupta S, Jayakumar R, Sabitha M. Acitretin and aloe-emodin loaded chitin nanogel for the treatment of psoriasis. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;107:97-109.
- Feng YH, Zhou WL, Wu QL, Li XY, Zhao WM, Zou JP. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23(10):893-7.
- Guo JM, Xiao BX, Liu Q, Zhang S, Liu DH, Gong ZH. Anticancer effect of aloe-emodin on cervical cancer cells involves G2/M arrest and induction of differentiation. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28(12):1991-5.
- Lamb YN, Scott LJ. Liposomal Irinotecan: a review in metastatic pancreatic adenocarcinoma *Drugs* 2017;77:785-92.
- Lee HM. Protein Kinase C Involvement in Aloe-Emodin- and emodin-induced apoptosis in lung carcinoma cell. *Brit J Pharmacol* 2001;134(5):1093-103.
- Lu HF, Lai KC, Hsu SC. Involvement of matrix metal-loproteinases on the inhibition of cells invasion and migration by emodin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res* 2009;34:1575-83.
- Negi B, Kumar D, Rawat DS. Marine peptides as anticancer agents: a remedy to mankind by nature. *Current Protein Pept Sc* 2016;17:18(9):885-904.
- Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnicic M, Bausic L, Minia E, Capaccioli S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol Res* 2009;59(6):365-78.
- Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Dalla Vecchia F, Cavaggioni A, Basso G, Diaspro A, Salvato B, Carli M, Palu' G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 2000;60:2800-4.
- Shelton M. *Aloe vera*, its chemical and therapeutic properties. *Int J Dermatol* 1991;30: 679-83.
- Sidaway P. Vinflunine is an effective maintenance therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14:328

- Suboj P, Babykuttya S, Srinivasb P, Gopalaa S. Aloe emodin induces g2/m cell cycle arrest and apoptosis via activation of caspase-6 in human colon cancer cells. *Pharmacology* 2012;89:91-8.
- Tabolacci C, Lentini A, Mattioli P, Provenzano B, Oliverio S, Carlomosti F, Beninati S. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. *Life Sci* 2010;87:316-24.
- Tajbakhsh A, Hasanzadeh M., Rezaee M, Khedri M, Khazaei M, Sales SS, Ferns GA, Hassanian SM, Avan, A. Therapeutic potential of novel formulated forms of curcumin in the treatment of breast cancer by the targeting of cellular and physiological dysregulated pathways. *J Cell Physiol* 2017;233(3) 2183-92.
- Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. *Cur Pharm Des* 2013;19(34):6064-93.
- Waksman SA, Woodruff HB. Actinomyces antibioticus, a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. *J Bacteriol* 1941;42:231-49.
- Wu J, Ke X, Wang W, Zhang H, Ma N, Fu W, Zhao M, Gao X, Hao X, Zhang, Z. Aloe-emodin suppresses hypoxia-induced retinal angiogenesis via inhibition of HIF-1 α /VEGF pathway. *Int J Biol Sci* 2016;12(11):1363-71.
- Yang M, Li L, Heo SM, Soh Y. Aloe-Emodin induces chondrogenic differentiation of ATDC5 cells via MAP kinases and BMP-2 signaling pathways. *Biomol Ther* 2016;24(4):395-401.