

<https://www.veraaloegel.com/>

Ricerca tratta da:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00474/full>

Nota: Questa ricerca si riferisce ad Aloe contenente Aloina e NON al Gel Puro privato dell'Aloina e quindi sicuro.

Effetti dipendenti dalla dose di aloina sulla struttura della comunità batterica intestinale, sul metabolismo degli acidi grassi a catena corta e sulla permeabilità delle cellule epiteliali intestinali

Kuppan Gokulan^{*}, Pranav Kolluru, Carl E. Cerniglia e [Sangeeta Khare](#)^{*}

- Division of Microbiology, National Center for Toxicological Research, Food and Drug Administration, Stati Uniti, Jefferson, AR, Stati Uniti

Le foglie di aloe o i prodotti di aloina purificati possiedono numerose proprietà terapeutiche e farmaceutiche. È ampiamente usato come ingrediente in una varietà di prodotti alimentari, cosmetici e farmaceutici. Studi sugli animali hanno dimostrato che il consumo di aloina purificata causa iperplasia delle cellule caliciformi intestinali e malignità. Qui, abbiamo testato gli effetti antibatterici dell'aloina, contro il microbiota intestinale commensale. La concentrazione inibitoria minima di aloina per diverse specie batteriche commensali umane (Gram-positivi e Gram-negativi) variava da 1 a 4 mg / ml. Gli studi sul metabolismo hanno indicato che *Enterococcus faecium* era in grado di degradare l'aloina in aloe-emodin a una velocità inferiore rispetto all'*Eubacterium* spp. Come prova del concetto, abbiamo incubato il 3% di liquame fecale di ratto (*in vitro* modello per simulare il contenuto di colon umano) con 0,5, 1 e 2 mg / ml di aloina per testare le proprietà antimicrobiche. Basse concentrazioni di aloina hanno mostrato lievi perturbazioni ai batteri intestinali, mentre l'alta concentrazione ha aumentato *Lactobacillus* sp. conta. L'aloina ha anche ridotto la produzione di butirato nel microbiota fecale in modo dose-dipendente dopo 24 ore di esposizione. I dati di sequenza dell'rRNA 16S hanno rivelato che l'aloina riduce l'abbondanza di specie batteriche che producono butirato. Il risultato transepiteliale resistente ha rivelato che l'aloina altera la funzione di barriera intestinale a concentrazioni più elevate (500 µM). In conclusione, l'aloina mostra proprietà antibatteriche per alcuni batteri commensali e diminuisce la produzione di butirato in modo dose-dipendente.

PUNTI SALIENTI

- L'aloina presenta proprietà antibatteriche per alcuni batteri commensali intestinali.
- Nel liquame fecale di ratto (un modello *in vitro* per simulare il contenuto di colon umano), un'esposizione più lunga all'aloina (24 h) riduce la produzione di butirrato in modo dose-dipendente.
- I dati di sequenziamento dell'rRNA 16s mostrano che l'aloina ha ridotto l'abbondanza di specie batteriche che producono butirrato.
- I batteri commensali intestinali di ratto hanno metabolizzato l'aloina in aloe-emodin.
- L'aloina ha alterato l'integrità della barriera delle cellule epiteliali intestinali, tuttavia, il prodotto metabolico dell'aloina - L'aloe-emodin non ha alterato la permeabilità delle cellule epiteliali.

introduzione

L'Aloe Vera è una pianta medicinale tropicale appartenente alla famiglia delle Liliaceae ([Ding et al., 2014](#)). L'aloe è un genere composto da 548 specie riconosciute. La foglia di aloe è stata usata per scopi medicinali fin dall'antichità ([Morton, 1961](#)). I due componenti principali delle foglie di aloe sono il gel mucillaginoso interno e lo strato dermico esterno. Il gel interno è composto al 99% di acqua e diverse molecole bioattive, vitamine, zuccheri, aminoacidi, lipidi, steroli e composti fenolici, molti dei quali hanno valori medicinali ([Park e Kwon, 2006](#)). Molecole fenoliche, cromoni, glicosidi antrachinonici e alina (isomero A e B) costituiscono circa il 30% dello strato cutaneo esterno ([Guterman e Chauser-Volfson, 2000](#) ; [Hamman, 2008](#)). È importante notare che la composizione delle molecole bioattive nell'aloe vera varia a seconda dell'età della pianta.

Nei paesi asiatici e africani, le foglie di aloe o il succo estratto sono spesso usati per trattare malattie infettive e infiammatorie ([Thiruppathi et al., 2010](#) ; [Akinduti et al., 2013](#) ; [Megeressa et al., 2015](#)). I prodotti derivati dall'aloe vera sono anche usati per trattare la caduta e la costipazione dei capelli. Gli studi hanno suggerito che in alcune regioni del mondo, la foglia di aloe viene utilizzata per il trattamento di asma, costipazione, ipertensione e sudorazione eccessiva ([Lans, 2006](#)). Più recentemente, i prodotti gelatina sono stati incorporati come ingrediente in cosmetici, prodotti per la cura della pelle, integratori per la salute, bevande salutari, rimedi a base di erbe e utilizzati anche per le loro attività di guarigione delle ferite, antinfiammatorie, antimicrobiche e antiossidanti ([Briggs, 1995](#)). La Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti ha approvato l'uso di ingredienti di prodotti a base di foglie di aloe per coloranti alimentari naturali, cosmetici e integratori polifenolici dietetici ([FDA, 2008](#)); tuttavia, i meccanismi molecolari esatti dei suoi effetti benefici sono capiti male.

Lo strato epiteliale intestinale del sistema gastrointestinale funziona come una barriera fisica tra il sistema interno e l'ambiente esterno ([Odenwald e Turner, 2013](#)). Il sistema intestinale fornisce anche un habitat microbica per il 10^{10} al 10^{14} microbiota commensale ([Ley et al., 2006](#) ; [Qin et al 2010](#)) per grammo di feci. In soggetti sani, la composizione dei batteri commensali è una comunità microbica stabile, che modella lo sviluppo del sistema immunitario locale nell'intestino. Inoltre, il microbioma aiuta la produzione di acido grasso a catena corta (SCFA) degradando i polisaccaridi non digeriti e altri materiali alimentari. Il butirrato di origine batterica funge da importante fonte di energia per la crescita delle cellule epiteliali intestinali e il mantenimento della funzione barriera ([Zheng et al., 2017](#)). Le progressioni di disturbi e malattie intestinali sono state associate a cambiamenti nel normale microbioma intestinale e disbiosi nei batteri intestinali produttori di butirrato ([Clemente et al., 2012](#) ; [Zheng et al., 2017](#)). I metaboliti dell'aloina ingerita possono essere assorbiti dalle cellule epiteliali intestinali ([Park et al., 2009](#)) mentre viaggiano attraverso il tratto gastrointestinale (GIT) e queste molecole possono interagire con il microbiota commensale e alterare l'omeostasi intestinale.

Nel GIT, l'aloina ingerita può essere metabolizzata in aloe-emodin deglicosilato da batteri intestinali ([Che et al., 1991](#)). I prodotti purificati di aloe fenolica e i suoi metaboliti hanno gruppi idrossimetilici liberi che possono interagire con altri gruppi ossidrilici o enzimi glucuronidici per formare coniugati glucuronidici. I derivati del glucuronato sono più stabili dei derivati del solfato e richiedono più tempo per liberarsi dal sistema. *Studi di permeabilità in vitro* hanno rivelato che le cellule epiteliali intestinali assorbono l'aloina e i suoi metaboliti nel seguente ordine: alosina > aloe-emodin > aloina ([Park et al., 2009](#)). Questi metaboliti mantengono le strutture fenoliche che sono considerate molecole bioattive. Gli studi hanno anche dimostrato che l'aloina mostra proprietà antimicrobiche e antimalariche contro molti organismi patogeni ([Asamenew et al., 2011](#) ; [Abeje et al., 2014](#) ; [Oumer et al., 2014](#)).

Pochi studi dimostrano che i prodotti di aloe vera sono sicuri da usare e non causano effetti tossici ([Sehgal et al., 2013](#)). **Al contrario, molti altri studi hanno dimostrato che l'ingestione di prodotti di aloe provoca anomalie intestinali** ([Boudreau et al., 2013, 2017](#) ; [Sehgal et al., 2013](#)). Poiché l'aloina e i suoi metaboliti presentano proprietà antimicrobiche, è ragionevole condurre una valutazione della sicurezza dei prodotti derivati dall'aloë anche per i microbi intestinali. Precedenti studi sui roditori hanno dimostrato che la somministrazione di foglie di aloe o composti polifenolici purificati causa lesioni, citotossicità e la progressione dell'adenocarcinoma nell'intestino ([Xia et al., 2007](#) ; [Boudreau et al., 2017](#)). È interessante notare che queste anomalie intestinali sono risultate più predominanti nei maschi rispetto alle femmine ([Xia et al., 2007](#)). Pertanto, sono necessari approcci sistematici per determinare la concentrazione di aloina che può causare effetti dannosi sul microbiota intestinale. In particolare, non è nota la concentrazione di aloina responsabile dell'alterazione della comunità microbica intestinale e dell'integrità del sistema gastrointestinale. Inoltre, esiste una lacuna di conoscenza riguardo a quali approcci sperimentali dovrebbero essere usati per valutare se la funzione barriera dello strato epiteliale intestinale è compromessa a causa dell'esposizione xenobiotica e / o dei suoi metaboliti. Inoltre, resta da rispondere anche all'effetto antibatterico dell'aloina sui batteri commensali intestinali e sulla produzione di SCFA da materiali alimentari in fibra non digeriti.

Nel presente studio, abbiamo ipotizzato che l'aloina e i suoi metaboliti possano causare effetti dannosi al sistema gastrointestinale. Per testare la nostra ipotesi, abbiamo impiegato approcci sperimentali *in vitro* per valutare la tossicità dell'aloina nei confronti di batteri commensali e cellule epiteliali intestinali. In questo studio, i nostri obiettivi principali erano cinque volte: (i) valutare se ci sono differenze nelle proprietà antibatteriche dell'aloina tra i batteri intestinali umani aerobici, facoltativi e anaerobici che sono predominanti nell'intestino, (ii) per esaminare l'effetto di aloina sui cambiamenti nelle strutture della comunità batterica aerobica e anaerobica usando un *in vitro* modello di coltura fecale di ratto e sequenziamento dell'rRNA 16s, (iii) per esaminare l'effetto dell'aloina sulla produzione di SCFA da parte della comunità batterica intestinale di ratto, (iv) per valutare l'effetto aloina sulla permeabilità intestinale mediante metodologia *in vitro* e (v) per analizzare il metabolismo dell'aloina da parte dei batteri intestinali commensali.

Materiali e metodi

Attività antibatterica di Aloina sulla crescita di batteri patogeni e batteri intestinali umani

Per testare le proprietà antimicrobiche dell'aloina, abbiamo usato un ceppo di *Escherichia coli* di riferimento come organismo di prova. Il ceppo di *E. coli* J53 coltivato durante la notte è stato sottoposto a sub-coltura in terreni di coltura di soia triptica (TSA) per raggiungere la fase centrale del tronco, quindi diluiti e placcati (1×10^5 cellule / pozzetto) in una piastra di coltura da 96 pozzetti. È stata preparata la soluzione di stock di aloina (CAS 1415-73-2 ottenuta da Pure Chemistry Scientific Inc., Houston, TX, Stati Uniti) (10 mg / ml) aggiungendo etanolo e terreni di coltura in

rapporto 1: 4; quindi è stato usato un doppio metodo di diluizione per ottenere una concentrazione da 2mg / ml a 0,015 µg / ml in piastre di coltura. I pozzetti di controllo hanno ricevuto solo media ed etanolo (concentrazione equivalente di etanolo presente in 2 mg / ml di soluzione di aloina). Il controllo negativo era il solo mezzo senza batteri e serviva da valore di correzione per la lettura di fondo. Sono stati inclusi anche pozzetti di controllo contenenti 2 mg / ml di aloina e terreni per rilevare l'assorbimento di fondo di aloina. Le piastre sono state posizionate nel lettore di piastre BioTek (Cytation, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, Stati Uniti) e OD sono stati registrati a 600 nm con intervalli di 5 minuti per un periodo di 24 ore per valutare la crescita.

Abbiamo selezionato sei ceppi batterici commensali tra i cinque principali phyla batterici in base alla sua funzionalità nell'intestino. Questi batteri commensali umani sono stati ottenuti da ATCC (ATCC, Manassas, VA, Stati Uniti) e comprendevano *Bifidobacterium longum* (ATCC[®] 15707TM), *Lactobacillus acidophilus* (ceppo ATCC 700396 / NCK56 / N2 / NCFM), *Enterococcus faecium* (ATCC[®] 19434TM), *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC[®] 29148TM), *Akkermansia muciniphila* (ATCC[®] BAA-835TM) e *Eubacterium* sp. (ATCC[®] BAA-148TM). Questi ceppi sono stati coltivati in specifici terreni di crescita batterica come raccomandato da ATCC. I batteri anaerobici sono stati coltivati nella camera anaerobica. I batteri facoltativi sono stati coltivati in condizioni parzialmente anaerobiche a 37 ° C.

Valutazione della concentrazione minima inibente (MIC) di aloina contro i batteri commensali intestinali

I ceppi batterici sono stati inoculati durante la notte nei rispettivi terreni di coltura a 37 ° C in uno shaker come raccomandato da ATCC. Sono state eseguite misurazioni periodiche di OD₆₀₀ per valutare la crescita batterica e l'incubazione è stata interrotta quando la crescita dell'organismo ha raggiunto la fase di mezzo log. Le colture batteriche sono state diluite usando i rispettivi terreni di coltura e adattate a una densità di circa 1×10^5 cellule / ml, dopo di che, 100 microlitri (10.000 cellule) sono stati placcati in ciascun pozzetto delle piastre da 96 pozzetti. L'aloina è stata preparata con rapporti 1: 4 di etanolo e rispettivi terreni di coltura e ha aggiunto due diluizioni a partire da 4 mg / ml (9,56 mM) a 3,98 µg / ml (0,019 mM). In ogni esperimento sono stati inclusi controlli positivi (coltura batterica senza aloina) e controlli negativi (solo i media e solo aloina senza coltura batterica). Le piastre sono state posizionate nel lettore di piastre BioTek e la OD è stata registrata a 600 nm con intervalli di 5 minuti per un periodo di 24 ore per valutare la MIC. È stato determinato il valore MIC (cioè quando la concentrazione di aloina ha inibito totalmente la crescita batterica) di aloina contro i batteri commensali intestinali.

Visualizzazione della vitalità di *L. acidophilus* mediante fluorescenza di acridina e bromuro di etidio

Dopo la valutazione della crescita batterica, i pozzetti contenenti *L. acidophilus* sono stati colorati per la rilevazione della morte cellulare secondo il protocollo sviluppato da [Ribble et al. \(2005\)](#). I coloranti arancio acridina (2 µg / ml) e bromuro di etidio (2 µg / ml) sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e incubati a 37 ° C per 15 minuti. Le cellule colorate sono state visualizzate e fotografate utilizzando un microscopio a fluorescenza invertito (EVOS, Life Technologies, San Diego, California, Stati Uniti) per distinguere tra batteri vivi (verdi) e morti (rossi).

***In vitro* microgravità Rotary Cultura Condizioni di fecale Microbiota**

Campioni fecali sono stati raccolti post mortem dal colon di tre ratti maschi Sprague Dawley (di età compresa tra 4 e 6 mesi) sottoposti a regolare sorveglianza presso l'NCTR. Poiché questi campioni fecali sono stati raccolti post mortem dagli animali, non è stata richiesta l'approvazione del Comitato istituzionale per l'etica degli animali.

Per imitare i movimenti continui intestinali, abbiamo scelto un sistema di coltura cellulare rotante (RCCS) (Synthecon Inc., Houston, TX, Stati Uniti) per l'interazione di aloina con i batteri intestinali. L'RCCS è stato sviluppato per la ricerca a gravità zero (spazio) da [Wolf et al. \(1988\)](#). Questo sistema è stato specificamente progettato per coltivare colture a lungo termine di cellule epatiche primarie funzionali in un ambiente a bassa microgravità con bassa forza di taglio, elevato trasferimento di massa e coltura di cellule 3D di tipi di cellule diverse. Nel presente studio, abbiamo utilizzato la stessa tecnologia, tuttavia, personalizzato la nave per imitare un sistema chiuso con un ambiente anaerobico. L'RCCS è stato inserito all'interno della camera anaerobica a bassa velocità per imitare il movimento peristaltico dell'intestino. Abbiamo utilizzato questo sistema per studiare l'effetto dell'aloina sui batteri intestinali per imitare l'ambiente anaerobico del colon. Abbiamo preparato aloina alla concentrazione di 10 mg / ml come descritto nella sezione "Materiali e metodi" "Attività antibatterica di aloina su batteri patogeni e crescita di batteri intestinali umani." Il liquame fecale (3%) è stato preparato utilizzando un mezzo a basso contenuto di carboidrati (LCM) in condizioni anaerobiche come descritto in precedenza ([Kim et al., 2011](#) ; [Jung et al., 2018](#)). La sospensione fecale è stata suddivisa in quattro volumi uguali. Le concentrazioni finali di tutti e quattro i fanghi fecali sono state adeguate al 3% mediante LCM. La sospensione fecale è stata trasferita in recipienti di coltura monouso anaerobici sterili su misura da 10 ml (quattro vasi) usando una siringa. È stata prestata attenzione a rimuovere le bolle d'aria. Queste navi sono state fissate in un RCCS e la velocità di rotazione è stata regolata a 7 rpm / min. I preparativi e l'impostazione dell'esperimento sono stati condotti in una camera anaerobica. Il campione di controllo ha ricevuto 400 µl di etanolo, che equivale alla più alta concentrazione di etanolo presente in 2 mg / ml di soluzione di aloina. Nei restanti tre vasi è stata aggiunta aloina (rispettivamente 0,5, 1 e 2 mg / ml) per analizzare i cambiamenti nella struttura della comunità batterica intestinale, le concentrazioni erano basate sul MIC ottenuto da Curva di crescita batterica di *E. coli* . Una parte dei campioni di questi vasi è stata raccolta a 3, 6 e 24 ore temporali per analizzare i cambiamenti nella comunità strutturale batterica sia per i batteri aerobici che anaerobici, la produzione di SCFA e il metabolismo dell'aloina da parte dei batteri intestinali.

Culture batteriche da liquame fecale di ratto trattate con aloè

Campioni fecali sono stati raccolti da tutti i vasi rotanti come indicato nella sezione " Condizioni di coltura rotativa per microgravità in vitro del microbiota fecale". Per analizzare la composizione batterica, 100 µl di ciascun campione sono stati diluiti in serie (10 volte) in una soluzione in bianco di diluizione. Le popolazioni batteriche aerobiche e anaerobiche totali sono state quantificate utilizzando piastre di terreno di coltura selettiva (TSA e Brucella Blood Agar, rispettivamente). Questi campioni sono stati anche placcati in un terreno di coltura batterica selettiva per anaerobici [BBE (per i *batterioidi*) e Bifido (per il *bifidobatteriogenere*)] e batteri facoltativi (LRMS). Le piastre di coltura sono state incubate a 37 ° C. Le placche batteriche aerobiche e facoltative sono state rimosse dopo 24 ore. Le placche batteriche anaerobiche (BBE e Bifido) sono state rimosse dopo 72 ore dalla camera anaerobica. I batteri sono stati quindi elencati con un contatore di colonie. La conta batterica ottenuta dal gruppo di controllo è stata confrontata con quella dei tre gruppi sperimentali in ogni momento.

Preparazione del campione per misurare gli acidi grassi a catena corta

L'apparecchiatura HPLC, 1260 DAD LC Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Stati Uniti), è stata utilizzata per misurare gli SCFA. Gli standard di acido succinico, acido lattico, acido acetico, acido propionico, acido isobutirrico, acido butirrico, acido valerico, acido isovalerico e acido esanoico sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Stati Uniti). Gli standard sono stati preparati di fresco a 1 M di concentrazione e 20 mM addizionati nel supernatante fecale di controllo. Prima di analizzare i campioni di test, i tempi di ritenzione per gli standard sono stati calibrati utilizzando la colonna Aminex HPX-87H (300 × 7,88 mm) (Bio-Rad, Richmond, CA, Stati

Uniti). La colonna è stata mantenuta a 65 ° C e la portata della colonna (0,6 ml / min) e le molecole sono state monitorate continuamente a 210 nm. La fase mobile era composta da un isocratico H₂SO₄ soluzione (2,5 mM) per 50 min. Un'aliquota (1 ml) di liquame fecale è stata rimossa a 3, 6 e 24 ore per l'analisi SCFA con il metodo HPLC ([Gordon et al., 1982](#)). I campioni sono stati immediatamente centrifugati a 15.000 rpm per 10 minuti a 4 ° C e i surnatanti sono stati raccolti e filtrati attraverso un filtro a membrana da 0,45 µm. Un 20 ml di soluzione campione è stato iniettato nella colonna HPLC per analizzare i metaboliti di SCFA.

Preparazione del campione per il dosaggio del metabolismo dell'aloina da parte di batteri commensali

Dopo aver valutato il valore MIC dalla coltura batterica pura, i campioni sono stati centrifugati per rimuovere il pellet batterico. Il surnatante è stato trasferito in un nuovo tubo quindi tenuto in speedvac per rimuovere i terreni di coltura. L'aloina e i suoi metaboliti sono stati estratti usando metanolo. Gli standard di aloina e aloin-emodin sono stati preparati di recente e valutati per il tempo di ritenzione utilizzando la colonna HPLC Z18 S-Zorbox-SB. Questi standard sono stati inoltre arricchiti nel controllo dei terreni di coltura batterica, il tempo di ritenzione per l'aloina estratta e l'aloin-emodin è stato analizzato come affermato in precedenza. Campioni sperimentali sono stati analizzati dalla colonna HPLC per valutare l'aloina e i suoi metaboliti. La temperatura della colonna è stata mantenuta a 40 ° C. Il tampone A era composto per il 95% di acqua e il 5% di acetonitrile contenente 0,1% di TFA. Il tampone B era acetonitrile al 95% e acqua al 5% contenente 0,1% di TFA. La portata era 0.2 ml / min e l'assorbanza sono stati monitorati a 260 nm.

Estrazione di DNA da campioni fecali

Il DNA fecale è stato estratto seguendo il protocollo precedentemente descritto con lievi modifiche ([Khare et al., 2004](#) ; [Williams et al., 2015](#)). Un ml di campione fecale è stato raccolto da ciascun gruppo sperimentale a 3, 6 e 24 ore. Il DNA è stato estratto da campioni fecali come descritto in precedenza. Il pellet è stato sospeso in acqua libera DNase e RNase e il DNA è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, Stati Uniti). Inoltre, dsDNA è stato quantificato da Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stati Uniti). Questo DNA altamente purificato è stato usato come modello per il sequenziamento 16s per la popolazione microbica.

Sequenziamento genico di 16S rRNA della popolazione batterica

Il DNA fecale altamente purificato è stato utilizzato per analizzare il cambiamento nella comunità batterica a causa dell'esposizione all'aloina. La regione variabile V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata usando i primer PCR 515/806. Per preparare la biblioteca del DNA Illumina sono stati utilizzati prodotti PCR raggruppati e purificati. L'output delle letture della sequenza del DNA è stato unito e successivamente, i codici a barre sono stati esauriti e quindi le sequenze <150 bp sono state rimosse. Le sequenze con chiamate di base ambigue sono state rimosse anche per l'analisi dei dati. Le sequenze furono denoizzate, le unità tassonomiche operative (OTU) generate e le chimere furono rimosse. Le OTU sono state definite raggruppando al 3% di divergenza (97% di somiglianza). Le OTU finali sono state tassonomicamente classificate usando BLASTn rispetto a un database curato derivato da RDPII e NCBI.

Coltura cellulare epiteliale intestinale

Le cellule T84 (ATCC[®] CCL-248[™]), una linea cellulare di carcinoma coloretale umano, sono state ottenute da ATCC. Le cellule sono state coltivate in [terreni di coltura](#) completi precedentemente segnalati ([Gokulan et al., 2016](#) , [2017](#)), che era composto dal terreno Modified

Eagle Medium (DMEM) / F-12 di Dulbecco integrato con L -glutamina e HEPES (ATCC), con l'aggiunta di 5 % siero bovino fetale, penicillina / streptomina e Fungizone. Inizialmente, un 75 cm² il pallone per coltura cellulare è stato usato per far crescere le cellule fino a quando non hanno raggiunto una confluenza del 70-80%. Le cellule sono state distaccate con soluzione di tripsina-EDTA allo 0,25% e lavate due volte con terreno DMEM / F-12. I media sono stati decantati e il pellet di cellule è stato sospeso con terreni di coltura. Le cellule sono state contate, quindi seminate ($2,0 \times 10^5$ cellule / pozzetto) in pozzetti e mantenute in un incubatore a 37 ° C con 5% di CO₂ e umidità del 95% fino a quando i valori di resistenza elettrica transepiteliale (TER) sono stati stabilizzati.

Resistenza elettrica transepiteliale (TER)

La misurazione TER è stata eseguita come riportato in precedenza ([Adams et al., 1993](#) ; [Youakim and Ahdieh, 1999](#) ; [Bruewer et al., 2003](#) ; [Donato et al., 2011](#) ; [Khare et al., 2012](#) ; [Williams et al., 2016](#)) . In breve, le cellule T84 sono state seminate nel compartimento apicale di 6,5 mm, PFTE, inserti di pozzetti rivestiti di collagene (Corning, Corning, NY, Stati Uniti) ad una concentrazione di 2×10^5 cellule / pozzetto. Sono stati aggiunti terreni di coltura cellulare completi a serbatoi apicali (0,2 ml) e basali (0,8 ml) e le cellule sono state lasciate crescere per 5-7 giorni per polarizzarsi ([Williams et al., 2016](#)). Quindi un mezzo privo di antibiotici è stato aggiunto ai serbatoi apicale e basale e il TER è stato misurato periodicamente utilizzando una sonda per elettrodi STX e un voltmetro epiteliale EVOM2 (World Precision Instruments, Sarasota, FL, Stati Uniti). Una volta che i pozzi avevano raggiunto circa 800-1000 Ω / cm² il mezzo fu cambiato e le cellule furono lasciate equilibrare per 3 ore. L'aloina è stata sciolta in etanolo e media in un rapporto 1: 4 (10 mg di aloina sciolta in 0,2 ml di etanolo e 0,8 ml di terreno di coltura a pH 7,2 o tampone citrato pH 4,9) e ulteriormente diluita in terreno di coltura cellulare per gli studi TER. I pozzetti di controllo contenevano lo 0,8% di etanolo (500 μ M di aloina contiene 0,8% di etanolo). La lettura TER al basale è stata presa prima di aggiungere il composto in esame come valore iniziale, quindi con le seguenti concentrazioni di aloina (0,05, 0,5, 1,5, 5, 50 e 500 μ M) in compartimenti apicali. Le misurazioni TER dei singoli transwell sono state eseguite prima e dopo l'esposizione ad aloin in tutti i pozzetti (compresi i controlli) a 1, 2, 3, 4, 24 e 48 ore dopo l'esposizione.

Analisi statistica

I dati della curva di crescita batterica sono stati analizzati utilizzando ANOVA unidirezionale per determinare il significato statistico nella coltura trattata con diversa concentrazione di aloina. ANOVA a senso unico è stato anche utilizzato per scoprire il significato statistico sulla produzione di SCFA.

Durante l'analisi dell'rRNA 16S, i dati sono stati normalizzati in base alla mediana e al ridimensionamento automatico (deviazione media centrata / standard di ciascuna variabile). L'effetto dell'esposizione all'aloina sui batteri rappresentativi del livello specifico di phylum, genere e specie è stato calcolato come abbondanza percentuale. Successivamente, è stato eseguito un ANOVA unidirezionale per ottenere differenze significative tra i gruppi sperimentali e il controllo per Phyla, geni e livello di specie. Per l'analisi a livello di genere e specie, l'analisi discriminativa dei minimi quadrati parziali ortogonali (PLS-DA) è stata utilizzata per osservare la separazione tra diversi gruppi sperimentali e per valutare le somiglianze all'interno di un gruppo sperimentale, come descritto in precedenza ([Al-Momani et al., 2016](#) ; [Rabbi et al., 2016](#) ; [Gokulan et al., 2018](#)) La diversità beta è stata fornita come intensità della mappa di calore, in cui il risultato del clustering è stato mostrato come mappa di calore (misura della distanza usando l'euclideo e algoritmo di clustering usando il metodo di ward). La mappa di calore qui è espressa dall'abbondanza di genere o specie confrontando i controlli e i gruppi di trattamento (le singole colonne rappresentano la media di un gruppo sperimentale).

risultati

Attività antimicrobica dell'aloina contro i ceppi di *E. coli* J53

Per valutare l'attività antimicrobica dell'aloina rispetto al ceppo di riferimento *E. coli* J53, una sottocoltura è stata incubata con aloina da 2 mg / ml a 0,015 µg / ml mediante doppia diluizione seriale. La crescita batterica è stata monitorata per 24 ore con raccolta di dati a intervalli di 5 minuti. I dati cinetici della curva di crescita del controllo *E. coli* a basse concentrazioni di aloina indicavano che vi era una fase iniziale di ritardo di 3 ore, una fase esponenziale per 5-6 ore e una fase stazionaria a 14 ore. Alle due concentrazioni più alte di aloina (1 e 2 mg / ml), i pozzetti trattati hanno mostrato la completa inibizione della crescita di *E. coli*, che era statisticamente significativa ($p < 0,001$) rispetto ai batteri esposti a concentrazioni più basse (0,015 µg / ml a 0,5 mg / ml) di aloina (Figura 1A). Sono stati misurati pozzetti contenenti solo 2 mg / ml di aloina e avevano valori di assorbanza tra 0,1 e 0,15, che sono stati sottratti dai pozzetti sperimentali trattati con 2 mg / ml di aloina. Il valore di aloin MIC per il ceppo di *E. coli* era di 1 mg / ml.

FIGURA 1

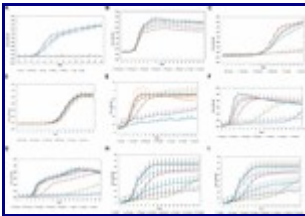


Figura 1. Proprietà antimicrobica dell'aloina su specie batteriche coltivate *in vitro*. Tutte le colture batteriche sono state incubate con diluizione seriale doppia di aloina iniziando una concentrazione da 2 mg / ml a 0,03 µg / ml (A – D) o da 4g / ml a 0,015 µg / ml (E – I). I dati qui presentati erano in media cinque esperimenti indipendenti. Valori di $p < 0,05$ o inferiori indicati come significatività statistica rispetto al gruppo di controllo o tra i gruppi sperimentali. Gli asterischi indicano significatività statistica (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (A) *E. coli*J53 è stato coltivato in condizioni aerobiche. (B, C) *L. acidophilus* è stato coltivato rispettivamente in condizioni aerobiche o anaerobiche. L'aloina non è stata in grado di uccidere *L. acidophilus* in condizioni anaerobiche. (D) *B. longum* è stato coltivato in condizioni anaerobiche. La figura mostra che solo una maggiore concentrazione di aloina è stata in grado di ridurre la crescita di *Bifidobacterium* in condizioni anaerobiche. (E, F) *E. faecium* è stato coltivato in condizioni aerobiche o anaerobiche, rispettivamente. La figura mostra che aloin è stato in grado di ridurre *E. faecium* crescita in condizioni aerobiche anche a concentrazione di 4 mg / ml ma incapace di prevenire la crescita batterica, tuttavia, aloin è stato in grado di uccidere la crescita di *E. faecium* in condizioni anaerobiche. (G) *B. thetaiotaomicron* è stato coltivato in condizioni anaerobiche. La figura mostra che l'aloina è stata in grado di uccidere la crescita di *B. thetaiotaomicron* in condizioni anaerobiche e il valore di MIC era di 1 mg / ml. (H) *A. muciniphila* è stato coltivato in condizioni anaerobiche. La figura mostra che l'aloina riduce la crescita di *A. muciniphila* in condizioni anaerobiche. (I) *Eubacteria* sp. è stato coltivato in condizioni anaerobiche. La figura mostra che l'aloina diminuisce l' *Eubacterium* sp. crescita in condizioni anaerobiche.

Concentrazione inibitoria minima di aloina contro i ceppi batterici commensali intestinali

Lo stesso approccio sperimentale è stato condotto per determinare la minima concentrazione inibente dell'aloina per i batteri umani commensali (cioè *L. acidophilus*, *B. longum*; *E. faecium*, *B. thetaiotaomicron*, *A. muciniphila* ed *Eubacterium* sp.). Per alcuni batteri, la concentrazione di aloina è stata aumentata oltre 2 mg / ml a 4 o 8 mg / ml poiché diverse specie batteriche non erano sensibili a 1 o 2 mg / ml di aloina. Questi esperimenti sono stati condotti in modo aerobico,

anaerobico o microaerofilo in base ai requisiti delle condizioni di crescita dei batteri.

La curva di crescita del *bifidobacterium longum* ha rivelato che 1 e 2 mg / ml di esposizione all'aloina hanno ridotto leggermente la crescita batterica, mentre concentrazioni inferiori di aloina non hanno avuto alcun effetto sulla crescita batterica ([Figura 1B](#)). *B. longum* esposto a 4 mg / ml di aloina ha anche mostrato un modello di crescita simile a 2 mg / ml di aloina. Nel complesso, la differenza nella crescita di *B. longum* non era statisticamente significativa. Questo risultato ha mostrato che l'aloina mostrava una scarsa attività antibatterica verso *B. longum* ; quindi, nessun valore MIC è stato registrato nella curva di crescita batterica. I risultati cinetici della crescita suggeriscono che in condizioni aerobiche, le concentrazioni di 1 e 2 mg / ml di aloina hanno inibito efficacemente la crescita di *L. acidophilus* ([Figura 1C](#)). L'effetto antimicrobico di queste due concentrazioni era statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto alle concentrazioni più basse (da 0,015 µg / ml a 0,5 mg / ml). La curva di crescita ha rivelato una fase iniziale di 11 ore per i campioni esposti a tutte le concentrazioni di aloina. *L. acidophilus* è cresciuto più rapidamente dopo la fase di ritardo e la sua fase di crescita esponenziale è stata di 3-4 ore, seguita da una fase stazionaria. In condizioni anaerobiche, i tempi di ritardo e fase log erano simili per le incubazioni aerobiche; tuttavia, in condizioni anaerobiche, l'aloina non ha avuto un effetto antimicrobico simile su *L. acidophilus* ([Figura 1D](#)). I pozzetti trattati con concentrazioni più elevate di aloina (superiori a 2 mg / ml) avevano anche una curva di crescita simile a quella osservata nei pozzetti trattati con concentrazioni più basse. Questi dati suggeriscono chiaramente proprietà antibatteriche differenziali dell'aloina in condizioni di coltura aerobica contro anaerobica. *L. acidophilus* cresciuto aerobicamente aveva un valore MIC di 1 mg / ml.

Al contrario, il risultato dei dati sulla crescita aerobica di *E. faecium* in presenza di aloina era significativamente diverso da *L. acidophilus*. In particolare, la fase log di *E. faecium* variava tra le concentrazioni più basse e più alte di aloina ([Figura 1E](#)). A concentrazioni più basse (125–250 µg / ml) la fase di ritardo era di circa 2 ore e la fase stazionaria era entro il punto temporale di 6 ore. Durante l'esposizione a concentrazioni più elevate (da 500 µg / ml a 4 mg / ml), il tempo di inizio della crescita esponenziale è stato ritardato di 3-4 ore e la crescita batterica è rimasta nella fase esponenziale fino a 20 ore con un tasso di crescita più lento. *E. faecium* esposto a 1, 2 e 4 mg / ml presentava una differenza statistica significativa ($p < 0,001$) in modo dose-dipendente rispetto ai gruppi trattati con basse concentrazioni di aloina. Tuttavia, in campioni trattati da 1 mg / ml, statisticamente significativo è stato osservato fino a 7 ore, a causa dell'aumento della crescita batterica, ma non è stata osservata alcuna differenza di significato dopo il punto temporale di 7 ore. Le colture trattate con 2 e 4 mg / ml di aloina hanno avuto una fase di ritardo per 8 ore, dopodiché la crescita batterica è iniziata lentamente; quindi, nessun valore MIC è stato registrato per *E. faecium* in condizioni aerobiche. In condizioni anaerobiche, i dati della curva di crescita hanno rivelato che la fase di ritardo era dose-dipendente. A bassa concentrazione (0,125 mg / ml), la fase di ritardo era di 2 ore, ma a una concentrazione più elevata (1 mg / ml) la fase di ritardo era di 7 ore ([Figura 1F](#)). La concentrazione più elevata (2 mg / ml) di aloina ha inibito completamente la crescita batterica. In 1 mg / ml di pozzetti esposti, la fase di registro è stata ritardata di più di 5-9 ore e ha raggiunto la fase stazionaria dopo 14 ore. Il valore di MIC di aloina per *E. faecium* è sceso tra 2 e 4 mg / ml concentrazioni.

Abbiamo anche esaminato l'effetto dell'aloina sulla crescita dei *batteriomi* . I dati della curva di crescita indicano che la concentrazione di MIC di aloina per i *batterioidi* era di 2 mg / ml; questa concentrazione ha completamente inibito la crescita batterica ed è stata statisticamente significativa ($p < 0,001$) rispetto agli effetti di concentrazioni di aloina inferiori ([Figura 1G](#)). Nelle colture di *Bacteroides* che sono state esposte a 1 mg / ml di aloina, la fase di ritardo è stata di circa 11 ore, quindi è iniziata la fase di registro che è continuata per 24 ore. Per le colture trattate da 500 µg / ml, la fase di ritardo era di 5 ore, quindi la fase di registro è continuata per 17 ore ed è statisticamente significativamente diversa dagli effetti delle concentrazioni di aloina inferiori. Dopo 18 ore, raggiunse la fase stazionaria e la crescita era simile a quella delle altre concentrazioni di aloina più basse.

Akkermansia muciniphila è un batterio anaerobico Gram-negativo che appartiene al phylum *Verrucomicrobia*, che colonizza nell'intestino e rappresenta circa l'1-5% dei batteri commensali nel colon. In soggetti sani, la sua funzione principale è quella di degradare la mucina e produrre numerosi prodotti metabolici ([Derrien et al., 2008](#)). Abbiamo testato l'effetto antimicrobico dell'aloina su *A. muciniphila*. La curva di crescita batterica ha mostrato un'inibizione della crescita dose-dipendente. I dati della curva di crescita hanno anche rivelato che la fase di ritardo era dose-dipendente e che le due concentrazioni più alte erano statisticamente diverse ($p < 0,05$) rispetto alle concentrazioni più basse ([Figura 1H](#)). Il valore MIC di aloin per *A. muciniphila* era di 2 mg / ml e la crescita batterica era completamente inibita.

I dati della curva di crescita di *Eubacterium* sp. ha rivelato che durante il periodo iniziale di 5 o 6 ore, il tasso di crescita batterica era molto lento nei pozzetti incubati con concentrazioni di aloina da 2 e 4 mg / ml, che era statisticamente significativo ($p < 0,05$) rispetto a quelli nei pozzi trattati con concentrazioni di aloina inferiori. *Eubacterium* spp. la capacità di metabolizzare lentamente l'aloina (dopo 5 ore) potrebbe causare l'accumulo di glucosio, che i batteri usano come nutriente per la crescita e la moltiplicazione. La crescita batterica di pozzetti trattati con aloina da 4 e 2 mg / ml era più elevata rispetto alle concentrazioni di aloina più basse dopo un'esposizione di 13-14 ore e ha continuato la fase di registro fino a 20 h ([Figura 1I](#)). Non è stato possibile determinare i valori di MIC probabilmente perché l'aloina è stata metabolizzata come precedentemente osservato ([Che et al., 1991](#) ; [Pogribna et al., 2008](#)). Abbiamo confermato questa osservazione analizzando il metabolismo dell'aloina nelle colture di *Eubacterium* mediante HPLC ([Lobbens et al., 2016](#)) ([Figura 2A](#)). L'analisi HPLC ha rivelato la scomparsa di aloin-A e aloin-B (il tempo di ritenzione era rispettivamente di 10.30 e 8.50 min) e la comparsa di aloe-emodin (il tempo di ritenzione era di 22.1 min), che fornisce prove che *Eubacterium* sp. aloina metabolizzata ([Figura 2B](#)).

FIGURA 2

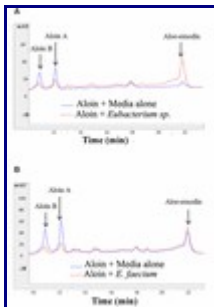


Figura 2. Metabolismo dell'aloina da parte dei batteri intestinali *Eubacterium* sp. ed *E. faecium* dopo l'incubazione. (A) Il pannello superiore mostra il metabolismo dell'aloina di *Eubacterium* sp. in condizioni anaerobiche. (B) Il pannello inferiore mostra il metabolismo dell'aloina da parte di *E. faecium* in condizioni anaerobiche. La freccia mostra l'area di picco e i tempi di ritenzione delle aloine isoforme e dell'aloemodin.

Effetto dell'aloina sulla popolazione batterica aerobica totale nei campioni fecali di ratto

La conta batterica ha rivelato che al momento delle 3 ore non vi era una differenza significativa nella conta batterica aerobica totale tra il gruppo di controllo e i campioni trattati con aloina ([Figura 3A](#)). La conta batterica aerobica totale in diretta ottenuta da incubazioni di liquami fecali di ratto era simile ai dati della curva di crescita batterica aerobica della coltura pura commensale umana, in cui, la maggior parte della crescita batterica aerobica ha mostrato una fase iniziale di ritardo di 3 h tranne *E. faecium*. In *E. faecium*, la curva di crescita ha mostrato che la fase di ritardo era di 1,5 ore. Questo può essere correlato all'effetto differenziale dell'aloina sui batteri commensali, come abbiamo osservato nella curva di crescita. I campioni raccolti nel punto temporale di 6 ore hanno mostrato un leggero aumento delle popolazioni batteriche nei campioni di controllo e campioni

incubati con 0,5 mg di aloina. Al contrario, la conta batterica aerobica è diminuita nei campioni trattati con aloina da 1 e 2 mg / ml, ma era statisticamente insignificante. Questo risultato supporta ulteriormente i risultati della curva di crescita batterica *in vitro*. Ad esempio, la curva di crescita di *B. longum* ha indicato che l'aloina (2 mg / ml) ha ridotto la crescita batterica del 10% e in *E. faecium* la crescita è stata inibita a una concentrazione più elevata. I campioni raccolti a 24 ore avevano conteggi batterici simili a quelli dei gruppi di controllo a 6 ore. Al contrario, la conta batterica dei campioni trattati con aloina è diminuita e l'effetto è stato significativo ($p < 0,05$) nel gruppo trattato con 2 mg / ml rispetto ai campioni trattati con 0,5 e 1 mg / ml ([Figura 3A](#)). Complessivamente, la conta batterica ha rivelato che 2 mg / ml di campioni trattati con aloina hanno subito un'inibizione della crescita dipendente dal tempo e dalla dose di batteri aerobici. Questa osservazione era coerente con i risultati della coltura di crescita batterica *in vitro*, che suggeriva che concentrazioni più elevate avevano proprietà antimicrobiche.

FIGURA 3

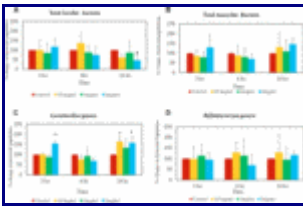


Figura 3. Cambiamenti della conta batterica viva dopo l'esposizione ad aloina in campioni fecali di ratto. I dati mostrano una variazione percentuale nella popolazione batterica viva rispetto al controllo. **(A)** Conte batteriche vive aerobiche dopo il trattamento con aloina, **(B)** conteggi batteriche vive anaerobiche dopo esposizione con aloina, **(C)** conteggi vivi di *Lactobacillus* in ambiente microaerofilo dopo esposizione con aloina e **(D)** conteggi batterici vivi di *Bifidobacterium* dopo esposizione con aloina. I dati mostrati qui sono in media quattro esperimenti individuali. Valori di $p < 0,05$ o inferiori indicati come significatività statistica. Gli asterischi indicano un significato statistico (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Effetto dell'aloina sulle popolazioni batteriche anaerobiche totali nei campioni fecali di ratto

I dati sulla conta batterica anaerobica suggeriscono che nel punto temporale di 3 ore 0,5 e 1 mg / ml i campioni trattati con aloina presentavano una conta batterica bassa rispetto ai gruppi di controllo ([Figura 3B](#)). Al contrario, i campioni trattati con 2 mg / ml presentavano una conta batterica più elevata rispetto ad altri gruppi ($p < 0,05$).

Effetto dell'aloina sul *lattobacillo* nei campioni fecali di ratto

Al momento delle 3 ore, i campioni trattati con 2 mg / ml di aloina avevano conteggi batterici leggermente più alti rispetto ad altri gruppi, che erano staticamente significativi ($p < 0,01$) ([Figura 3C](#)). Al contrario, al momento delle 24 ore la conta dei batteri vivi indicava che tutti i gruppi sperimentali avevano un aumento della popolazione batterica; tuttavia, solo 0,5 e 2 mg / ml di campioni trattati erano statisticamente significativi.

Effetto dell'aloina sul *bifidobatterio* nei campioni fecali di ratto

La coltura batterica del *bifidobatterio* somministrata con aloina ha rivelato che non vi era un cambiamento significativo nella conta batterica nei campioni raccolti a 3 ore. I campioni raccolti nel punto temporale di 6 ore hanno mostrato un lieve aumento della conta batterica nei trattamenti con aloina da 0,5 e 1 mg / ml. I campioni trattati con 2 mg / ml di aloina avevano una conta batterica inferiore, ma erano statisticamente insignificanti ([Figura 3D](#)). I campioni raccolti nel periodo di 24 ore presentavano conteggi batterici più elevati rispetto ai gruppi di controllo, ma si sono rivelati

statisticamente insignificanti a causa della variazione individuale.

L'effetto dell'aloina sulla produzione di acidi grassi a catena corta

I batteri intestinali metabolizzano i materiali alimentari non digeriti e producono SCFA ([Wong et al., 2006](#)). Quindi, abbiamo analizzato la produzione di SCFA di acido acetico, butirrico, succinico, lattico, propionico, isobutirrico, valerico, esnoico e isovalerico dalla sospensione fecale trattata con aloina. È importante sottolineare che il butirrato è noto per avere un ruolo centrale nell'omeostasi delle cellule epiteliali intestinali ([Kelly et al., 2015](#)). I nostri risultati suggeriscono che la produzione di butirrato è diminuita a causa dell'esposizione all'aloina ([Figura 4A](#)); tuttavia, non abbiamo potuto osservare alcun significato statistico per gli altri SCFA [acido acetico e acido succinico ([Figure 4B, C](#))]. Il risultato ha rivelato che nei punti di tempo 3 e 6 h, non vi era alcun cambiamento nella produzione di butirrato né nel controllo né nei gruppi sperimentali. Al contrario, i campioni di 24 ore hanno rivelato una diminuzione della produzione di butirrato in modo dose-dipendente. In particolare, i campioni trattati con aloina da 1 e 2 mg / ml hanno mostrato statistiche significative rispetto ai campioni trattati con aloina da 0,5 mg ([Figura 4A](#)).

FIGURA 4

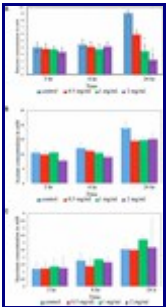


Figura 4. Produzione di acido grasso a catena corta (SCFA) da parte di batteri intestinali di ratto dopo esposizione ad aloina. I campioni fecali per l'analisi SCFA sono stati raccolti in tre diversi punti temporali (3, 6 e 24 ore). La produzione SCFA è stata misurata con il metodo HPLC. I dati presentati sono medie di quattro esperimenti indipendenti. **(A)** Produzione di butirrato, **(B)** produzione di acido acetico e **(C)** produzione di succinato. Valori di $P < 0,05$ o inferiori considerati statisticamente significativi. Gli asterischi indicano un significato statistico ($*p < 0,05$).

L'effetto di aloina su Phyla batterica valutato dal sequenziamento di rRNA 16s

I dati sulla curva di crescita batterica intestinale umana hanno rivelato che la proprietà antibatterica dell'aloina varia tra le condizioni aerobiche e anaerobiche per le stesse specie batteriche (ad esempio *Lactobacillus* ed *Enterococcus*). Per l'analisi globale delle popolazioni batteriche, il sequenziamento dell'rRNA 16s è stato condotto per valutare l'effetto antimicrobico dell'aloina nei batteri commensali intestinali di ratto. L'analisi del livello phyla ha rivelato che *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* erano i principali phyla che hanno contribuito a oltre il 95% della popolazione batterica in tutti i campioni ([Figura 5A](#) pannello superiore). Inoltre, l'analisi ha anche rivelato il contributo di *Verrucomicrobia* e *Actinobatteri* in piccola percentuale. La valutazione delle variazioni di abbondanza a livello di phyla per i controlli e i campioni trattati con aloina ha suggerito variazioni tra i gruppi di trattamento e i tempi di esposizione. Alcune importanti differenze tra *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Actinobacteria* phyla sono state osservate in campioni trattati con aloina ([Figura 5](#) pannello inferiore). In particolare, l'abbondanza di questi tre phyla batterici ha comportato cambiamenti significativi nei campioni raccolti nel punto temporale di 24 ore per tutte e tre le concentrazioni di aloina (0,5, 1 e 2 mg / ml). L'abbondanza di phylum *Firmicutes* è diminuita con l'aumentare della concentrazione di aloina nel tempo (6 e 24 ore). Un'osservazione interessante è stata che l'abbondanza di *Actinobacteria* era più prominente a 24 ore rispetto a 3 e 6 ore. Questo phylum è stato trovato più abbondante nei campioni trattati con aloina

rispetto al controllo (vedere il pannello superiore della [Figura 5A](#)).

FIGURA 5

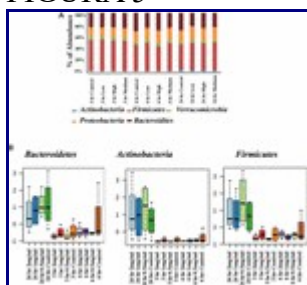


Figura 5. Cambiamenti nella struttura della comunità batterica intestinale dovuti a trattamenti con aloina. **(A)** Il diagramma a barre della pila del pannello superiore mostra l'abbondanza di batteri a livello di phyla a causa del trattamento con aloin. In particolare, *Actinobacteria* a 24 h in campioni trattati con aloina (mostrati in blu) sul gruppo di controllo. **(B)** I diagrammi del riquadro inferiore mostrano l'abbondanza comparativa di tre phyla batterici a 24 ore di colture trattate con aloina.

L'effetto dell'aloina sul livello del genere batterico valutato dal sequenziamento dell'rRNA 16s

Successivamente, abbiamo valutato la somiglianza / le differenze tra i gruppi sperimentali trattati con aloina usando le analisi discriminanti dei quadrati minimi parziali ortogonali (PLS-DA) ([Rabbi et al., 2016](#)). L'analisi dei componenti principali ha rivelato che i campioni raccolti a 3 e 6 ore (0,5, 1 e 2 mg / ml) erano raggruppati più strettamente ([Figura 6A](#)). Al contrario, i campioni raccolti nel punto temporale di 24 ore (0,5, 1 e 2 mg / ml) separati dagli altri punti temporali e distribuiti in un intervallo più ampio. Successivamente, abbiamo analizzato l'abbondanza di generi batterici mediante ANOVA a senso unico, che ha rivelato differenze marcate tra nove generi. L'analisi ha fornito la tendenza dell'abbondanza batterica su *Bacterioidetes*, *Afipia*, *Marivita*, *Turicibacter*, *Microcystis*, *Haemophilus*, *Sneathia*, *Lactobacillus* e *Alkalibacter* nei campioni raccolti nel punto temporale di 24 ore per tutte e tre le concentrazioni (0,5, 1 e 2 mg / ml) sono stati confrontati con i campioni raccolti nei punti temporale di 3 e 6 ore ([Figura 6B](#)). Tra i campioni di 24 ore, il controllo aveva un'abbondanza maggiore di questi generi batterici rispetto ai gruppi sperimentali per tutte e tre le concentrazioni. Più specificamente, l'abbondanza batterica nei campioni esposti a una maggiore concentrazione di aloina (2 mg / ml) è stata maggiormente colpita. Al contrario, il genere *Alkalibacter* era abbondante nei campioni raccolti a 3 e 6 h di punti temporali per tutte e tre le concentrazioni di aloina. Questi risultati erano coerenti con i dati della curva di crescita batterica (ad esempio *L. acidophilus*) generato nel presente studio. Successivamente, è stata generata una mappa di calore per definire la diversità beta ([Figure 6C, D](#)) che rivela l'abbondanza generale del genere nei gruppi sperimentali e l'abbondanza dei primi 50 generi, rispettivamente.

FIGURA 6

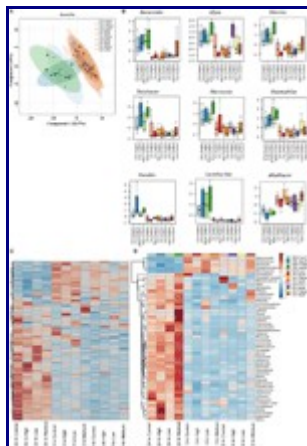


Figura 6. L'effetto dell'aloina sulla comunità batterica intestinale a livello di genere. **(A)** Il diagramma PCA mostra una chiara segregazione della comunità batterica a livello di genere a 24 ore campioni di punti non osservati nei campioni da altri punti di due tempi. I campioni raccolti da 3 e 6 h di punti temporali sono raggruppati strettamente. Questa analisi richiede $n = 4$. Qui l'asse X è il genere batterico e le variabili Y sono osservazioni di diversi gruppi di trattamento confrontati insieme. **(B)** Queste cifre mostrano che l'esposizione all'aloina altera la comunità batterica aumentando o diminuendo l'abbondanza batterica a livello di genere. Qui mostriamo esempi rappresentativi di generi batterici ad alta e bassa abbondanza dovuti al trattamento con aloin. **(C, D)** La mappa di calore visualizzata fornisce una visualizzazione integrata dell'abbondanza OTU e mostra le somiglianze e le differenze nei sottoinsiemi di dati. Nella mappa di calore, ogni cellula colorata rappresenta l'abbondanza di comunità batterica in ciascun gruppo / campione sperimentale (beta-diversità). **(C)** Il pannello di sinistra della mappa di calore mostra l'abbondanza di popolazione batterica a livello di genere nei gruppi sperimentali di controllo e trattati con aloina. **(D)** Il pannello di destra (mappa di calore) mostra i primi 50 generi batterici che si sono alterati (aumentati o diminuiti) a causa del trattamento con aloin.

L'effetto dell'aloina a livello di specie batteriche valutato dal sequenziamento dell'rRNA 16s

Successivamente, l'analisi si è concentrata sul livello delle specie batteriche per vedere se vi fosse alcuna separazione tra gruppi sperimentali riguardanti specifiche specie batteriche. L'analisi PLS-DA ha mostrato le differenze nel livello delle specie nei campioni esposti ad aloina. La separazione delle specie era simile al livello del genere. In particolare, i campioni raccolti nel punto temporale di 24 ore (tutte e tre le concentrazioni) sono stati raggruppati insieme. Al contrario, i campioni che sono stati raccolti a 3 e 6 ore raggruppati e separati da campioni di 24 ore ([Figura 7A](#)). Abbiamo anche osservato una chiara differenza a livello di specie per i gruppi sperimentali.

FIGURA 7

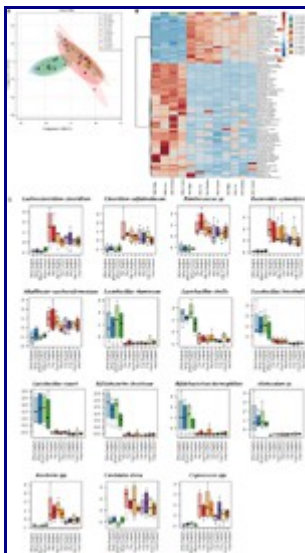


Figura 7. Segregazione della comunità batterica a livello di specie. **(A)** Il diagramma PCA mostra la chiara segregazione della comunità batterica a livello di specie a campioni di punti temporale di 24 ore dagli altri due punti temporali. I campioni raccolti da 3 e 6 h di punti temporali sono raggruppati strettamente. Le trame PCA rivelano anche che la diversificazione era più a livello di specie che a livello di generi. **(B)** La mappa del calore mostra la diversità tra i gruppi sperimentali trattati con aloina. La mappa del calore mostra le prime 50 specie batteriche che si sono modificate (aumentate o diminuite) a causa del trattamento con aloin. Qui abbiamo mostrato con un segno di freccia rossa di alcune specie batteriche, che sono state ridotte a causa del trattamento con aloin. Queste specie contribuiscono in modo determinante alla produzione di butirrato nell'intestino.

(C) Queste cifre mostrano che l'esposizione all'aloina modifica la comunità batterica aumentando o diminuendo l'abbondanza a livello di specie. Qui mostriamo esempi rappresentativi di alta e bassa abbondanza di specie batteriche a causa del trattamento con aloin.

Per fornire un quadro chiaro dell'effetto dell'aloina a livello di specie, è stata generata la mappa di calore per fornire la diversità beta nei gruppi sperimentali ([Figura 7B](#)). La mappa di calore fornisce un'istantanea dell'abbondanza batterica a livello di specie e la differenza all'interno di un gruppo sperimentale e tra i gruppi sperimentali. Qui, abbiamo fornito i dati della mappa di calore per le prime 50 specie batteriche colpite dal trattamento con aloin. Le specie batteriche rappresentative più significative, in cui i trattamenti con aloina non hanno avuto effetti negativi sulle specie *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus similis*, *Lactobacillus Intestinalis* e *L. reuteri* , che hanno mostrato abbondanza nei campioni di 24 ore ([Figura 7C](#)) per tutte e tre le concentrazioni di aloina. È interessante notare che il trattamento con aloina ha aumentato l'abbondanza di queste specie batteriche rispetto al controllo. Il risultato del sequenziamento dell'rRNA 16s è coerente con i dati della curva di crescita di *L. acidophilus* e conteggio batterico vivo, in cui aloin manca di proprietà microbica o aumenta la crescita batterica. Allo stesso modo, anche *Bifidobacterium choerinum* e *B. thermophilum* sono aumentati a causa del trattamento con aloin a campioni di 24 ore. Al contrario, *Clostridium indolis*, *Clostridium sulfatireducens*, *Bacteroides xyloxylicus* e *Alkalibacter saccharofermentans* sono diminuiti in abbondanza nei campioni raccolti nel punto temporale di 24 ore ([Figura 7C](#)) per tutte e tre le concentrazioni di aloina. Queste specie batteriche erano abbondanti nei campioni raccolti nei punti di tempo 3 e 6 h per tutte e tre le concentrazioni. Abbiamo anche osservato che nelle conte batteriche vive e nella curva di crescita batterica, l'aloina aveva proprietà antimicrobiche a concentrazione più elevata, nonché durante un'esposizione prolungata ([Figure 1C, F](#) , [3A](#)). I dati di sequenziamento supportano molto bene i dati sperimentali *in vitro* del presente studio.

Effetto dell'aloina sulla resistenza transepiteliale

Lo studio sulla citotossicità cellulare ha rivelato che l'aloina a concentrazioni più elevate ha indotto la morte cellulare. Successivamente, abbiamo testato se basse concentrazioni di aloina possono avere un impatto sulla permeabilità delle cellule epiteliali intestinali o no? In questo esperimento, abbiamo sciolto aloina in due diverse soluzioni di pH (pH 4,9 e 7,2) e testato l'integrità della barriera intestinale per imitare il pH intestinale. Quando le cellule sono state esposte con aloina (0,05–500 μ M) che è stata sciolta in tampone pH 7,2, la resistenza transepiteliale è aumentata in modo simile al controllo indicando che l'integrità della barriera rimane intatta ([Figura 8A](#)). Al contrario, quando le cellule sono state esposte ad aloina a (0,05–500 μ M) disciolte a pH 4,9 (quindi diluite in terreni di coltura cellulare quindi il pH finale era uguale a terreni di coltura) il valore TER diminuiva in modo dose-dipendente indicando l'integrità della barriera compromessa ([Figura 8B](#)). Poiché l'aloina viene metabolizzata dai batteri intestinali in aloe-emodin, abbiamo anche testato l'effetto dell'aloemodina sull'integrità delle cellule intestinali. L'aloemodina è stata sciolta in etanolo e diluita in terreni di coltura (pH 7,2). I risultati hanno rivelato che l'aloemodina non ha ridotto il valore TER indicando che l'integrità della barriera intestinale è rimasta intatta ([Figura 8C](#)).

FIGURA 8

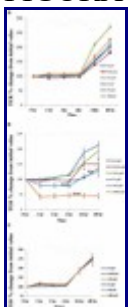


Figura 8. L'effetto di aloina sulla permeabilità delle cellule epiteliali intestinali umane. Le cellule T84 sono state coltivate nei pozzetti fino a raggiungere un valore TER di 1.000 o superiore. Il valore TER è stato registrato prima e dopo l'incubazione con cinque concentrazioni di aloina (0,05, 0,5, 5, 50 e 500 μ M) a 0, 1, 2, 3, 24 e 48 ore. I valori TER registrati prima di aggiungere aloina sono serviti come valore di base. I dati sono presentati qui come % aumento o diminuzione dalle letture di base. Questi dati rappresentano una media di sette esperimenti indipendenti. L'asterisco * indica un significato statistico. **(A)** Questo grafico mostra il valore TER per aloina disciolta a pH 7,2. **(B)** Mostra il valore TER per aloina disciolto in tampone citrato a pH 4,9 e ulteriormente diluito in terreni di coltura cellulare (terreni privi di antibiotici). **(C)** Valore TER per aloe-emodin. Gli asterischi indicano significatività statistica (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Discussione

Le molecole farmacologiche e fitochimiche estratte dalle piante di Aloe Vera mostrano diverse proprietà benefiche ([Briggs, 1995](#) ; [Moore and Cowman, 2008](#)). Tuttavia, diversi studi riportano anche effetti avversi dell'aloina, ad esempio uno studio sull'uomo ha mostrato che il consumo orale di 500 mg di capsula di estratto di aloe per 4 settimane da una donna di 56 anni ha provocato epatotossicità acuta; tuttavia, dopo l'interruzione delle capsule di aloe è stato notato un rapido miglioramento del danno epatico ([Rabe et al., 2005](#)). In un altro caso di studio, un giovane adulto di 24 anni ha consumato 500 mg di capsule di Aloe Vera per 3 settimane; la biopsia epatica di questo individuo ha rivelato una tossicità epatica simile alla tossicità epatica indotta da farmaci e altre anomalie cliniche ([Kanat et al., 2006](#)). Numerosi altri studi forniscono anche prove del fatto che il consumo orale umano di aloe vera ha portato all'epatotossicità ([Bottenberg et al., 2007](#) ; [Yang et al., 2010](#) ; [Lee et al., 2014](#)).

I prodotti di aloe consumati per via orale raggiungono l'intestino dove interagiscono con le cellule epiteliali intestinali e il microbiota intestinale degli abitanti. Studi precedenti hanno dimostrato che l'aloina mostra proprietà antimicrobiche contro i batteri patogeni ([Asamenew et al., 2011](#) ; [Abeje et al., 2014](#)); tuttavia, sono disponibili informazioni limitate sulle proprietà antimicrobiche dell'aloina sul microbiota commensale intestinale umano. L'asse intestino-fegato con particolare attenzione al microbiota commensale e ai fattori derivati dal microbiota è emerso come protagonista nelle malattie epatiche e intestinali ([Adolph et al., 2018](#)). Un microbiota intestinale equilibrato è essenziale per l'omeostasi intestinale e la salute generale. Pertanto, è necessario affrontare il divario di conoscenza tra le interazioni dei prodotti derivati dall'aloie con effetti sul microbiota commensale dell'intestino. In questo studio, abbiamo esaminato se l'aloina ha attività antimicrobica contro il microbioma intestinale. Gli approcci sperimentali utilizzati in questo studio sono stati cinque volte: (1) valutare la proprietà antimicrobica dell'aloina contro batteri commensali intestinali selezionati che sono noti per contribuire positivamente alla salute umana; (2) valutare l'effetto dell'aloina sui campioni fecali di ratto che imitano la composizione batterica dell'intestino umano in condizioni anaerobiche per delineare l'effetto sulla comunità batterica commensale intestinale; (3) per determinare l'effetto dell'aloina sulla produzione di SCFA da parte di batteri commensali intestinali; (4) per valutare se l'aloina modifica la permeabilità delle cellule epiteliali intestinali e (5) calcolare il metabolismo dell'aloina da parte dei batteri commensali intestinali.

L'intestino umano è una residenza per 35.000 specie batteriche ([Frank et al., 2007](#)) che appartengono a 50 phyla batteriche ([Schloss et al., 2005](#)). Tra questi *Bacteroidetes* e *Firmicutes* sono due principali phyla che rappresentano il 90-95% della popolazione batterica ([Gordon e Dubos, 1970](#)). Inoltre, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* e altri phyla contribuiscono anche a varie funzioni nell'intestino ([Eckburg et al., 2005](#)). Nel presente studio, i dati di sequenziamento dell'rRNA 16S indicano che i *bacterioideti*, i *firmicutes* e i *proteobatteri* contribuiscono al 90%, mentre i *verrucomicrobiae* gli *attinobatteri* contribuiscono per i rimanenti phyla trovati nei campioni fecali di ratto ([Figura 3](#)), che si allineano alle precedenti relazioni ([Fujio-Vejar et al., 2017](#)). Le specie batteriche commensali sono distribuite in modo differenziato e

colonizzate in tutto l'intestino. I phyla batterici di ratto sono più strettamente correlati all'uomo rispetto ad altre specie murine ([Li et al., 2017](#)). In questo studio, abbiamo testato gli effetti antibatterici di aloina contro sette specie batteriche (un patogeno e sei batteri commensali) che appartiene a cinque phyla batterici dominanti del microbiota umano ([Tabella 1](#)). Per l' *in vitro* studio della curva di crescita batterica, abbiamo usato batteri commensali Gram-positivi e Gram-negativi rappresentativi. Le condizioni di crescita testate su queste specie batteriche variavano da anaerobiche rigorose a anaerobiche facoltative ([Tabella 1](#)).

TABELLA 1

Tabella 1. Valore di Aloin MIC per batteri commensali intestinali sia Gram-positivi che Gram-negativi.

In precedenza, è stato riferito che l'aloina mostra attività antibatterica nei confronti dei batteri Gram-negativi ([Asamenew et al., 2011](#) ; [Mariappan e Shanthi, 2012](#)), ma non è in grado di uccidere il ceppo Gram-positivo, come *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* ([Meğeressa et al., 2015](#)). Nel presente studio, la curva di crescita batterica *in vitro* mostra che l'aloina presenta anche proprietà antimicrobiche nei confronti dei batteri commensali intestinali Gram-positivi, in particolare *E. faecium* e *L. acidophilus*. Tuttavia, aloin aveva un'attività antibatterica limitata verso *B. longum*, un altro membro dei batteri Gram-positivi. Numerosi batteri intestinali sono importanti per la sintesi vitaminica e il degrado di materiali alimentari non digeriti ([Wong et al., 2006](#)). Studi precedenti hanno dimostrato che *Eubacterium* sp. è in grado di degradare l'aloina in aloe-emodin e glucosio, che viene quindi utilizzato come fonte di energia per la moltiplicazione batterica ([Pogribna et al., 2008](#)). I nostri risultati sono coerenti con un precedente rapporto che *Eubacterium* spp. la moltiplicazione era direzionalmente proporzionale alla concentrazione di aloin nei terreni di coltura ([Che et al., 1991](#)). Utilizzando un modello non animale abbiamo anche confermato precedenti rapporti secondo cui l'aloina viene metabolizzata in aloe-emodin o aloesina da batteri intestinali ([Che et al., 1991](#)). Questi metaboliti sono strutturalmente simili agli antrachinoni e ai cromoni, che presentano attività antibatterica contro i batteri patogeni Gram-positivi e Gram-negativi ([Budzisz et al., 2001](#) ; [Cock, 2007](#)). L'aloina e i suoi metaboliti possono funzionare in modo simile agli antrachinoni o ai cromoni nei confronti dei batteri commensali intestinali. La crescita di *L. acidophilus*, *E. faecium* e *B. thetaiotaomicron* sono state completamente inibite alla concentrazione di 1 mg / ml ([Figure 1C, E, G](#)), il che indica che l'aloina ha livelli simili di attività antibatterica sia Gram-positivi che Gram batteri negativi.

Il meccanismo molecolare dell'attività antibatterica dell'aloina o dei suoi metaboliti e antrachinoni non è ben compreso. Tuttavia, sono stati proposti diversi meccanismi per le proprietà antimicrobiche dell'aloina o dei suoi metaboliti, tra cui l'inibizione del trasporto della membrana e della respirazione ([Ubbink-Kok et al., 1986](#) ; [Hamman, 2008](#)). L'aloina e i suoi metaboliti contengono strutture fenoliche che sono considerate molecole bioattive, che possono presentare proprietà antimicrobiche contro i batteri commensali. Un recente studio ha fornito i meccanismi molecolari alla base della proprietà antimicrobica dell'emodin (metaboliti dell'aloina). Emodin, un antrachinone, interagisce con le proteine della parete cellulare batterica, aumentando così la permeabilità dovuta all'alterazione dell'integrità strutturale della parete cellulare. Ciò provoca un deflusso di contenuti intracellulari che può provocare la morte batterica ([Li et al., 2016](#)). Emodin provoca effetti batteriostatici inibendo la crescita batterica o le moltiplicazioni a basse concentrazioni (16 e 32 µg / ml) e provoca l'effetto battericida a concentrazione più elevata (64 µg / ml) ([Li et al., 2016](#)). I risultati cinetici di crescita del presente studio forniscono anche prove che l'aloina a basse concentrazioni provoca l'effetto batteriostatico su *L. acidophilus* (*condizione aerobica*), *E. faecium* e *B. thetaiotaomicron* ed effetto battericida a concentrazioni più elevate. Tuttavia, la proprietà antibatterica dell'aloina è specifica della specie e dipende da fattori ambientali come le condizioni di crescita aerobica e anaerobica.

Nel presente studio, il *L. acidophilus* cresciuto in presenza di 1 mg / ml di concentrazione di aloina ha subito un'inibizione della crescita solo in condizioni aerobiche, mentre 2 mg / ml e oltre hanno causato un effetto battericida ([Figura supplementare S1](#)). È interessante notare che, a basse concentrazioni di aloina, *L. acidophilus* appariva come una lunga catena di batteri. Questo aspetto "a catena" potrebbe essere correlato all'aggregazione batterica causata da aloina o batteri di nuova divisione non in grado di staccarsi l'uno dall'altro in presenza di basse concentrazioni di aloina (0,5 e 1 mg / ml). Al contrario, i batteri esposti a una maggiore concentrazione di aloina hanno perso la loro morfologia a forma di bastoncino e sono apparsi come una struttura "a setole". Abbiamo anche esaminato il meccanismo battericida dell'aloina mediante colorazione *L. acidophilus* con arancio di acridina e bromuro di etidio dopo il completamento dell'esperimento sulla curva di crescita. I pozzi esposti a 0,5 mg / ml di aloina hanno rivelato che tutto il *L. acidophilus* era macchiato di verde, mentre i batteri macchiati di arancione non erano osservabili. L'arancia acridina permea la membrana cellulare intatta dei batteri a forma di bastoncino, si intercala con il DNA e fluorescente di colore verde, che è indicativo di *L. acidophilus* vivo. Inoltre, tutti i batteri hanno conservato la morfologia della forma dell'asta. Questo risultato suggerisce che una bassa concentrazione di aloina (0,5 mg / ml) non è in grado di indurre il meccanismo di uccisione o la citotossicità. I pozzetti esposti a 1 mg / ml hanno mostrato il 50% di batteri con verde e il resto di colore rosso. I batteri di colore rosso indicano che il bromuro di etidio permea i batteri che hanno perso l'integrità della membrana o nel processo. Al contrario, i pozzetti esposti con 2 mg / ml contenevano batteri di colore rosso. Probabilmente, hanno perso l'integrità strutturale della parete cellulare e hanno formato strutture simili a setole ([Figura supplementare S1](#)) indicando che una maggiore concentrazione di aloina ha causato effetti battericidi. Il possibile meccanismo di effetti battericidi che l'aloina può causare sulle membrane batteriche è molto simile all'emodin ([Li et al., 2016](#)).

I campioni fecali di ratto esposti a varie concentrazioni di aloina hanno subito variazioni nella popolazione batterica intestinale. I campioni di feci esposti a basse concentrazioni di aloina (0,5 e 1 mg / ml) sono stati sottoposti a lievi perturbazioni nei punti di tempo 3 e 6 ore, mentre a 24 ore le unità di formazione di colonie batteriche (CFU) sono state aumentate o diminuite a seconda delle specie batteriche. Ad esempio, in condizioni di crescita anaerobica *Lactobacillus* CFU è aumentato nel punto temporale di 24 ore, ma non nel punto temporale di 3 o 6 ore. Questi dati sono coerenti con il risultato della curva di crescita anaerobica *in vitro* di *L. acidophilus* , in cui abbiamo osservato una fase iniziale di ritardo di 10 h seguita da una crescita esponenziale ([Figura 3C](#)). I dati di sequenziamento dell'rRNA 16S hanno rivelato l'abbondanza di specie *Lactobacillus* ([Figura 6C](#)) e supporta i dati della curva di crescita batterica *in vitro* e i dati sulla curva di crescita batterica viva fecale. Nel presente studio, abbiamo dimostrato che l'aloina mostra attività antibatterica per alcuni batteri commensali intestinali e che il valore di MIC variava da 1 mg a 4 mg / ml. Il gel di aloe concentrato o la forma in polvere di estratti di foglie sono disponibili sul mercato sotto forma di capsule contenenti una dose di 100–500 mg. Considerando che, il consumo di liquido provoca l'esposizione a circa 14,4 g di estratto di foglie intere. In questi prodotti di consumo, aloin, i livelli vanno dallo 0,1 al 6,6% del peso secco delle foglie ([Groom and Reynolds, 1987](#)); indicando così la presenza di aloina in un intervallo di concentrazione compreso tra 0,1 e 35 mg. Tuttavia, per quanto ne sappiamo, mancano dati su quali livelli di concentrazione raggiungono il GIT.

Successivamente, abbiamo analizzato l'effetto dell'aloina sulla produzione di SCFA da parte di batteri commensali intestinali, che è una fonte di energia essenziale per le cellule epiteliali intestinali e l'omeostasi intestinale. I dati HPLC forniscono la prova che la produzione di butirrato derivato microbico era diminuita nel punto temporale di 24 ore nei campioni di feci trattati con aloina. I dati di sequenziamento confermano ulteriormente una diminuzione dell'abbondanza di specie batteriche che producono butirrato (*Clostridium* spp., *Roseburia* spp., *Coprococcus* spp. *Ed Eubacterium* spp.) A 24 ore ([Figura 6C](#)). L'esaurimento delle specie batteriche si verifica più facilmente nei campioni trattati con aloina rispetto ai campioni di controllo. Uno studio recente suggerisce che l'esposizione alla streptomina nei topi ha ridotto il butirrato producendo *clostridi* nell'intestino entro un giorno, il che ha provocato una riduzione della concentrazione di butirrato di

quattro volte nel cieco e ha facilitato l'espansione del patogeno aerobico *S. Typhimurium* ([Rivera-Chavez et al., 2016](#)). Nell'intestino *Clostridia* spp. apporta una notevole quantità di butirrato ([Louis e Flint, 2009](#) ; [Vital et al., 2014](#)), che viene consumato dai colonociti per creare un ambiente ipossico ([Kelly et al., 2015](#)) nell'intestino convertendo il butirrato in CO₂ ([Donohoe et al., 2012](#)). Il cambiamento nella struttura della comunità batterica intestinale è stato fortemente correlato alla malattia del colon e alla sindrome dell'intestino irritabile (IBS) principalmente a causa di una diminuzione della produzione di butirrato ([Sokol et al., 2009](#) ; [Eeckhaut et al., 2013](#)). Nei pazienti con colite ulcerosa con ridotta produzione di butirrato, l'esaurimento di *Clostridium coccoides* e *Clostridium leptum* è stato un probabile fattore che contribuisce all'eziologia ([Kumari et al., 2013](#)). Inoltre, il butirrato di origine microbica intestinale aumenta il consumo di ossigeno mitocondriale dipendente e inibisce l'espressione del mediatore proinfiammatorio attraverso l'istone deaceylase ([Davie, 2003](#) ; [Furusawa et al., 2013](#) ; [Zheng et al., 2017](#)). Questi studi suggeriscono l'importanza del butirrato di origine microbica intestinale sull'omeostasi intestinale. Nel presente studio, la ridotta produzione di butirrato potrebbe essere correlata alla ridotta abbondanza di specie batteriche che producono butirrato. Mostriamo che l'alta concentrazione e l'esposizione a lungo termine dell'aloina hanno ridotto la produzione di butirrato nei campioni fecali di ratto. La ridotta produzione di butirrato da parte di batteri commensali intestinali può essere correlata allo sviluppo di anomalie intestinali riportate negli studi sugli animali ([Boudreau et al., 2013](#) , [2017](#)). I dati di sequenziamento completano la produzione di SCFA e forniscono prove della proprietà antibatterica di aloina su SCFA che produce batteri commensali. Inoltre, il butirrato fornisce una fonte di energia per le cellule epiteliali intestinali e promuove la formazione di barriera epiteliale diminuendo l'espressione dei pori che formano i geni claudin-2 ([Zheng et al., 2017](#)) e sopprimendo l'infiammazione del colon e la carcinogenesi attraverso l'attivazione del recettore GPA109a ([Singh et al., 2014](#)).

Esperimenti di resistenza transepiteliale intestinale hanno rivelato che l'aloina riduce la funzione di barriera alla permeabilità solo ad alte concentrazioni. L'aloina disciolta a pH 4,9 ha ridotto il valore di TER indicando che la funzione barriera è compromessa entro 2 ore dall'esposizione. È stato dimostrato che l'aloina è più stabile nel pH acido (pH 2,0) per un periodo più lungo rispetto al pH basico (pH 8,0) ([Ding et al., 2014](#)). L'aloina disciolta a pH 4,9 può essere più stabile rispetto a pH neutro 7,2. La funzione di barriera compromessa può essere associata alla stabilità di aloina a pH acido 4,9. Le cellule trattate con aloe-emodin hanno mantenuto l'integrità della barriera intestinale. L'obiettivo era valutare l'effetto dell'aloina sulle cellule epiteliali intestinali; quindi, non abbiamo testato le sue proprietà dissolvendo l'aloemodin in pH acido 4,9. La citotossicità da aloina è stata anche valutata utilizzando cellule epiteliali intestinali polarizzate. Le cellule epiteliali intestinali polarizzate sono state esposte alle stesse concentrazioni utilizzate nei batteri commensali intestinali. Per differenziare le cellule vive e morte, sono stati aggiunti l'arancia acridina e il bromuro di etidio come descritto in precedenza ([Williams et al., 2015](#)). L'esame microscopico rivela che 2 mg / ml (concentrazione di 4,78 mM) di cellule esposte ad aloina erano colorate di verde al 50% e le cellule rimanenti di colore rosso. Nell'esperimento TER, 500 µM aloin hanno compromesso la funzione barriera. Pertanto, una maggiore concentrazione di aloina (cioè 2 mg / ml o 4,87 mM) avrà un maggiore effetto dannoso sulle cellule epiteliali e può causare citotossicità. In precedenza, è stato dimostrato che i linfociti T Jarkat esposti ad aloina hanno causato diverse anomalie tra cui alterazioni della morfologia cellulare, arresto del ciclo cellulare, perdita di integrità della membrana e citotossicità indotta dal meccanismo apoptotico ([Buenz, 2008](#)). Il presente studio ha anche dimostrato che l'aloina ha indotto la citotossicità nelle cellule epiteliali intestinali ha richiesto una concentrazione almeno due volte superiore rispetto all'effetto osservato nei linfociti T Jarkat. Il possibile meccanismo può coinvolgere le cellule epiteliali intestinali che secernono la mucina, che potrebbe fungere da strato protettivo e impedire l'interazione immediata con le cellule epiteliali. Al contrario, i linfociti T mancano di uno strato di muco, quindi l'aloina può interagire più rapidamente con le cellule T e richiedere una concentrazione di aloina inferiore per indurre la citotossicità.

Il bifidobatterio contribuisce a diverse funzioni benefiche a livello intestinale. Ad oggi, 48 specie

sono state riconosciute in questo genere. L'analisi della sequenza genomica rivela la presenza di geni in grado di codificare le proteine della macromolecola della superficie cellulare, che possono svolgere un ruolo nell'attaccamento batterico e nella colonizzazione nell'intestino ([Dethlefsen et al., 2008](#)). Il *bifidobatterio* incontra costantemente stress ossidativo ed esposizione a radicali liberi, vari enzimi intestinali e acidi biliari che possono avere un effetto dannoso sulla sopravvivenza batterica e sull'attaccamento della mucosa intestinale. Inoltre, il consumo di antibiotici e composti xenobiotici ha un impatto negativo sulla colonizzazione e sulla sopravvivenza del *bifidobatterio*. Il presente studio fornisce prove della proprietà antimicrobica dell'aloina ai batteri commensali coltivati in condizioni anaerobiche. Specificamente, puro *in vitro* in coltura *Bifidobacterium* mostrato una ridotta crescita batterica o CFU in maniera dose-dipendente. L'aloina può legarsi alla parete cellulare batterica e causare l'effetto battericida alterando l'integrità strutturale della membrana batterica; ciò potrebbe provocare uno stato di disbiosi. A causa di questa disbiosi, la mucosa intestinale potrebbe diventare più soggetta a lesioni mediate da aloina. Questo potrebbe probabilmente essere anche un motivo per lo sviluppo di lesioni intestinali e iperplasia delle cellule caliciformi nel colon ascendente in ratti esposti a estratti di foglie intere di aloe o composti di aloina purificati in precedenti studi sugli animali ([Boudreau et al., 2013, 2017](#)).

Negli studi sugli animali, la concentrazione di aloina disponibile per interagire con il microbiota intestinale è molto difficile da determinare, poiché l'esposizione orale avviene generalmente attraverso l'acqua potabile, dove il consumo di aloina e la disponibilità nell'intestino di interagire con il microbioma intestinale possono variare in ciascun animale. Inoltre, sono necessarie informazioni sul metabolismo SCFA per correlare il microbioma attivo e l'intestino sano. I modelli non animali utilizzati nel presente studio (interazione batteri-aloina specifica e modello di interazione liquame-aloina fecale) affrontano queste lacune di conoscenza. Inoltre, usando *in vitro* cellule epiteliali intestinali umane coltivate, abbiamo anche mostrato un effetto diretto di aloina sulla permeabilità intestinale. Questo studio dimostra chiaramente che a causa del trattamento con aloina (1 mg / ml e oltre) diverse specie batteriche mostrano una bassa abbondanza che è coinvolta nella produzione di butirrato. Inoltre, dimostriamo che la produzione di butirrato è stata ridotta a causa del trattamento con aloina. Pertanto, i dati di sequenziamento microbico dei 16s completano i dati biochimici (produzione di butirrato) durante il trattamento con aloin. Nel complesso, il nostro studio mostra che l'aloina può causare effetti tossici; tuttavia, dipende dalla concentrazione di aloin.

Conclusion

Il presente studio fornisce prove del fatto che l'aloina presenta proprietà antibatteriche nei confronti dei batteri commensali intestinali, a seconda delle condizioni di crescita e della concentrazione di aloina. Inoltre, l'esposizione all'aloina ha ridotto la produzione di butirrato diminuendo l'abbondanza di specie batteriche che producono butirrato. La quantificazione del butirrato con il metodo analitico HPLC ha confermato un calo del livello di esposizione all'aloina per 24 ore. I dati di sequenziamento supportano ulteriormente i dati microbiologici e biochimici osservati nel presente studio. I risultati della resistenza transepiteliale forniscono la prova che l'aloina disciolta a pH 4,9 ha compromesso la funzione di barriera intestinale in modo dose-dipendente.

References

Abeje, F., Bisrat, D., Hailu, A., and Asres, K. (2014). Phytochemistry and antileishmanial activity of the leaf latex of *Aloe calidophila* Reynolds. *Phytother. Res.* 28, 1801–1805. doi: 10.1002/ptr.5204

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Adams, RB, Planchon, SM, and Roche, JK (1993). IFN-gamma modulation of epithelial barrier

function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *J. Immunol.* 150, 2356–2363.

[PubMed Abstract](#) | [Google Scholar](#)

Adolph, TE, Grander, C., Moschen, AR, and Tilg, H. (2018). Liver-microbiome axis in health and disease. *Trends Immunol.* 39, 712–723. doi: 10.1016/j.it.2018.05.002

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Akinduti, PA, Ejilude, O., Deji-Agboola, AM, Oladejo, JM, Raheem-Ademola, RR, and Oluwadun, A. (2013). Susceptibility of multi-antibiotic resistant bacteria strains in Abeokuta, Nigeria to Aloe vera juice. *Am. J. Res. Commun.* 1, 56–64.

[Google Scholar](#)

Al-Momani, H., Perry, A., Stewart, CJ, Jones, R., Krishnan, A., Robertson, AG, et al. (2016). Microbiological profiles of sputum and gastric juice aspirates in cystic fibrosis patients. *Sci. Rep.* 6:26985. doi: 10.1038/srep26985

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Asamenew, G., Bisrat, D., Mazumder, A., and Asres, K. (2011). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of anthrone and chromone from the latex of Aloe harlana reynolds. *Phytother. Res.* 25, 1756–1760. doi: 10.1002/ptr.3482

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Bottenberg, MM, Wall, GC, Harvey, RL, and Habib, S. (2007). Oral aloe vera-induced hepatitis. *Ann. Pharmacother.* 41, 1740–1743. doi: 10.1345/aph.1K132

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Boudreau, MD, Mellick, PW, Olson, GR, Felton, RP, Thorn, BT, and Beland, FA (2013). Clear evidence of carcinogenic activity by a whole-leaf extract of Aloe barbadensis miller (aloe vera) in F344/N rats. *Toxicol. Sci.* 131, 26–39. doi: 10.1093/toxsci/kfs275

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Boudreau, MD, Olson, GR, Tryndyak, VP, Bryant, MS, Felton, RP, and Beland, FA (2017). From the cover: aloin, a component of the aloe vera plant leaf, induces pathological changes and modulates the composition of microbiota in the large intestines of f344/N male rats. *Toxicol. Sci.* 158, 302–318. doi: 10.1093/toxsci/kfx105

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Briggs, C. (1995). Herbal medicine: aloe. *CPJ* 128, 48–50.

[Google Scholar](#)

Bruewer, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Parkos, CA, Madara, JL, Hopkins, AM, et al. (2003). Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol.* 171, 6164–6172. doi: 10.4049/jimmunol.171.11.6164

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Budzisz, E., Nawrot, E., and Malecka, M. (2001). Synthesis, antimicrobial, and alkylating properties of 3-phosphonic derivatives of chromone. *Arch. Pharm.* 334, 381–387. doi: 10.1002/1521-4184(200112)334:12<381::AID-ARDP381>3.0.CO;2-0

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Buenz, EJ (2008). Aloin induces apoptosis in Jurkat cells. *Toxicol. Vitro* 22, 422–429. doi: 10.1016/j.tiv.2007.10.013

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Che, QM, Akao, T., Hattori, M., Tsuda, Y., Namba, T., and Kobashi, K. (1991). Barbaloin stimulates growth of *Eubacterium* sp. strain BAR, a barbaloin-metabolizing bacterium from human feces. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 757–760. doi: 10.1248/cpb.39.757

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Clemente, JC, Ursell, LK, Parfrey, LW, and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258–1270. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Cock, IE (2007). Antimicrobial activity of *Aloe barbadensis* Miller leaf gel components. *Internet J. Microbiol.* 4:2.

[Google Scholar](#)

Davie, JR (2003). Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J. Nutr.* 133(7 Suppl.), 2485S–2493S. doi: 10.1093/jn/133.7.2485S

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Derrien, M., Collado, MC, Ben-Amor, K., Salminen, S., and de Vos, WM (2008). The Mucin degrader *Akkermansia muciniphila* is an abundant resident of the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1646–1648. doi: 10.1128/AEM.01226-07

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, ML, and Relman, DA (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 6:e280. doi: 10.1371/journal.pbio.0060280

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Ding, WJ, Wu, XF, Zhong, JS, and Wan, JZ (2014). Effects of temperature, pH and light on the stability of aloin A and characterisation of its major degradation products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 1773–1779. doi: 10.1111/ijfs.12500

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Donato, RP, El-Merhibi, A., Gundsambuu, B., Mak, KY, Formosa, ER, Wang, X., et al. (2011). Studying permeability in a commonly used epithelial cell line: T84 intestinal epithelial cells. *Methods Mol. Biol.* 763, 115–137. doi: 10.1007/978-1-61779-191-8_8

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Donohoe, DR, Wali, A., Brylawski, BP, and Bultman, SJ (2012). Microbial regulation of glucose metabolism and cell-cycle progression in mammalian colonocytes. *PLoS One* 7:e46589. doi: 10.1371/journal.pone.0046589

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Eckburg, PB, Bik, EM, Bernstein, CN, Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638. doi: 10.1126/science.1110591

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Eeckhaut, V., Machiels, K., Perrier, C., Romero, C., Maes, S., Flahou, B., et al. (2013). *Butyricicoccus pullicaecorum* in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 1745–1752. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303611

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

FDA (2008). *Title 21 of the US Code of Federal Regulations (CFR), Section 172.510. Aloe. Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption. Subpart F. Flavoring*

Agents and Related Substances. Available at:

<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm>

Frank, DN, St Amand, AL, Feldman, RA, Boedeker, EC, Harpaz, N., and Pace, NR (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13780–13785. doi: 10.1073/pnas.0706625104

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Fujio-Vejar, S., Vasquez, Y., Morales, P., Magne, F., Vera-Wolf, P., Ugalde, JA, et al. (2017). The gut microbiota of healthy Chilean subjects reveals a high abundance of the phylum Verrucomicrobia. *Front. Microbiol.* 8:1221. doi: 10.3389/fmicb.2017.01221

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Furusawa, Y., Obata, Y., Fukuda, S., Endo, TA, Nakato, G., Takahashi, D., et al. (2013). Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504, 446–450. doi: 10.1038/nature12721

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Gokulan, K., Arnold, MG, Jensen, J., Vanlandingham, M., Twaddle, NC, Doerge, DR, et al. (2018). Exposure to arsenite in CD-1 mice during juvenile and adult stages: effects on intestinal microbiota and gut-associated immune status. *mBio* 9:e1418-18. doi: 10.1128/mBio.01418-18

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Gokulan, K., Cerniglia, CE, Thomas, C., Pineiro, SA, and Khare, S. (2017). Effects of residual levels of tetracycline on the barrier functions of human intestinal epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* 109, 253–263. doi: 10.1016/j.fct.2017.09.004

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Gokulan, K., Khare, S., Williams, K., and Foley, SL (2016). Transmissible plasmid containing *Salmonella enterica* heidelberg isolates modulate cytokine production during early stage of interaction with intestinal epithelial cells. *DNA Cell Biol.* 35, 443–453. doi: 10.1089/dna.2015.3142

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Gordon, JH, and Dubos, R. (1970). The anaerobic bacterial flora of the mouse cecum. *J. Exp. Med.* 132, 251–260. doi: 10.1084/jem.132.2.251

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Gordon, OG, Lambert, MA, and Wayne Moss, C. (1982). Analysis of short-chain acids from anaerobic bacteria by high-performance liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 16, 355–360.

[Google Scholar](#)

Groom, QJ, and Reynolds, T. (1987). Barbaloin in aloe species. *Planta Med.* 53, 348–348. doi: 10.1055/s-2006-962735

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Gutterman, Y., and Chauser-Volfson, E. (2000). The distribution of the phenolic metabolites barbaloin, aloeresin and aloenin as a peripheral defense strategy in the succulent leaf parts of *Aloe arborescens*. *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 825–838. doi: 10.1016/S0305-1978(99)00129-5

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Hamman, JH (2008). Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules* 13, 1599–1616. doi: 10.3390/molecules13081599

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Jung, JY, Ahn, Y., Khare, S., Gokulan, K., Pi~neiro, SA, and Cerniglia, CE (2018). An in vitro study to assess the impact of tetracycline on the human intestinal microbiome. *Anaerobe* 49, 85–94. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.12.011

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Kanat, O., Ozet, A., and Ataergin, S. (2006). Aloe vera-induced acute toxic hepatitis in a healthy young man. *Eur. J. Intern. Med.* 17:589. doi: 10.1016/j.ejim.2006.04.017

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Kelly, CJ, Zheng, L., Campbell, EL, Saeedi, B., Scholz, CC, Bayless, AJ, et al. (2015). Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial hif augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe* 17, 662–671. doi: 10.1016/j.chom.2015.03.005

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Khare, S., Ficht, TA, Santos, RL, Romano, J., Ficht, AR, Zhang, S., et al. (2004). Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1075–1081. doi: 10.1128/JCM.42.3.1075-1081.2004

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Khare, S., Lawhon, SD, Drake, KL, Nunes, JE, Figueiredo, JF, Rossetti, CA, et al. (2012). Systems biology analysis of gene expression during in vivo *Mycobacterium avium* paratuberculosis enteric colonization reveals role for immune tolerance. *PLoS One* 7:e42127. doi: 10.1371/journal.pone.0042127

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Kim, BS, Kim, JN, and Cerniglia, CE (2011). In vitro culture conditions for maintaining a complex population of human gastrointestinal tract microbiota. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011:838040. doi: 10.1155/2011/838040

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Kumari, R., Ahuja, V., and Paul, J. (2013). Fluctuations in butyrate-producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India. *World J. Gastroenterol.* 19, 3404–3414. doi: 10.3748/wjg.v19.i22.3404

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Lans, CA (2006). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2:45. doi: 10.1186/1746-4269-2-45

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Lee, J., Lee, MS, and Nam, KW (2014). Acute toxic hepatitis caused by an aloe vera preparation in a young patient: a case report with a literature review. *Korean J. Gastroenterol.* 64, 54–58. doi: 10.4166/kjg.2014.64.1.54

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Ley, RE, Peterson, DA, and Gordon, JI (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124, 837–848. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Li, D., Chen, H., Mao, B., Yang, Q., Zhao, J., and Gu, Z. (2017). Microbial biogeography and core microbiota of the rat digestive tract. *Sci. Rep.* 8:45840. doi: 10.1038/srep45840

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Li, L., Song, X., Yin, Z., Jia, R., Li, Z., Zhou, X., et al. (2016). The antibacterial activity and action

mechanism of emodin from *Polygonum cuspidatum* against *Haemophilus parasuis* in vitro. *Microbiol. Res.* 186–187, 139–145. doi: 10.1016/j.micres.2016.03.008

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Lobbens, ES, Fodera, V., Nyberg, NT, Andersen, K., Jager, AK, Jorgensen, L., et al. (2016). The inhibitory effect of natural products on protein fibrillation may be caused by degradation products—a study using aloin and insulin. *PLoS One* 11:e0149148. doi: 10.1371/journal.pone.0149148

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Louis, P., and Flint, HJ (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 294, 1–8. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Mariappan, V., and Shanthi, G. (2012). Antimicrobial and phytochemical analysis of Aloe vera. *L. Int. Res. J. Pharm.* 3, 158–161.

[Google Scholar](#)

Megeressa, M., Bisrat, D., Mazumder, A., and Asres, K. (2015). Structural elucidation of some antimicrobial constituents from the leaf latex of Aloe trigonantha LC Leach. *BMC Complement. Altern. Med.* 15:270. doi: 10.1186/s12906-015-0803-4

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Moore, Z., and Cowman, S. (2008). A systematic review of wound cleansing for pressure ulcers. *J. Clin. Nurs.* 17, 1963–1972. doi: 10.1111/j.1365-2702.2008.02381.x

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Morton, JF (1961). Folk uses and commercial exploitation of aloe leaf pulp. *Paper Presented at the 2nd Annual Meeting of the Society for Economic Botany*, Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology, 311–319. doi: 10.1007/BF02907852

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Odenwald, MA, and Turner, JR (2013). Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 1075–1083. doi: 10.1016/j.cgh.2013.07.001

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Oumer, A., Bisrat, D., Mazumder, A., and Asres, K. (2014). A new antimicrobial anthrone from the leaf latex of *Aloe trichosantha*. *Nat. Prod. Commun.* 9, 949–952.

[PubMed Abstract](#) | [Google Scholar](#)

Park, JH, and Kwon, SW (2006). “An epitope of chemical composition and low molecular compounds,” in *New Prospectives on Aloe*, eds YI Park and SK Lee (New York, NY: Springer), 19–34.

[Google Scholar](#)

Park, MY, Kwon, HJ, and Sung, MK (2009). Intestinal absorption of aloin, aloe-emodin, and aloesin; a comparative study using two in vitro absorption models. *Nutr. Res. Pract.* 3, 9–14. doi: 10.4162/nrp.2009.3.1.9

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Pogribna, M., Freeman, JP, Paine, D., and Boudreau, MD (2008). Effect of Aloe vera whole leaf extract on short chain fatty acids production by *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium infantis* and *Eubacterium limosum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 575–580. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02346.x

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, KS, Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65. doi: 10.1038/nature08821

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Rabbi, MF, Munyaka, PM, Eissa, N., Metz-Boutigue, MH, Khafipour, E., and Ghia, JE (2016). Human catestatin alters gut microbiota composition in mice. *Front. Microbiol.* 7:2151. doi: 10.3389/fmicb.2016.02151

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Rabe, C., Musch, A., Schirmacher, P., Kruis, W., and Hoffmann, R. (2005). Acute hepatitis induced by an Aloe vera preparation: a case report. *World J. Gastroenterol.* 11, 303–304. doi: 10.3748/wjg.v11.i2.303

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Ribble, D., Goldstein, NB, Norris, DA, and Shellman, YG (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol.* 5:12. doi: 10.1186/1472-6750-5-12

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Rivera-Chavez, F., Zhang, LF, Faber, F., Lopez, CA, Byndloss, MX, Olsan, EE, et al. (2016). Depletion of butyrate-producing Clostridia from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of *Salmonella*. *Cell Host Microbe* 19, 443–454. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.004

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Schloss, PD, Hay, AG, Wilson, DB, Gossett, JM, and Walker, LP (2005). Quantifying bacterial population dynamics in compost using 16S rRNA gene probes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 457–463. doi: 10.1007/s00253-004-1727-y

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Sehgal, I., Winters, WD, Scott, M., David, A., Gillis, G., Stoufflet, T., et al. (2013). Toxicologic assessment of a commercial decolorized whole leaf aloe vera juice, lily of the desert filtered whole leaf juice with aloesorb. *J. Toxicol.* 2013:802453. doi: 10.1155/2013/802453

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., et al. (2014). Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40, 128–139. doi: 10.1016/j.immuni.2013.12.007

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Sokol, H., Seksik, P., Furet, JP, Firmesse, O., Nion-Larmurier, I., Beaugerie, L., et al. (2009). Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm. Bowel Dis.* 15, 1183–1189. doi: 10.1002/ibd.20903

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#)

Thiruppathi, S., Ramasubramanian, V., Sivakumar, T., and Arasu, TV (2010). Antimicrobial activity of Aloe vera (L.) Burm. f. against pathogenic microorganisms. *J. Biosci. Res* 1, 251–258.

[Google Scholar](#)

Ubbink-Kok, T., Anderson, JA, and Konings, WN (1986). Inhibition of electron transfer and uncoupling effects by emodin and emodin anthrone in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 147–151. doi: 10.1128/AAC.30.1.147

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Vital, M., Howe, AC, and Tiedje, JM (2014). Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. *mBio* 5:e00889. doi: 10.1128/mBio.00889-14

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Williams, K., Gokulan, K., Shelman, D., Akiyama, T., Khan, A., and Khare, S. (2015). Cytotoxic mechanism of cytolethal distending toxin in nontyphoidal *Salmonella serovar (Salmonella Javiana)* during macrophage infection. *DNA Cell Biol.* 34, 113–124. doi: 10.1089/dna.2014.2602

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Williams, KM, Gokulan, K., Cerniglia, CE, and Khare, S. (2016). Size and dose dependent effects of silver nanoparticle exposure on intestinal permeability in an in vitro model of the human gut epithelium. *J. Nanobiotechnol.* 14:62. doi: 10.1186/s12951-016-0214-9

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Wolf, DA, Schwarz, RP, and Anderson, CD (1988). *Development of a Cell Culture Bioreactor for Microgravity. JSC Research and Technology Annual Report 1987.* NASA Technical Memorandum 100 463. Washington, DC: NASA,

[Google Scholar](#)

Wong, JM, de Souza, R., Kendall, CW, Emam, A., and Jenkins, DJ (2006). Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* 40, 235–243. doi: 10.1097/00004836-200603000-00015

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Xia, Q., Yin, JJ, Fu, PP, and Boudreau, MD (2007). Photo-irradiation of Aloe vera by UVA–formation of free radicals, singlet oxygen, superoxide, and induction of lipid peroxidation. *Toxicol. Lett.* 168, 165–175. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.11.015

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Yang, HN, Kim, DJ, Kim, YM, Kim, BH, Sohn, KM, Choi, MJ, et al. (2010). Aloe-induced toxic hepatitis. *J. Korean Med. Sci.* 25, 492–495. doi: 10.3346/jkms.2010.25.3.492

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Youakim, A., and Ahdieh, M. (1999). Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am. J. Physiol.* 276(5 Pt 1), G1279–G1288. doi: 10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1279

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

Zheng, L., Kelly, CJ, Battista, KD, Schaefer, R., Lanis, JM, Alexeev, EE, et al. (2017). Microbial-derived butyrate promotes epithelial barrier function through IL-10 receptor-dependent repression of Claudin-2. *J. Immunol.* 199, 2976–2984. doi: 10.4049/jimmunol.1700105

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

<https://www.veraaloegel.com/>

Ricerca tratta da:

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00474/full>

Nota: Questa ricerca si riferisce ad Aloe contenente Aloina (Succo da Foglia intera o preparati senza eliminazione di Aloina) e NON al Gel Puro privato dell'Aloina e quindi sicuro e benefico per l'organismo.

Puoi consumare tranquillamente il Gel di Aloe senza Aloina.