

Effetto antiproliferativo di estratti polifenolici da *Castanea sativa* su linee cellulari tumorali mediato dall'attivazione di un processo autofagico

Stefania Moccia¹, Carmen Cervellera¹, Carmela Spagnuolo¹, Giovanni Cascone¹, Maria Grazia Volpe¹, Gian Luigi Russo¹

¹ISA-CNR: Istituto di Scienze dell'Alimentazione

VIII Convegno Nazionale del Castagno,
Portici 14 -16 2022.

SCOPO: Il recupero di sottoprodotti dell'industria castanicola (*Castanea sativa* Mill.) ricchi in composti bioattivi rappresenta un'interessante strategia di economia circolare. Nel presente studio è stato valutato l'effetto antiproliferativo di un estratto commerciale arricchito in polifenoli ottenuto dalla corteccia di castagno (CBp) sulle linee cellulari derivate da adenocarcinoma del colon umano (HT-29) e da leucemia promielocitica acuta (HL-60).

MATERIALI E METODI: I principali composti bioattivi di CBp sono stati identificati mediante analisi HPLC. L'effetto antiproliferativo è stato valutato mediante il saggio di vitalità cellulare CyQuant e conta cellulare con Trypan Blue. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante citofluorimetria a flusso. L'attivazione del processo autofagico è stata valutata mediante il saggio CytolD e immunoblotting.

RISULTATI: La preliminare caratterizzazione chimica eseguita mediante HPLC ha permesso di determinare il profilo polifenolico di CBp, evidenziando la presenza di un picco maggioritario corrispondente all'acido ellagico (**Figura 1**). Il saggio di vitalità cellulare CyQuant ha mostrato una riduzione significativa del numero di cellule HT-29 (**Figura 2 A, C**) e HL-60 (**Figura 2 B, D**) indotta da CBp in maniera dose-dipendente (50, 100 e 150 $\mu\text{g/ml}$ e 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$, p/v, rispettivamente).

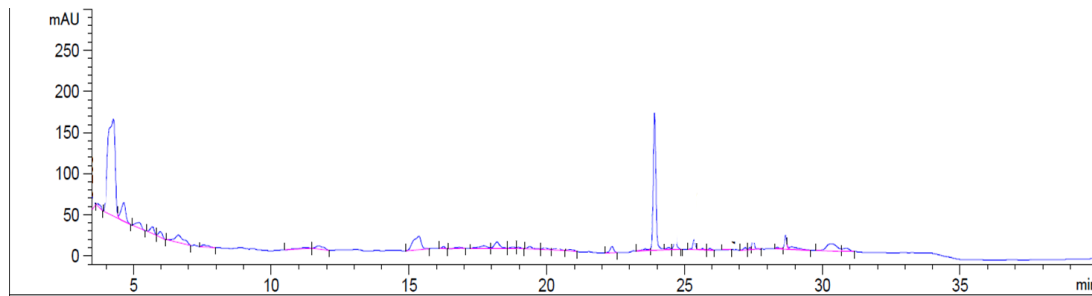


Figura 1. Cromatogramma HPLC di CBp.

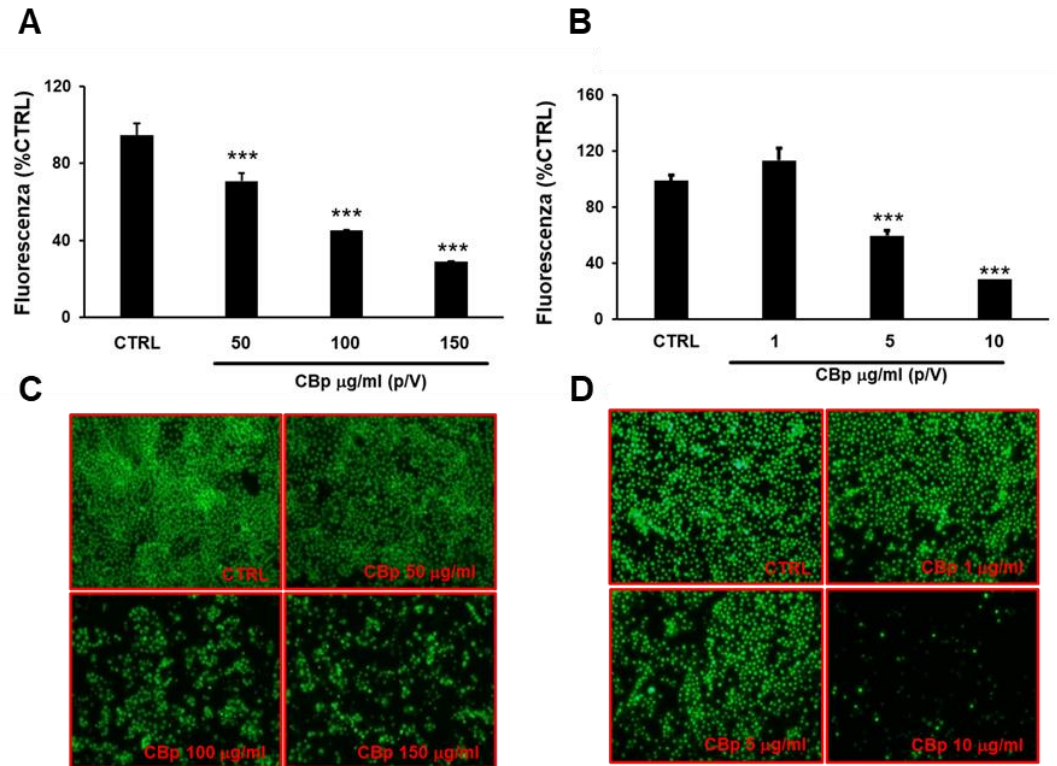


Figura 2. Saggio di vitalità cellulare CyQuant su cellule HT-29 (**A**) e HL-60 (**B**) trattate con concentrazioni crescenti di CBp. I risultati sono espressi in % di fluorescenza rispetto al controllo trattato con il solo solvente DMSO. La significatività è stata determinata tramite il test-t di Student e indicata con *** ($p < 0.001$) vs CTRL (DMSO). Morfologia delle cellule HT-29 (**C**) e HL-60 (**D**) trattate con CBp alle concentrazioni indicate. Le immagini in fluorescenza sono state acquisite al microscopio Axiovert Zeiss (ingrandimento 200X).

La curva di crescita delle cellule HT-29 ha evidenziato un significativo arresto della proliferazione cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione con CBp alla concentrazione di 100 µg/ml (**Figura 3**).

Dall'analisi citofluorimetrica è emerso un aumento della popolazione di cellule in fase G2/M di circa il 50% indotto da CBp (100 µg/ml) dopo 72 ore di trattamento (**Figura 4**).

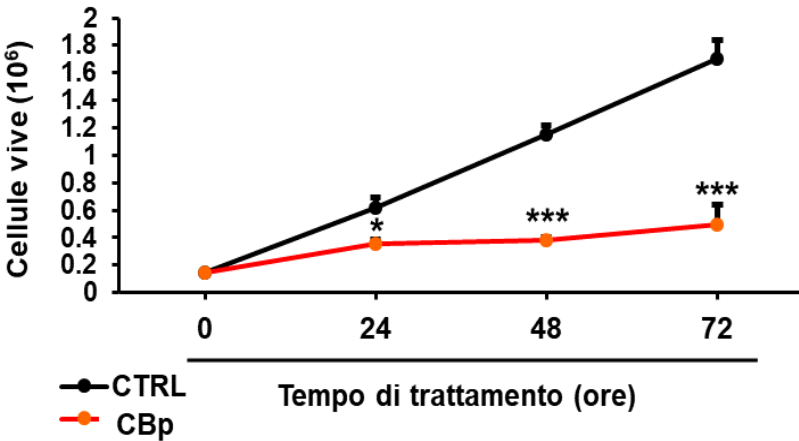


Figura 3. Curva di crescita delle cellule HT-29 trattate con CBp (100 µg/ml). La significatività è stata determinata tramite il test-t di Student e indicata con *** ($p < 0.001$), * ($p < 0.05$) vs DMSO (CTRL).

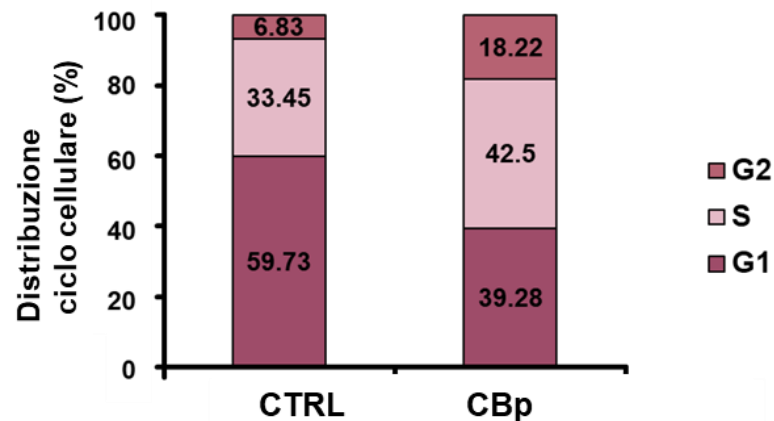


Figura 4. Distribuzione (%) delle cellule HT-29 nelle diverse fasi del ciclo cellulare. L'analisi del ciclo cellulare è stata effettuata mediante FACS.

Questo effetto è stato associato all'attivazione di una forma di autofagia citostatica, confermata sia dal saggio CytID per la quantificazione degli autofagosomi (**Figura 5, A**) sia dall'aumentata espressione della forma lipidata e attiva di LC3-II (**Figura 5, B**).

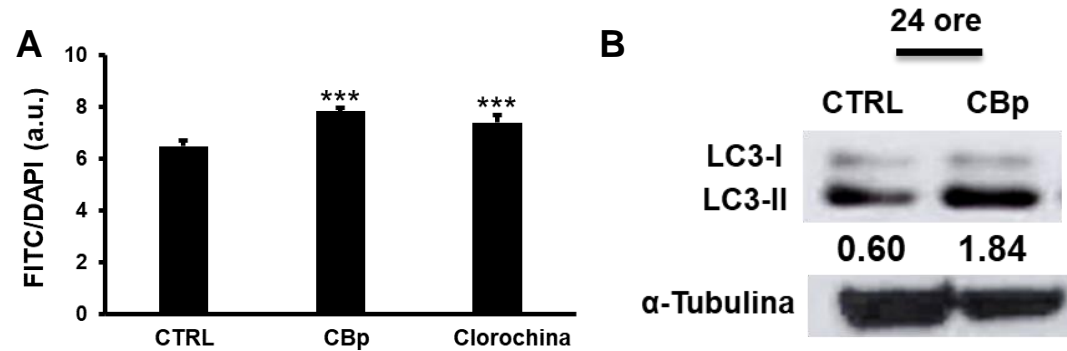


Figura 5. Quantificazione degli autofagosomi (**A**) nelle cellule HT-29 dopo 24 ore di incubazione con CBp (100 µg/ml) e clorochina (20 µM) utilizzata come controllo positivo. La significatività è stata determinata tramite il test-t di Student e indicata con *** ($p < 0.001$) vs DMSO (CTRL). Analisi Western blot dell'espressione del marcatore di autofagia LC3-II (**B**) nelle cellule HT-29 dopo 24 e 72 ore di incubazione con CBp (100 µg/ml). L'analisi densitometrica è espressa come rapporto delle intensità della banda di LC3-II e quella di α -tubulina.

Questi risultati evidenziano che l'estratto polifenolico commerciale e standardizzato ottenuto dalla corteccia di castagno (CBp) esercita un effetto antiproliferativo su due diverse linee cellulari tumorali. In particolare, sulle cellule HT-29 il blocco della crescita è indotto dall'attivazione del processo di autofagia. Studi futuri permetteranno di definire i bersagli molecolari coinvolti nel meccanismo di azione di CBp.