



**Università
degli Studi
di Palermo**

AREA QUALITÀ, PROGRAMMAZIONE E SUPPORTO STRATEGICO
SETTORE STRATEGIA PER LA RICERCA
U. O. DOTTORATI

Dottorato in Scienze Molecolari e Biomolecolari
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche
SSD BIO/10

Valutazione del potenziale anticancro del frutto di *Mangifera indica* proveniente dalle aree rurali siciliane

IL DOTTORE
Valentina Lo Galbo

IL COORDINATORE
Prof. Patrizia Diana

IL TUTOR
Prof. Antonella D'Anneo

IL CO TUTOR
Prof. Michela Giuliano

CICLO XXXIV
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO: 2022

INDICE

<i>Introduzione</i>	- 2 -
1. La Nutraceutica e i composti fitochimici	- 3 -
2. Il Mango: descrizione e proprietà biologiche	- 5 -
2.1 Il frutto del Mango	- 5 -
2.2 Fitochimici in <i>Mangifera indica</i>	- 7 -
2.3 Effetti antitumorali di <i>Mangifera indica</i>	- 8 -
3. Il carcinoma colon rettale: trattamenti e prevenzione	- 10 -
4. I processi di morte cellulare nella ricerca anticancro	- 14 -
4.1 L'apoptosi	- 14 -
4.2 L'autofagia	- 16 -
5. Mitocondrio e stress ossidativo nell'apoptosi	- 19 -
<i>Obiettivi della tesi</i>	- 21 -
<i>Materiali e Metodi</i>	- 23 -
1. Colture cellulari e condizioni di coltura	- 24 -
2. Preparazione dell'estratto di esocarpo di <i>Mangifera indica</i>	- 25 -
3. Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT e saggio LDH	- 25 -
4. Saggio clonogenico	- 26 -
5. Valutazione dell'apoptosi	- 27 -
5.1 Analisi del danno al DNA mediante colorazione con Hoechst 33342 e analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare	- 27 -
5.2 Saggio dell'arancio di acridina ed etidio bromuro	- 28 -
5.3 Saggio dell'Annessina V / Propidio Ioduro	- 28 -
5.4 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale	- 29 -
6. Valutazione della produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno	- 30 -
7. Valutazione della produzione dell'anione superossido mitocondriale	- 30 -
8. Preparazione della frazione citosolica e mitocondriale	- 31 -
9. Estrazione delle proteine e analisi Western Blotting	- 32 -
10. Misurazione dei gruppi tiolici intracellulari	- 33 -
11. HPLC-ESI-QTOF-MS	- 34 -
12. Valutazione dei vacuoli autofagici mediante colorazione con monodansilcadaverina (MDC)	- 35 -
13. Analisi statistica	- 35 -

<i>Risultati</i>	- 36 -
EFFETTI DELL'ESTRATTO DI ESOCARPO DI <i>Mangifera indica</i> (MPE) SU CELLULE DI CARCINOMA DEL COLON	- 37 -
1. <i>L'estratto di esocarpo di mango (MPE) provoca effetti citotossici e cambiamenti morfologici in cellule di carcinoma del colon.</i>	- 37 -
2. <i>Il trattamento con estratto di esocarpo di mango (MPE) inibisce la capacità clonogenica delle cellule di carcinoma del colon</i>	- 38 -
3. <i>Valutazione dello stress ossidativo nelle cellule trattate con MPE</i>	- 40 -
4. <i>Il trattamento con MPE provoca diminuzione del contenuto di gruppi tiolici, incremento dei livelli di MnSOD e produzione dell'anione superossido a livello mitocondriale.</i>	- 44 -
5. <i>L'MPE provoca dissipazione del potenziale di membrana nelle cellule di carcinoma del colon</i>	- 46 -
6. <i>Il trattamento con MPE influenza i livelli di alcuni membri della famiglia antiapoptotica Bcl-2</i>	- 48 -
7. <i>Il danno mitocondriale mediato dall'MPE provoca il rilascio di proteine mitocondriali apoptogeniche: citocromo C e AIF</i>	- 49 -
8. <i>L'MPE provoca frammentazione del DNA e morte cellulare per apoptosi in cellule di carcinoma del colon</i>	- 51 -
9. <i>La frammentazione del DNA e la morte cellulare per apoptosi indotta dall'MPE è correlata al danno genotossico mediato da γH2AX</i>	- 53 -
10. <i>L'analisi HPLC-ESI-QTOF-MS rivela la composizione dell'estratto di esocarpo di Mango (MPE)</i>	- 55 -
11. <i>Analisi degli effetti citotossici esercitati dai fitochimici contenuti nell'MPE</i> ...	- 58 -
EFFETTI DEL FITOCHIMICO METILGALLATO (MG) SU CELLULE DI CARCINOMA DEL COLON HCT116.....	- 60 -
1. <i>Effetto citotossico del Metilgallato (MG) su cellule di carcinoma del colon HCT116.</i>	- 60 -
2. <i>Il trattamento con MG attiva il processo autofagico e induce stress cellulare</i> ...	- 63 -
3. <i>Il trattamento con MG induce danno al DNA e morte per apoptosi</i>	- 66 -
<i>Discussione</i>	- 69 -
<i>Bibliografia</i>	- 77 -

Introduzione

1. La Nutraceutica e i composti fitochimici

Il termine “nutraceutica” è un neologismo che nasce dalla crasi delle parole nutrizione e farmaceutica coniato alla fine degli anni Ottanta dal ricercatore americano Stephen De Felice [1]. Tale disciplina studia le componenti degli alimenti che possiedono proprietà salutistiche per l'uomo, in termini di prevenzione e trattamento delle malattie. Gli alimenti nutraceutici, comunemente definiti "funzionali", sono alimenti o parti di essi, normalmente consumati con la dieta e caratterizzati, oltre che dal loro valore nutrizionale, da proprietà benefiche, poiché sono in grado di ridurre il rischio di malattie e di migliorare lo stato di salute e benessere [2]. Una dieta varia ed equilibrata che comprende il consumo di nutraceutici, non solo aumenta l'aspettativa di vita, ma può anche prevenire le malattie croniche, contrastare l'invecchiamento e rafforzare le difese immunitarie. Mentre il termine "alimento funzionale" si riferisce alle proprietà salutistiche dell'intero alimento, la parola "nutraceutico" è correlata soltanto agli effetti di un singolo composto. L'esempio più comune di alimenti funzionali è quello della frutta e dei vegetali. Questi alimenti sono infatti ricchi di composti fitochimici: sostanze non nutrienti dotate di diverse proprietà biologiche che apportano benefici alla salute [3-5]. L'aspetto principale per cui si distinguono è la loro azione antiossidante. Lo stress ossidativo è infatti protagonista non solo nella patogenesi dei tumori, ma anche di molte altre condizioni patologiche come: disturbi cardiovascolari, disfunzioni metaboliche, infiammazioni ecc. [6]. In base alla loro composizione chimica, i fitochimici sono stati classificati in alcaloidi, fitosteroli, composti polifenolici, carotenoidi, terpenoidi e composti organosolfuri (Figura 1). Tra questi, i composti polifenolici sono quelli ad oggi più studiati [7]. I polifenoli sono prodotti del metabolismo secondario delle piante. La loro funzione è quella di proteggere la pianta dagli attacchi patogeni dei parassiti e inoltre contribuiscono a conferire il colore alle piante. Chimicamente sono caratterizzati dalla presenza di uno o più anelli aromatici e possiedono inoltre uno o più sostituenti ossidrilici a seconda del tipo di composto. Grazie alla presenza di questi sostituenti, possono svolgere direttamente attività antiossidante rimuovendo i radicali liberi. I polifenoli possono essere raggruppati in diverse classi: acidi fenolici semplici (es. acido ferulico, acido caffeico, acido gallico, acido ellagico); flavonoidi (es. quercetina, catechina, genisteina); stilbeni (es. resveratrolo); cumarine (es. scopoletina, umbelliferone); ed i tannini [8,9].

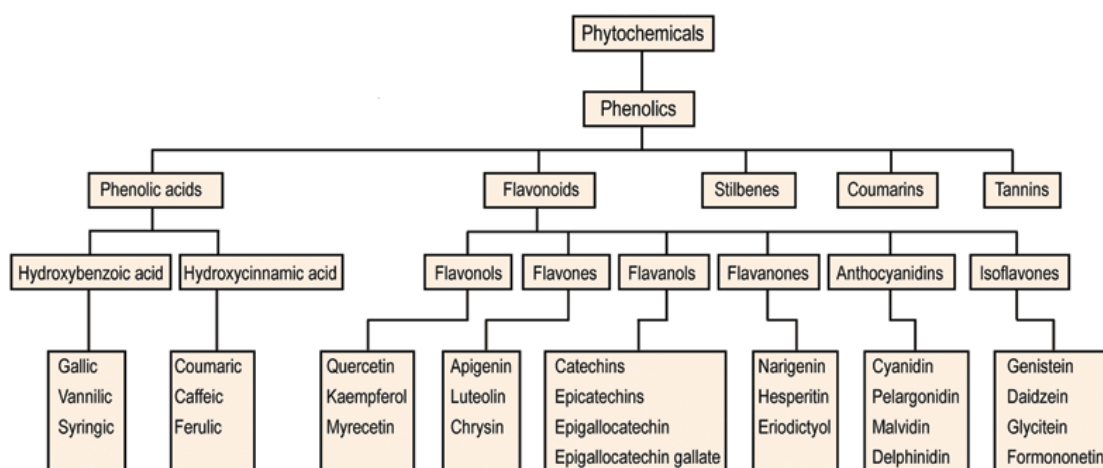


Figura 1. Classificazione generale dei fitochimici.

Diversi sono gli studi in letteratura che esaminano gli effetti antitumorali e chemiopreventivi di polifenoli come, ad esempio, il resveratrolo presente nel vino rosso, [10-12], la caffeina [13], le catechine contenute nel tè [14,15], o la genisteina presente nella soia [16].

Da tempo è noto che la dieta associata ad un corretto stile di vita aiuta nella prevenzione di numerose patologie inclusi i tumori, oltre a favorire uno stato di benessere generale [17]. Non a caso, l'incidenza di alcune malattie è variabile e dipende dalle abitudini alimentari di ogni paese. Nei territori in cui l'alimentazione è strettamente legata ai prodotti della terra e ricca di frutta e vegetali, si ha una migliore condizione di salute rispetto ai paesi occidentali dove si riscontra invece una maggiore incidenza di tumori del colon retto, della prostata, ecc. [18,19].

Vista l'importanza degli alimenti funzionali per la salute, molte ricerche sono ad oggi concentrate sull'identificazione delle componenti biologicamente attive degli alimenti derivati da piante, frutti o fitocomposti, al fine di comprendere il loro meccanismo d'azione a livello cellulare e poterli rendere utili per lo sviluppo di farmaci. In particolare, si hanno grandi aspettative per il loro potenziale antitumorale con l'obiettivo di sviluppare nuovi approcci terapeutici di supporto nelle terapie contro il cancro [20-22]. I composti, derivando da fonti naturali, risulterebbero infatti meno tossici per le cellule normali rispetto alle molecole comunemente impiegate in chemioterapia come il cisplatino e la doxorubicina di cui si conosce l'alta tossicità sulle cellule normali [23].

2. Il Mango: descrizione e proprietà biologiche

Nell'ambito degli studi sui fitocomposti, si inserisce il mango (*Mangifera indica* L.), una specie appartenente alla famiglia delle Anacardiaceae coltivata in India e nel Sud est Asiatico da più di 4000 anni, considerato uno dei più popolari tra i frutti tropicali [24-27]. Al giorno d'oggi le coltivazioni di mango si sono diffuse in tutto il mondo, sia in ambienti tropicali che subtropicali, trovando aree adatte per l'innesto anche nelle regioni Mediterranee, e colonizzando la Sicilia più di 20 anni fa, con le prime cultivar Kensington Pride introdotte a Catania intorno al 1980 [28,29]. Vent'anni dopo, intorno al 2000, in tutte le aree costiere della Sicilia diverse cultivar di mango si sono insediate nell'isola tra cui Tommy Atkins, Osteen, Maya, Kent, Irwin, Glenn e Keitt distribuite soprattutto in provincia di Palermo, Messina e Catania. L'innesto di queste nuove coltivazioni è stata un'ottima occasione per offrire nuove opportunità ai coltivatori, rinnovando i campi abbandonati al fine di permettere la diffusione di un frutto esotico il cui interesse con il passare degli anni è cresciuto notevolmente. Il vantaggio della diffusione delle cultivar a livello locale è che il consumatore ha la possibilità di reperire il frutto coltivato localmente che matura sull'albero e che viene raccolto al giusto grado di maturazione, consumandolo entro un breve periodo di tempo dalla raccolta. Il frutto possiede in tal modo le migliori caratteristiche organolettiche e sensoriali, oltre ad una maggiore quantità di composti bioattivi e di fitochimici che gli conferiscono le elevate proprietà nutraceutiche. In letteratura sono presenti alcuni studi che mettono in evidenza le proprietà dei frutti di mango cresciuti nel clima mediterraneo, sottolineando come le caratteristiche in termini chimici, nutraceutici e sensoriali variano a seconda della cultivar, del luogo in cui sono coltivate e soprattutto dal periodo di raccolta [30-32].

2.1 Il frutto del Mango

Nel frutto del mango distinguiamo tre componenti: una porzione più esterna rappresentata dalla buccia o esocarpo, che varia colore durante la maturazione da verde a giallo o rosso-arancione; una parte intermedia (polpa o mesocarpo) che rappresenta la porzione edibile di colore giallo-arancione, che diventa più morbida quando il frutto matura; ed una porzione più interna aderente alla polpa chiamata endocarpo, che racchiude al suo interno un seme appiattito di forma ovale e allungata (Figura 2) [33]. Grazie al suo sapore succulento ed esotico, è chiamato anche "il re dei frutti" ed è largamente consumato nei diversi stadi di maturazione, sebbene presenti delle caratteristiche organolettiche superiori quando è

maturo. Il frutto viene inoltre processato industrialmente, sia esso acerbo o maturo, ed utilizzato per la produzione di succhi, salse, marmellate, olii, panna ed anche cereali e caramelle [34].

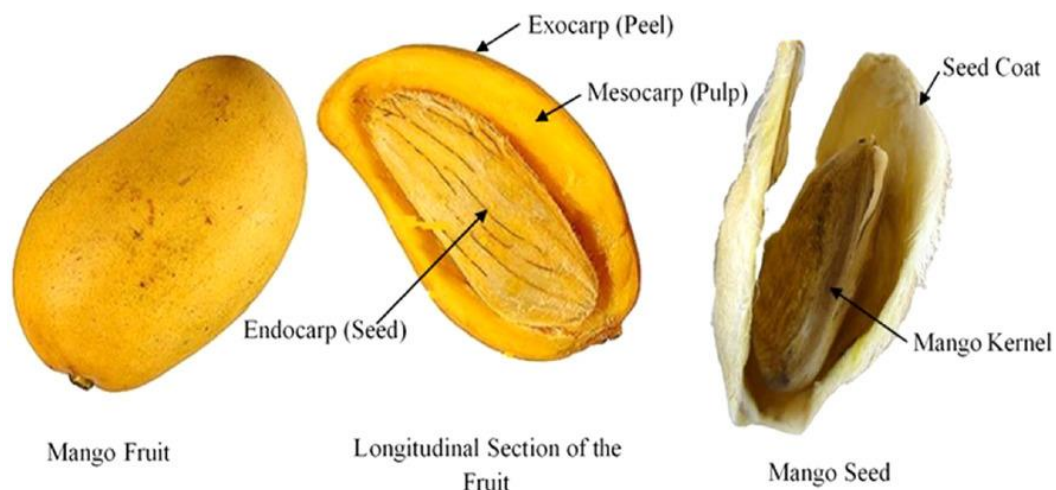


Figura 2. Composizione del frutto di mango.

Nel tempo, l'interesse per questo frutto da parte dei consumatori è cresciuto sempre di più, essendo considerato un alimento ricco di fitochimici e dalle elevate proprietà nutraceutiche. È stato per questo classificato tra i 10 frutti che posseggono maggiore azione antiossidante e antiradicalica [35]. Il frutto è un'importante fonte di macronutrienti ovvero carboidrati, lipidi, acidi grassi, proteine, aminoacidi, fibre e acidi organici (Tabella I). Esso contiene anche micronutrienti come vitamine e minerali, oltre a composti fenolici di cui flavonoidi, xantoni e acidi fenolici sono i più abbondanti. Il valore energetico per 100 grammi di polpa oscilla tra le 60 e le 190 kCal, e ciò lo rende un ottimo frutto dal punto di vista nutrizionale da inserire nella dieta. Le componenti nutritive ed il contenuto d'acqua dipendono sia dalla cultivar che dal periodo di raccolta. Per esempio, secondo l'USDA (Dipartimento di Agricoltura degli Stati Uniti) la polpa dei frutti delle varietà Haden, Kent, Keitt, e Tommy Atkins presentano 83.4 g di acqua per 100 g di frutto fresco, mentre la cultivar Colombiana Azúcar ne contiene 79.3 g [36].

<i>Mangifera indica</i> L.	
Nutrition value per 100 g	
Energy	70 kCal
Fruit composition	Quantity
Carbohydrates	14.96 g
Proteins	0.82 g
Fats	0.38 g
Fibers	1.6 g
Vitamins	
Vitamin C	36.4 mg
Vitamin E	1.12 mg
Vitamin A	1082 IU
Niacin (vit B3)	669 µg
Pantothenic acid (vit B5)	160 µg
Pyridoxine (vit B6)	119 µg
Riboflavin (vit B2)	38 µg
Thiamin (vit B1)	28 µg
Folates	43 µg
Vitamin K	4.2 µg
Minerals	
Potassium	168 mg
Phosphorus	14 mg
Calcium	11 mg
Magnesium	10 mg
Sodium	1 mg
Copper	110 µg
Iron	160 µg
Manganese	27 µg
Zinc	90 µg
Carotenoids	
Carotene-β	445 µg
Carotene-α	17 µg

Tabella I. Macronutrienti e micronutrienti di *M. indica* [28].

2.2 Fitochimici in *Mangifera indica*

Ogni porzione della pianta (foglie, fiori, radici, corteccia) e del frutto di *M. indica* possiede un'ampia varietà di fitochimici. Tra questi, i polifenoli (flavonoidi, xantonici e acidi fenolici) sono i più abbondanti [37], anche se le loro quantità dipendono sia dalla porzione della pianta o del frutto che dal tipo di cultivar [38]. Mangiferina, acido gallico, catechine, quercetina, keampferolo, acido protocatechico, acido ellagico, propil e metil gallato, ramnetina e antocianina sono tra i principali componenti polifenolici, ampiamente studiati per le loro proprietà biologiche [39], e tra queste, la capacità antiossidante è quella più

rilevante. La mangiferina è uno dei composti polifenolici più abbondante, variamente distribuita nelle diverse parti della pianta e del frutto e presente in quantità maggiore in foglie, corteccia e radici rispetto ai frutti [40]. Nelle diverse porzioni del frutto è invece maggiormente rappresentata nell'esocarpo dove la sua quantità è di circa 4,94 g/Kg di peso secco. Chimicamente è un glucosilxantone con 4 gruppi idrossilici, considerati determinanti per la sua azione anti-radicalica e antiossidante, nonché per la sua attività biologica.

Un'altra classe di composti naturali che si ritrova nel frutto di *M. indica* sono i carotenoidi, pigmenti organici naturali responsabili della colorazione dell'esocarpo e del mesocarpo. Biologicamente sono degli ottimi detossificanti liberando dall'eccesso di radicali liberi [41,42]. La concentrazione di carotenoidi nel frutto di *M. indica* è maggiore man mano che i frutti vanno incontro a maturazione [43]. Il più abbondante carotenoide, presente principalmente nel mesocarpo e nell'esocarpo del frutto è il β -carotene, insieme a luteoxanthina, violaxanthina, neoxanthina, zeaxanthina e cryptoxanthina [44]. Vi sono poi i terpenoidi, quali ocimene, carene, terpinene, mircene, composti volatili che conferiscono il tipico aroma al frutto [45]. Il lupeolo è un triperpenoide comunemente presente nel mango con proprietà antiinfiammatorie oltre a quelle antiossidanti [46,47]. I gallotannini (tannini idrolizzabili) sono un'altra classe di composti chimici presenti nella corteccia, nelle foglie, nell'endocarpo e nella polpa del frutto [48]. È stata anche osservata la presenza di tocoferoli [49].

Tutti questi fitochimici presenti in diverse porzioni della pianta e del frutto sono i responsabili degli effetti terapeutici del mango che sono associati alle proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie, immunomodulatorie, antimicrobiche, antibatteriche, antivirali, antifungine, antispasmodiche, antidiabetiche, antiadipogeniche, gastroprotettive ed epatoprotettive [50,51]. Sono ben note anche le proprietà antitumorali delle diverse porzioni della pianta, approfondite nel paragrafo successivo per gli scopi della tesi.

2.3 Effetti antitumorali di *Mangifera indica*

Al giorno d'oggi la ricerca è sempre più focalizzata sullo studio di composti di origine naturale e sul loro possibile impiego come integratori da combinare e associare alle classiche terapie antitumorali. Per quanto concerne la pianta di *M. indica*, diversi estratti e preparazioni del frutto hanno manifestato effetti antitumorali su una moltitudine di linee

cellulari. Abbasi et al. hanno dimostrato l'effetto citotossico e antiproliferativo dell'esocarpo e del mesocarpo di diverse varietà di mango coltivate in Cina, sulle cellule di carcinoma epatico HepG2 [52]. Uno studio effettuato da Kim et al. ha messo in evidenza che l'estratto etanolic del frutto del mango può indurre apoptosi in cellule di adenocarcinoma alla cervice Hela [53]. Questi effetti potrebbero essere ascritti alla presenza, in questa frazione del frutto, di fitocomposti di cui è già nota l'attività antiproliferativa quali 3-O-galattoside, acido gallico, acido linoleico, mangiferina gallato, mangiferina e quercetina. L'estratto dell'esocarpo ottenuto dai frutti di alcune varietà di mango (Kent, Francis, Atkins, Ataulfo, Tommy, ed Haden) si è mostrato efficace nel contrastare la proliferazione di cellule di carcinoma mammario triplo negativo (MDA-MB-231), di carcinoma alla prostata (LNCaP), e di carcinoma del colon (SW-480) [54]. Questa frazione del mango è capace di indurre morte apoptotica sia *in vivo* in topi in cui era stato indotto il carcinoma alla prostata che in cellule LNCaP [55]. I risultati ottenuti su questa porzione del frutto sono piuttosto promettenti, ma ad oggi si conosce molto poco sul meccanismo d'azione a livello cellulare della frazione, che andrebbe senz'altro approfondito, poiché anche se l'esocarpo non è la parte del frutto comunemente consumata, possiede indubbiamente spiccate proprietà nutraceutiche. Vi sono anche numerosi studi in cui è stata valutata l'efficacia del mesocarpo, piuttosto ricco di polifenoli. Gli effetti antitumorali di questa porzione sulle cellule di carcinoma mammario sono stati messi in evidenza in studi *in vivo* eseguiti da Banerjee et al. [56]. In particolare, il trattamento delle cellule con estratti di mesocarpo è in grado di bloccare il pathway PI3K/AKT delle cellule cancerose. Corrales-Bernal et al. hanno anche dimostrato che il mesocarpo possiede effetti antiproliferativi in cellule di adenocarcinoma SW480 [57]. Sono stati anche studiati e analizzati gli effetti sulle cellule cancerose indotti dal seme e dall'esocarpo del frutto, sebbene siano generalmente considerati prodotti di scarto. In particolare, l'estratto del seme può causare apoptosi in seguito a stress ossidativo in cellule di carcinoma mammario MDA-MB-231, associato a un incremento dei livelli delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) del glutatione (GSH) e della malondialdeide (MDA) [58]. L'apoptosi è confermata dall'analisi dei markers correlati quali Bax, Bcl-2, citocromo c e caspasi 3,8 e 9. Lo stesso meccanismo è stato evidenziato dal medesimo gruppo di ricerca nelle cellule di carcinoma mammario positive agli estrogeni MCF-7.

Gli effetti antitumorali non sono limitati tuttavia solo al frutto di *M. indica*, ma si estendono anche alle altre porzioni della pianta. Infatti, gli estratti metanolici della corteccia manifestano effetti citotossici sulle cellule di carcinoma pancreatico (PANC-1)

[59], di carcinoma mammario (MCF-7 ed MDA-MB 231) e di carcinoma ovarico (SKOV-3) [60]. Piuttosto scarse sono invece le ricerche sugli effetti antitumorali delle foglie. Estratti etanoliche delle foglie di una varietà di *M. indica* coltivata in Thailandia mostrano solo un debole effetto citotossico su cellule di epatoblastoma, carcinoma gastrico, carcinoma duttale e adenocarcinoma [61], rendendo questa porzione della pianta probabilmente poco utile per un eventuale utilizzo terapeutico. Infine, la mangiferina, polifenolo distintivo di *M. indica*, oltre ad avere attività antiossidante come precedentemente descritto, possiede anche attività antitumorale, che è stata dimostrata in linee cellulari di cancro alla mammella, al polmone, alle ovaie e alla cervice [62].

3. Il carcinoma colon rettale: trattamenti e prevenzione

Il carcinoma del colon retto (CRC) è un tumore maligno che si origina dall'epitelio colon rettale. È la terza forma tumorale per frequenza e la seconda causa di morte per neoplasia in molti Paesi occidentali, con maggiore incidenza negli uomini piuttosto che nelle donne. La larga maggioranza dei carcinomi colon-rettali (95%) sono adenocarcinomi, cioè evolvono da polipi adenomatosi e sono silenti fino al raggiungimento di dimensioni consistenti. I polipi (o adenomi) si sviluppano quando si verifica un cambiamento nelle cellule della parete del colon o del retto: si tratta di una crescita anormale, di tipo ghiandolare del tessuto. Fortunatamente, solo una piccola percentuale di polipi acquisisce caratteristiche di malignità e, quelle volte che avviene, la completa progressione che va dai polipi al carcinoma vero e proprio, avviene generalmente in diversi anni o in un decennio. Quando la dimensione del polipo inizia ad aumentare, si accumulano sempre più mutazioni genetiche ed epigenetiche e se non avviene la rimozione; il polipo acquisisce l'abilità di invadere altri tessuti, diffondendosi anche in organi lontani [63,64] (Figura 3).

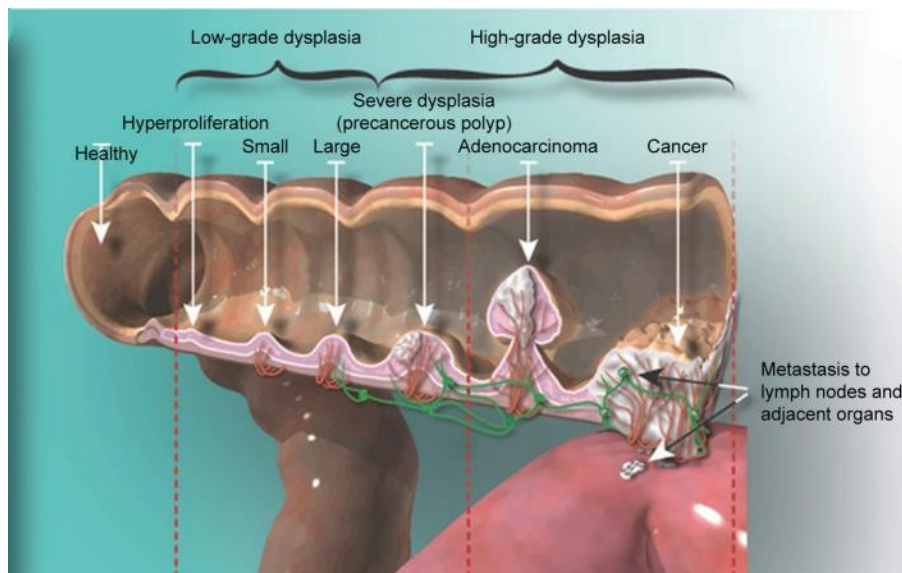


Figura 3. Stadi della progressione tumorale del cancro colon rettale [63].

Vi sono diversi fattori di rischio che portano all'insorgenza della patologia; su alcuni di questi quali dieta, obesità, mancanza di attività fisica, utilizzo del tabacco e abuso di alcool si può agire. Di converso, un elevato apporto di fibre, verdure, folati e calcio nella dieta, sembra tutelare dallo sviluppo del CRC. Altri fattori di rischio possono essere di tipo ereditario, come la presenza in famiglia di polipi colon rettali o di CRC, di malattia infiammatoria dell'intestino (IBS) o di diabete di tipo 2. Ma soltanto il 20% circa dei CRC è di natura ereditaria. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, il carcinoma è di natura sporadica e l'età è il principale fattore di rischio per la malattia, che si manifesta in genere dopo i 50 anni. La diagnosi in stadi precoci della malattia e la resezione dei polipi precancerosi previene lo sviluppo e la progressione del CRC favorendo la sopravvivenza del paziente. Lo screening rappresenta la migliore opportunità di prevenzione, specialmente per coloro che hanno familiarità di CRC; l'obiettivo è quello di ridurre in modo significativo l'incidenza e la mortalità per carcinoma del colon retto attraverso varie strategie: dall'informazione della popolazione alla prevenzione primaria e secondaria oltre alla sorveglianza dei soggetti potenzialmente a rischio [65]. Attualmente esistono diversi approcci e test di screening. Quello più adoperato è la colonscopia. La capacità di questa tecnica è di rilevare entrambe le lesioni precancerose o cancerose tramite visualizzazione diretta. La sensibilità di rilevamento del CRC nella colonscopia è del 95%, mentre la sensibilità nel rilevare gli adenomi in stadio avanzato va dall'88% al 98%. Sebbene sia una tecnica abbastanza invasiva, uno dei maggiori vantaggi è quello di avere la possibilità di rimuovere le lesioni precancerose e le piccole lesioni cancerose nel contempo in cui si sta effettuando l'esame.

In genere, il trattamento ideale per il CRC consiste nella rimozione del tumore e delle metastasi. La chirurgia è il trattamento più utilizzato adoperato per tutti gli stadi del carcinoma e può essere realizzata con escissione locale o con resezione del colon, a seconda delle dimensioni del tumore. Ma, per quelle lesioni non resecabili o per i pazienti che non possono effettuare interventi chirurgici, l'obiettivo è quello di restringere al massimo le dimensioni del tumore e sopprimerlo per inibirne la crescita. In questi pazienti la radioterapia e la chemioterapia rappresentano le vie principali per controllare la progressione tumorale. Chiaramente, in alcuni casi, queste alternative sono impiegate anche prima o dopo la chirurgia come trattamenti adiuvanti o neoadiuvanti per stabilizzare il tumore ed eliminare le cellule cancerose residue [66].

La radioterapia utilizza radiazioni ad elevata energia (come i raggi X) per eliminare le cellule cancerose e fermare la loro proliferazione e può essere di due tipi. La radioterapia esterna viene adoperata come terapia palliativa per migliorare i sintomi della malattia: uno strumento invia in modo locale le radiazioni all'area del corpo interessata; la radioterapia interna, una tecnica più invasiva, adopera invece sostanze radioattive iniettate direttamente nel paziente. La chemioterapia, invece, prevede l'utilizzo di agenti chemioterapici quali: il 5-Fluorouracile (5-FU), l'oxaliplatino (OX), l'irinotecano (IR) e la capecitabina (CAP o XELODA), che possono essere utilizzati da soli o in terapia combinata per aumentarne l'efficacia. I farmaci chemioterapici hanno il compito di bloccare tramite meccanismi differenti la proliferazione incontrollata delle cellule tumorali. Essi rappresentano i principali approcci nel trattamento in prima linea del tumore. Dati provenienti da diverse ricerche effettuate negli ultimi decenni hanno messo in evidenza che l'utilizzo della chemioterapia nei pazienti affetti da CRC, specialmente quelli con metastasi, ha allungato l'aspettativa di sopravvivenza fino a 20 mesi, risultando perciò una delle più adatte per il trattamento di questo tipo di tumore, sebbene, come è noto, sono molteplici le limitazioni associate alla chemioterapia, quali la tossicità sistemica, la resistenza innata o acquisita e la bassa selettività per il tipo di tumore.

Al trattamento chemioterapico si affianca la "terapia mirata" o "targeted therapy" [67]. Questo tipo di terapia opera inibendo direttamente la proliferazione, il differenziamento e la migrazione cellulare. Il microambiente tumorale, inclusi i vasi sanguigni locali e le cellule immunitarie, possono essere bersagliati da farmaci mirati al fine di inibire la crescita tumorale e attuare una maggiore sorveglianza e attacco da parte del sistema immunitario. In questo tipo di terapia i protagonisti principali sono piccole molecole note come anticorpi monoclonali. Il primo farmaco approvato dalla Food and Drug

Administration (FDA) per il trattamento del CRC è stato il cetuximab nel 2004, nello stesso anno è stato approvato il bevacizumab e poi altri anticorpi monoclonali si sono diffusi con il passare degli anni (Figura 4).

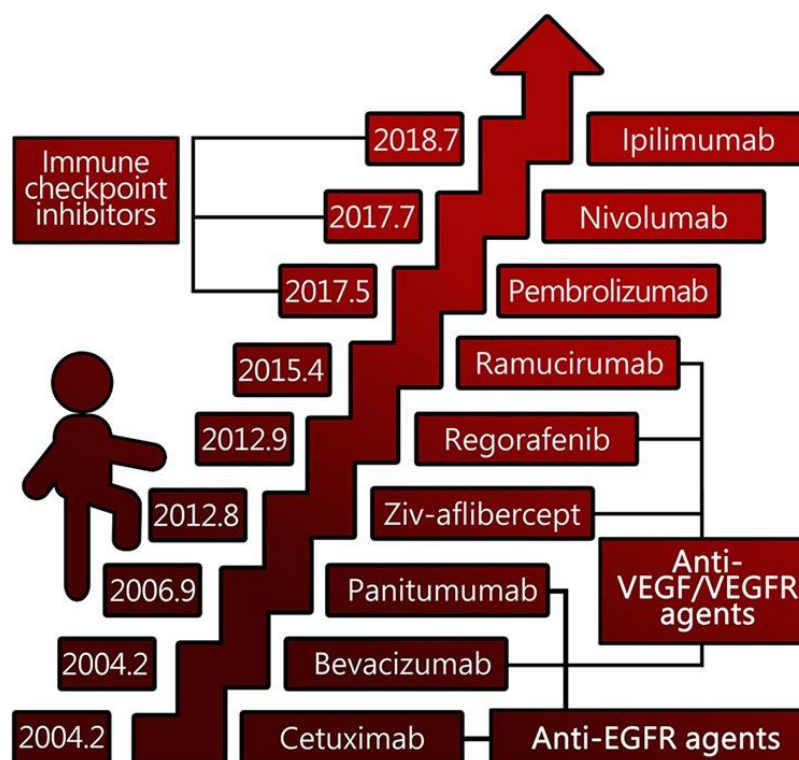


Figura 4. "Terapie target" approvate dall'FDA degli Stati Uniti per il cancro colon rettale.

Ci sono diversi tipi di terapie con anticorpi monoclonali, approvati dall'FDA.

- Terapie che hanno come bersaglio molecolare il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), la cui overespressione è stata riscontrata in diversi tipi di tumore, tra cui il CRC. Questo recettore a tirosina chinasi attiva diversi pathway di segnalazione cellulare (il pathway di RAS/RAF/MEK/ERK e di PI3K/AKT) coinvolti nella proliferazione, nella sopravvivenza e nella crescita cellulare. I due farmaci cetuximab e panitumumab hanno come bersaglio l'EGFR e portano alla sua internalizzazione e degradazione.
- Terapie che hanno come bersaglio il recettore per il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGFR) o il suo target VEGF. Questa famiglia di recettori è suddivisa in tre tipi VEGFR-1 -2 e -3, coinvolti nell'angiogenesi e nella migrazione delle cellule endoteliali. Bevacizumab è il farmaco più adoperato, ma numerosi sono ancora i trials clinici e le molecole in fase di sviluppo.

- Terapie con inibitori delle protein chinasi: questo tipo di trattamenti bloccano la divisione cellulare. Un esempio sono gli inibitori di BRAF, che bloccano l'attività di proteine prodotte dai geni mutanti di BRA, presenti in alcuni casi di CRC.

Le terapie mirate consentono senz'altro una maggiore sopravvivenza, ma sono molto più costose della classica chemioterapia, ed inoltre i farmaci mirati hanno più probabilità di manifestare reazioni avverse nei pazienti specialmente quando vengono combinati due o più agenti. Gli obiettivi futuri mirano a sviluppare trattamenti via via più specifici e individualizzati per ogni paziente che presenta CRC, al fine di ridurre gli eventi avversi sfruttando al massimo l'efficacia di questi farmaci.

4. I processi di morte cellulare nella ricerca anticancro

Al giorno d'oggi, lo studio dei meccanismi di morte cellulare non solo è utile per la comprensione della biologia cellulare di base, ma aiuta anche a studiare nuove strategie terapeutiche sia nell'ambito della ricerca antitumorale, sia nelle malattie autoimmuni e degenerative. L'induzione dell'apoptosi e di molte altre forme di morte cellulare è una delle possibili modalità di trattamento di diverse forme tumorali. Quando si comprenderanno e si sveleranno i meccanismi dei diversi tipi di morte cellulare, potranno essere sviluppate nuove terapie in grado di eliminare le cellule cancerose senza colpire quelle sane. Vi sono diversi meccanismi di morte a cui vanno incontro le cellule, alcuni possono essere predeterminati, programmati (come nel caso dell'apoptosi), altri possono essere di tipo traumatico o infiammatorio. In genere, si possono suddividere in apoptosi, autofagia e necrosi, sebbene esistano anche ulteriori altri processi che condividono alcune caratteristiche con la necrosi, tra cui: metuosi, necroptosi, NETosi, pironecrosi e piroptosi [68]. Tra questi, l'apoptosi e l'autofagia rappresentano i meccanismi più comunemente osservati e studiati nell'ambito della ricerca antitumorale.

4.1 L'apoptosi

L'apoptosi, come è noto, è un meccanismo di morte programmata che svolge un ruolo cruciale nello sviluppo e nelle malattie [69]. Le manifestazioni morfologiche dell'apoptosi consistono nella riduzione del volume della cellula e nella formazione dei corpi apoptotici. Comunemente questo processo si può svolgere mediante tre tipi di pathway: il pathway estrinseco, il pathway intrinseco e il pathway indotto dallo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) (Figura 5).

- Il pathway estrinseco è attivato da una serie di ligandi che si ancorano sul versante esterno della membrana plasmatica alla superfamiglia dei recettori del TNF (Fattore di necrosi tumorale).
- Il pathway intrinseco chiamato anche "pathway mitocondriale" coinvolge il rilascio di fattori apoptogenici come il citocromo C dai mitocondri al citoplasma, in seguito a stress cellulare (Figura 5).
- Il pathway indotto da stress del reticolo endoplasmatico (ER). Questo percorso, che si attiva quando sul reticolo si accumula una quantità eccessiva di proteine che non hanno raggiunto la conformazione nativa (misfolded) [70] coinvolge tre fattori dell'UPR (*unfolded protein response*): PERK (proteina chinasi del reticolo endoplasmatico), IRE-1 (proteine che richiede inositolo-1) e ATF6 (fattore attivante la trascrizione 6), che lavorano insieme per ristabilire la proteostasi del reticolo endoplasmatico. Tuttavia, se il tentativo delle cellule di risolvere il danno fallisce, esse scelgono di avviare l'apoptosi [71].

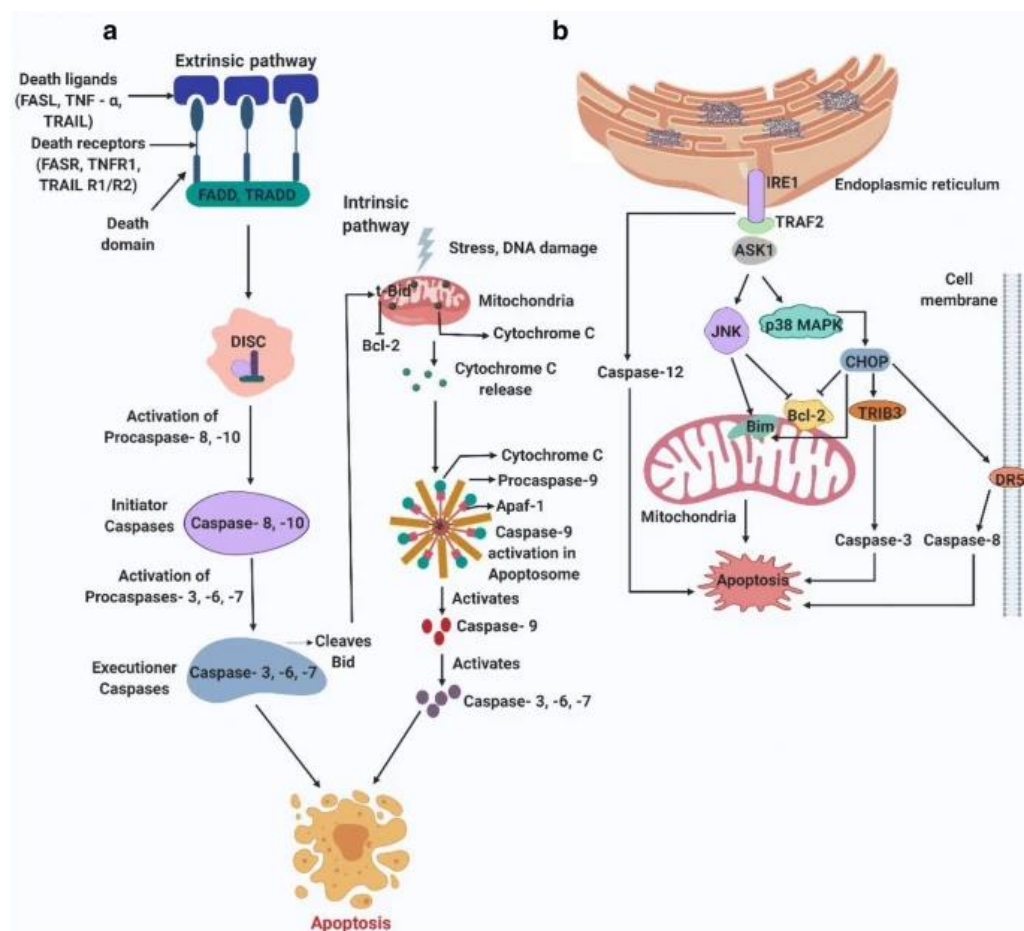


Figura 5. I pathway dell'apoptosi. a) Meccanismo intrinseco ed estrinseco b) Meccanismo dipendente da stress del reticolo endoplasmatico [68].

4.2 L'autofagia

L'autofagia è un complesso processo fisiologico di degradazione e di riciclaggio cellulare, ATP-dipendente, altamente conservato in tutti gli eucarioti. Nel 1963, Christian de Duve definì l'autofagia come un fenomeno durante il quale le cellule fondono vescicole contenenti proteine e componenti da degradare con i lisosomi, portando alla loro decomposizione. Queste vescicole furono soprannominate autofagosomi. Il processo autofagico ha diversi scopi: oltre alla degradazione delle proteine cellulari, è anche coinvolto nel rimodellamento durante lo sviluppo e il differenziamento cellulare, è in grado di fornire aminoacidi nel momento in cui la cellula lo richiede ed è anche capace di partecipare al meccanismo di morte cellulare programmata di tipo II (non apoptotica). L'autofagia svolge un ruolo nel cancro, e può agire sia come promotore che soppressore tumorale [72]. Gli stimoli che possono innescare la risposta autofagica sono diversi: situazioni di stress come il digiuno, cambiamenti nel volume cellulare, accumulo dei ROS o di proteine danneggiate, ed anche l'esposizione a xenobiotici [73]. Esistono tre tipi primari di autofagia: macroautofagia, microautofagia ed autofagia chaperone-mediata (CMA) [74]. Essi si differenziano per il modo con cui il materiale da degradare viene trasportato all'interno delle vescicole lisosomiali, per il tipo di materiale trasportato e per i meccanismi di regolazione. Sebbene ognuno di questi sia un processo morfologicamente distinto, tutti e tre culminano nella consegna del "carico proteico" al lisosoma che si occupa della degradazione e del riciclo delle componenti.

Il termine autofagia si riferisce per la maggior parte delle volte alla macroautofagia. Questo meccanismo prevede la sintesi *de novo* di vescicole a doppia membrana, noti come autofagosomi, che sono adoperati dalle cellule per sequestrare il "carico proteico" a livello citoplasmatico e trasportarlo al lisosoma. Il riciclo dei substrati attraverso la macroautofagia svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare.

La microautofagia è un processo di degradazione lisosomiale non selettivo, in cui le invaginazioni o le protrusioni della membrana lisosomiale, inglobano il carico citoplasmatico. Il processo avviene al limite della membrana dei lisosomi, e può includere anche organelli intatti. Anch'esso ha un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi e della sopravvivenza cellulare.

L'autofagia chaperone-mediata è invece una forma selettiva di autofagia che differisce dalla microautofagia in quanto non utilizza strutture membranose per sequestrare il carico,

ma utilizza invece proteine chaperone che individuano le proteine bersaglio contenenti un particolare motivo pentapeptidico, identificativo per la degradazione lisosomiale. Questi substrati vengono quindi dispiegati e traslocati direttamente attraverso la membrana lisosomiale. Si pensa che il ruolo principale di questo pathway sia l'apporto degli amminoacidi liberi che vengono generati in seguito alla degradazione proteica. Diversi studi hanno recentemente mostrato che, quando l'autofagia chaperone-mediata è compromessa, si altera significativamente il metabolismo del glucosio e dei lipidi e, di conseguenza, il metabolismo energetico dell'intero organismo. Questo processo svolge perciò anche un ruolo importante nella regolazione del metabolismo cellulare.

La mancanza del processo autofagico causa accumulo dei ROS, ridotta funzionalità mitocondriale, instabilità genomica e perdita di qualità delle componenti intracellulari. Quando l'omeostasi cellulare viene persa, si può avere anche sviluppo di diverse malattie. Studi recenti hanno riportato che l'autofagia è coinvolta non solo in alcune malattie ma anche nell'invecchiamento, come dimostrato da studi in diversi organismi modello [75]. È documentato in letteratura che la funzionalità del processo autofagico diminuisce naturalmente con l'avanzare dell'età [76].

Dal punto di vista molecolare, l'autofagia può essere suddivisa in quattro fasi ovvero:

- Induzione
- Elongazione
- Maturazione/fusione
- Degradazione

Durante il processo di induzione del processo autofagico si ha la formazione del fagoforo, una struttura a doppia membrana che espandendosi ingloba la porzione di citoplasma da degradare. Per questa prima fase vengono reclutati due complessi: il primo è il complesso ULK, il quale contribuisce a sua volta a richiamare il secondo complesso della PI3KC3 (fosfatidilinositolo-3-chinasi di classe III), regolatore dell'autofagia, in quanto responsabile della sintesi del fosfatidilinositolo-3-fosfato (PI3P, fosfatidilinositolo-3-fosfato), lipide tipico della membrana dell'autofagosoma, che permette il reclutamento di numerose proteine associate all'autofagia (ATG) sul fagoforo. Alla fase di elongazione del fagoforo prendono parte altri due complessi: il primo è il complesso multimerico ATG12-ATG6-ATG16l e il secondo è il complesso LC3-ATG8. Fondamentale è il ruolo della proteina LC3, che quando viene tagliata da ATG4 forma il frammento LC3-I (forma citosolica), che si coniuga alla fosfatidiletanolamina per generare LC3-II (forma lipidata), che si va a

localizzare sul fagoforo in allungamento favorendo poi la maturazione dell'autofagosoma [77]. La proteina LC3 è di solito utilizzata come marker autofagico e la conversione di LC3-I in LC3-II è una delle modifiche più studiate del meccanismo autofagico. Una volta formato, l'autofagosoma si fonde con il lisosoma, formando l'autofagolisosoma, in cui gli enzimi lisosomali favoriscono la degradazione delle macromolecole nei loro costituenti di base generando così il loro riciclo.

Quando l'autofagosoma completa la fase di maturazione, prima della fase degradativa, le molecole di LC3-II nel versante citoplasmatico sono rimosse da ATG4 per idrolisi della fosfatidiletanolamina e riciclate, quelle localizzate nella membrana interna del fagosoma vengono degradate insieme ad esso (Figura 6).

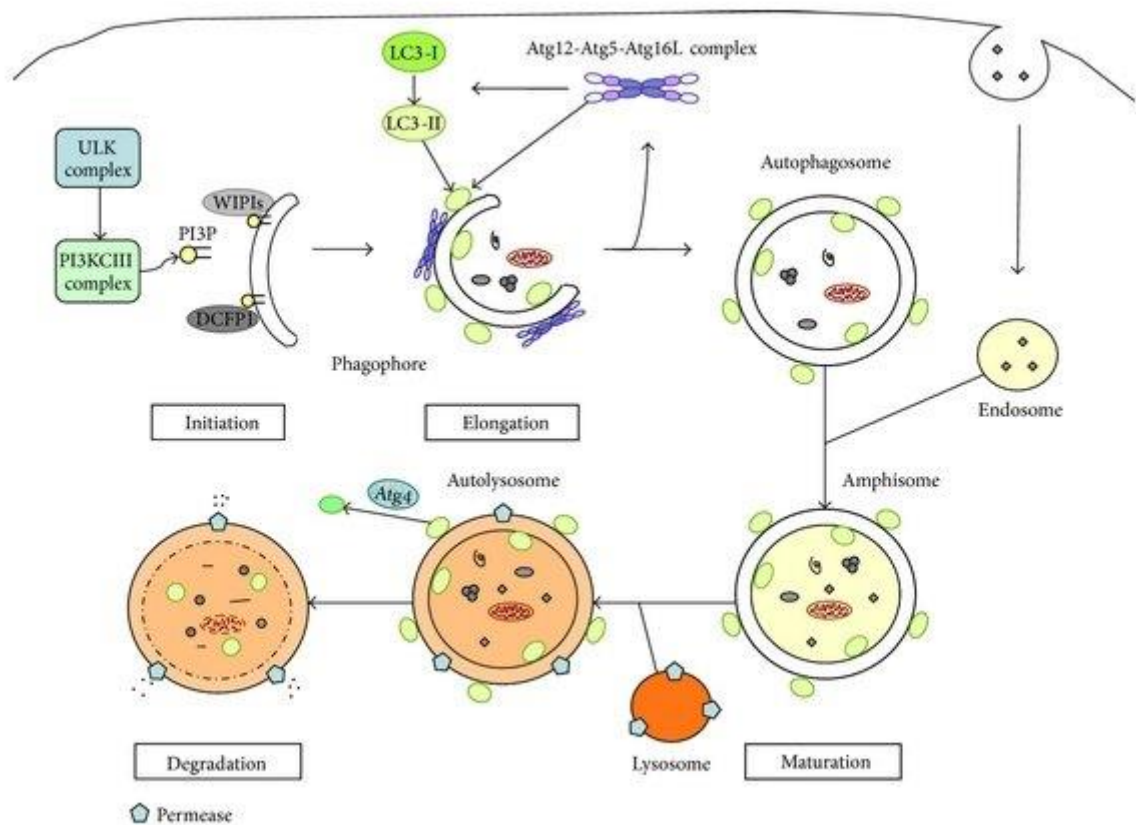


Figura 6. Le differenti fasi del processo autofagico [78].

Un secondo marker adoperato nel controllo del meccanismo autofagico è p62/SQSTM1, che svolge il ruolo di accompagnamento delle proteine ubiquitinate verso la degradazione. Alla fine del processo autofagico si assiste al decremento di p62, che viene degradata dall'autofagosoma grazie ad un'interazione con LC3. Il suo accumulo è generalmente associato al blocco dell'autofagia [79].

5. Mitocondrio e stress ossidativo nell'apoptosi

Il mitocondrio, in quanto centrale energetica della cellula, svolge un ruolo fondamentale nel controllo dell'omeostasi cellulare ed è implicato non solo nella generazione di energia sotto forma di ATP durante il processo della fosforilazione ossidativa ma anche nella produzione dei ROS e nei meccanismi dell'apoptosi stessa come sopra citato [80]. Ci sono diversi siti di produzione dei ROS nelle cellule, quali il citosol, i perossisomi, le membrane del reticolo endoplasmatico, ma la fonte principale a livello cellulare è rappresentata dalla catena di trasporto degli elettroni che si trova a livello mitocondriale [81,82]. Il passaggio del flusso di elettroni nella membrana mitocondriale interna durante la produzione di ATP, genera infatti ROS come l'anione superossido O_2^- , il perossido di idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrilico OH^\cdot . Tutte queste specie reattive si accumulano nelle cellule e possono essere particolarmente pericolose se i sistemi cellulari addetti alla loro rimozione non intervengono eliminando l'eccesso di radicali liberi.

Quando si perde il prezioso equilibrio tra i sistemi pro-ossidanti e anti-ossidanti nelle cellule e nei tessuti, l'accumulo dei ROS può favorire lo sviluppo di diverse condizioni patologiche [83]. Le cellule possiedono sistemi idonei a neutralizzare l'eccesso dei ROS, i cosiddetti sistemi "scavenger": si tratta di enzimi antiossidanti che funzionano come "spazzini" nei confronti dei radicali liberi, rimuovendoli o impendendone la formazione. Tuttavia, se la produzione di specie reattive dell'ossigeno eccede la capacità detossificante dei sistemi "scavenger", si instaura una condizione nota come "stress ossidativo" che può danneggiare DNA, proteine e lipidi. Recentemente, sono stati conati due nuovi termini: "oxidative eustress" che indica il ruolo di dosi fisiologiche dei ROS come segnalatori intracellulari (in particolare, il perossido di idrogeno) e "oxidative distress" che indica invece il danno molecolare connesso ai ROS [84].

Nel contesto delle cellule tumorali, il mantenimento dell'omeostasi redox rappresenta un obiettivo strategico. L'alterazione di questo bilancio, con produzione di elevate quantità dei ROS, può agire in due modi opposti nei confronti delle cellule neoplastiche: o promuovendone la crescita mediante proliferazione cellulare incontrollata, migrazione e sopravvivenza, oppure innescandone la morte [85]. Per fronteggiare i cambiamenti dell'omeostasi redox quando viene perturbata, anche le cellule tumorali sviluppano sistemi "scavenger" citoprotettivi, ma esse possiedono comunque una soglia di tolleranza allo stress ossidativo più alta rispetto a quella che possiedono le cellule normali. Così, il superamento del livello di soglia che può essere indotto da molecole esogene o da sbilancio

intracellulare può indirizzare a morte anche le cellule tumorali. Numerosi studi hanno messo in evidenza che elevati livelli dei ROS possono rendere le cellule tumorali più suscettibili all'azione di ulteriori specie reattive dell'ossigeno, per cui, una possibile strategia nell'ambito della ricerca tumorale è quella di distruggere i sistemi di difesa antiossidanti promuovendo allo stesso tempo la produzione dei ROS [86,87]. Lo stress ossidativo è un evento strettamente legato alla morte cellulare, infatti, quando le cellule non sono in grado di ripristinare il loro normale status fisiologico, attivano il meccanismo apoptotico. Nel pathway intrinseco dell'apoptosi, come precedentemente introdotto, è coinvolto il mitocondrio e l'evento si accompagna a disfunzione mitocondriale e dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$), a cui segue il rilascio di fattori apoptogenici, come i membri pro-apoptotici della famiglia Bcl-2, il citocromo C o AIF [88]. La famiglia delle proteine Bcl-2 è costituita da fattori con funzione pro-apoptotica (come Bax, BAD o Bak) o anti-apoptotica (come Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1). Si tratta di proteine ben conservate dal punto di vista evolutivo, che, in relazione ad uno specifico membro della famiglia, possono antagonizzarsi a vicenda sia nei segnali di morte che in quelli di sopravvivenza, oltre a governare le dinamiche mitocondriali. Questi fattori si ancorano alla membrana mitocondriale esterna (MME) e, regolandone la permeabilizzazione, possono determinare il destino delle cellule, indirizzandole a morte apoptotica.

Esiste inoltre una interessante relazione tra mitocondri e nucleo [89]. In seguito a danno al DNA che può essere promosso da diversi fattori (raggi ultravioletti, sostanze tossiche ecc.), le cellule intervengono arrestando il ciclo cellulare, innescando meccanismi di riparo o, come ultima scelta, andando incontro a morte per apoptosi. D'altra parte, anche l'eccesso dei ROS provoca danni ossidando le basi azotate del DNA, e ciò ne compromette la stabilità ed interferisce con la sua replicazione. Anche in questo contesto il mitocondrio può svolgere un ruolo centrale. Esso si può trasformare infatti da "centrale energetica" della cellula a "centrale di morte" da cui viene avviato il percorso di morte cellulare per via apoptotica intrinseca.

Obiettivi della tesi

Il mio progetto di ricerca è stato svolto presso i laboratori di Biochimica del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche e si è posto l'obiettivo di studiare gli effetti citotossici ed antitumorali di *M. indica* (cv. *Kensington Pride*, Balestrate), un frutto tropicale che, da qualche decennio, grazie ad un ambiente pedoclimatico favorevole, è coltivato e diffuso nelle aree rurali Siciliane. Grazie alla sua ricchezza in termini di macronutrienti, micronutrienti e fitocomposti è considerato un alimento con elevate proprietà nutraceutiche. Sebbene siano noti gli effetti citotossici e antitumorali di alcune delle porzioni del frutto e dei metaboliti secondari da cui è costituito (polifenoli) in diverse linee di carcinoma [90-92], tuttavia, pochi dati sono ad oggi disponibili sul profilo fitochimico delle specie coltivate nell'area Mediterranea [30,32], e nessuno di questi approfondisce l'attività antitumorale. Alla luce di quanto riportato, gli studi presenti in questa tesi sono stati condotti in linee cellulari di carcinoma del colon HT29, Caco-2 e HCT116 studiando gli effetti dell'esocarpo, una delle componenti meno esaminate in letteratura, ma che si è rivelata efficace nel ridurre la vitalità delle cellule tumorali. Nel laboratorio in cui ho sviluppato il mio progetto, da tempo si studiano gli effetti di differenti sostanze di sintesi o composti naturali sulle cellule tumorali umane in coltura, al fine di identificare quelle che abbiano come "target" selettivo le cellule tumorali anziché quelle normali. Nello studio intrapreso in questo progetto, l'attenzione è stata indirizzata in una prima fase all'identificazione degli effetti antiproliferativi esercitati dagli estratti dell'esocarpo di *M. indica* valutandone il meccanismo d'azione, e il coinvolgimento del mitocondrio, nel tentativo di individuarlo come possibile "target" del trattamento. Successivamente, in rapporto ai risultati ottenuti con l'estratto, ne è stata valutata la composizione, analizzando i fitochimici presenti in questa porzione per mezzo di uno studio di HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry). Lo scopo è stato quello di caratterizzare le componenti presenti, e in seguito, valutare l'effetto ed il meccanismo d'azione di uno dei fitocomposti più abbondanti, il metilgallato (MG), un polifenolo derivato dell'acido gallico che possiede diverse proprietà biologiche, tra cui quelle antiossidanti, antiinfiammatorie ed antimicrobiche. Questo composto potrebbe essere responsabile degli effetti determinati dall'esocarpo di mango sulle cellule di carcinoma del colon.

Materiali e Metodi

1. Colture cellulari e condizioni di coltura

Le linee cellulari adoperate come modello sperimentale nella mia tesi sono due linee di adenocarcinoma del colon HT29 e Caco-2, una linea di carcinoma HCT116 (Interlab Cell Line Collection, ICLC, Genova, Italia), ed una linea di fibroblasti umani HDFa (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Monza, Italia). Per permetterne la crescita, le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm² in presenza di terreno di coltura RPMI 1640 addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 10% (precedentemente inattivato al calore ad una temperatura di 56 °C per 30 minuti) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), L-glutammina all'1% ed antibiotico antimicotico (60 µg/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomicina e 250 ng/ml di amfotericina B, 85 µg/ml di cloruro di sodio) (Biowest, MO, USA). Le fiasche sono state mantenute in incubatore alla temperatura di 37 °C e in un'atmosfera costituita dal 5% di CO₂ in modo da consentirne la proliferazione disposte in monostrato e adese al substrato di polistirene delle fiasche. Al fine di valutare gli effetti dei composti, è stato indotto il distacco cellulare adoperando una soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA) diluita in PBS (Tampone fosfato salino: NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, pH 7.4, privo di Ca²⁺ e Mg²⁺) a differenti concentrazioni a seconda del tipo cellulare utilizzato: per il distacco delle cellule HT29 è stata utilizzata la soluzione alla concentrazione 1X, per le linee cellulari Caco-2 e HCT116 la 0.25X e per la linea HDFa la 0.05X. In seguito al distacco, le cellule sono state precipitate tramite una centrifugazione a 77xg per 8 minuti (800 rpm), contate tramite la camera di *Thoma* e di seguito seminate in differenti supporti (da 6 o 96 pozzetti) in base all'esperimento. Dopo piastramento le cellule sono state incubate per una notte intera per permetterne l'adesione al substrato, ed al raggiungimento del 70% di confluenza, sono state sottoposte a trattamento con i diversi composti. Per ogni esperimento è stata effettuata parallelamente una prova controllo rappresentata da cellule trattate in presenza del solo veicolo in cui sono stati solubilizzati i composti utilizzati. La concentrazione finale di etanolo o DMSO adoperati in genere come veicolo, non ha mostrato effetti significativi sulle cellule trattate rispetto alle cellule controllo. I fitochimici acido gallico (GA), acido citrico (CA), mangiferina (MNG), acido chinico (QA), metilgallato (MG) e pentagalloyl glucosio (PGG), così come gli altri composti e reagenti adoperati, sono stati acquistati presso la ditta Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) e solubilizzati seguendo il protocollo fornito dalla ditta. Per ottenere le concentrazioni finali utilizzate negli esperimenti, salvo dove diversamente indicato, le soluzioni madri sono state solubilizzate in terreno di coltura (RPMI 1640 + 1% antibiotico antimicotico).

2. Preparazione dell'estratto di esocarpo di *Mangifera indica*

I frutti di *M. indica* adoperati per la preparazione dei diversi estratti provengono dalla cultivar *Kensington Pride* attualmente coltivata in Sicilia (Balestrate). Inizialmente, i frutti sono stati lavati e la porzione dell'esocarpo è stata tagliata in piccole parti e liofilizzata mediante liofilizzatore HETOSSIC Heto Lab Equipment (Type CD 52-1). La polvere fine ottenuta è stata in seguito solubilizzata in una soluzione idro-alcolica di Etanolo:PBS in rapporto 1:1 alla concentrazione finale 75 mg/ml. L'estratto così solubilizzato è stato poi incubato per una notte a 37 °C in costante agitazione. Successivamente, l'estratto è stato sottoposto a due centrifugazioni: la prima a 120xg per 10 minuti, in cui è stato raccolto il surnatante; ed una seconda a 15500xg per 10 minuti. L'estratto idroalcolico finale, rappresentato dai surnatanti, è stato conservato a -20 °C fino al momento dell'utilizzo. Periodicamente (ogni 2/3 mesi) l'estratto è stato ripreparato fresco. Per ottenere le concentrazioni adoperate negli esperimenti, la soluzione madre precedentemente realizzata è stata diluita in terreno di coltura (RPMI1640 + 1% antibiotico antimicotico).

3. Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT e saggio LDH

Per valutare gli effetti sulla vitalità delle diverse porzioni del frutto e di alcune delle sue componenti, abbiamo adoperato due saggi quantitativi colorimetrici: l'MTT e il saggio dell'LDH (lattico deidrogenasi). Il saggio dell'MTT si serve del sale di tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro) di colore giallo, il quale viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali in blu di formazano, un cristallo insolubile di colore blu-violetto, la cui intensità sarà direttamente proporzionale alla vitalità cellulare residua. Per eseguire tale esperimento, le linee cellulari sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8×10³ cellule/200 µL di terreno di coltura) ed esposte a concentrazioni crescenti dei diversi composti.

Il saggio MTT è stato eseguito aggiungendo 20 µl di MTT (11 mg/ml PBS) ad ogni pozzetto e successivamente incubando la piastra a 37 °C per 2 ore. Dopo aver rimosso il terreno, le cellule sono state lisate con un tampone di lisi (20% Sodio Dodecil Solfato in 50% N, N-dimetilformammide). Infine, in seguito alla lisi delle cellule, l'assorbanza del formazano sviluppata è stata misurata direttamente a 490 nm, con 630 nm come lunghezza d'onda di riferimento, mediante spettrofotometro per micropiastre ELISA (OPSYS MR,

Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). La lettura è stata eseguita rispetto ad una prova bianca rappresentata dal solo tampone di lisi. La vitalità cellulare è stata indicata come percentuale del valore di densità ottica (OD) delle cellule trattate, normalizzata alle cellule non trattate. I dati riportati sono il risultato di esperimenti effettuati in triplicato.

Il saggio della lattico deidrogenasi (LD o LDH) è un metodo comunemente usato per determinare la presenza di fenomeni di citotossicità e danno cellulare. La lattico deidrogenasi è un enzima citoplasmatico che, in presenza di NADH, catalizza la riduzione del piruvato in lattato e produzione di NAD⁺ [93]. In seguito a morte cellulare la lattico deidrogenasi viene rilasciata nell'ambiente extracellulare. Per questo esperimento, le cellule sono state piastrate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 2×10^5 cellule/2 ml di terreno di coltura per pozzetto. Al termine dell'incubazione con i composti, le cellule sono state tripsinizzate, prelevate, ed è stato valutato il rilascio di tale enzima nel medium extracellulare utilizzando uno specifico kit Lattato deidrogenasi (Abbott) che misura la velocità di consumo del NADH letto spettrofotometricamente a 340 nm mediante Architect. In parallelo è stato eseguito un controllo positivo rappresentato dalle cellule trattate con TRITON X-100 allo 0.1%. I risultati ottenuti derivano da esperimenti effettuati in triplicato.

4. Saggio clonogenico

Per eseguire il saggio clonogenico, le linee cellulari di carcinoma del colon sono state seminate in numero di 500 cellule/2 ml di terreno di coltura in piastre da 6 pozzetti, ed ogni condizione è stata ripetuta in triplicato. Il trattamento è stato effettuato dopo 24-48 h dal piastramento. Dopo 10 giorni dal trattamento le cellule sono state fissate con metanolo per 15 minuti e successivamente colorate con cristal violetto 0.01% per 40 minuti a temperatura ambiente. Infine, in ogni pozzetto sono stati effettuati tre lavaggi con acqua distillata, e le piastre sono state lasciate asciugare. Le colonie contenenti più di 50 cellule sono state contate adoperando il software Image J. Il fattore di sopravvivenza (SF) è stato calcolato applicando la seguente formula: $SF = \text{numero di colonie contate} / \text{numero di cellule piastrate} \times \text{efficienza di piastramento delle cellule controllo}$. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato.

5. Valutazione dell'apoptosi

5.1 Analisi del danno al DNA mediante colorazione con Hoechst 33342 e analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare

Per valutare i cambiamenti nella morfologia nucleare in seguito a danno, le cellule sono state colorate con Hoechst 33342, un colorante fluorescente lipofilo in grado di penetrare nelle cellule vitali. I picchi di eccitazione ed emissione per questo fluorocromo sono rispettivamente di 360 nm e di 495 nm. L'Hoechst 33342, una volta entrato nelle cellule, lega il DNA nel solco minore in corrispondenza delle coppie di basi A-T, permettendo di seguire nel tempo lo stato di condensazione della cromatina. Se questa è poco condensata, infatti, il composto darà una fluorescenza diffusa nel nucleo cellulare e poco tenue; invece, nel caso in cui vi sia condensazione cromatinica, la colorazione risulta più intensa e concentrata in una superficie ridotta. Per questi studi, 8×10^3 cellule sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti e prima del trattamento colorate con Hoechst 33342 (2.5 µg/ml medium) per 30 minuti. Successivamente, dopo aver verificato al microscopio a fluorescenza la colorazione delle cellule, il terreno contenente il colorante è stato rimosso ed i pozzetti sono stati sottoposti ad un lavaggio con PBS; a seguire, le cellule sono state incubate con il composto nel terreno di coltura. L'effetto del trattamento sulla morfologia cellulare è stato visualizzato adoperando il microscopio Leica DC 300F (Leica microsystems) mediante filtro DAPI (lunghezza d'onda di eccitazione 372 nm e lunghezza d'onda di emissione 456 nm). Tutte le immagini sono state acquisite mediante software Leica Q Fluoro.

Per studiare la distribuzione delle cellule lungo le fasi del ciclo cellulare, è stato adoperato lo Ioduro di Propidio (PI), un fluorocromo che si intercala nel DNA (assorbe la luce ad una lunghezza d'onda di 488 nm e la emette a 575 nm). La percentuale di cellule in fase sub-G0-G1 è considerata indice di cellule morte che presentano DNA frammentato. Le analisi sono state effettuate mediante citofluorimetro Beckman Coulter Epics XL (Brea, CA, USA). Per eseguire l'esperimento, sia le cellule controllo che le cellule trattate sono state distaccate mediante tripsinizzazione e pellettate per centrifugazione a 120xg per 10 minuti. Successivamente è stato effettuato un lavaggio in PBS freddo e le cellule sono state centrifugate nuovamente a 120xg per 10 minuti. Alla fine, 1 ml di soluzione ipotonica di 50 µg/ml ioduro di propidio, 0.1% sodio citrato, 0.1% Nonidet P40 e 100 µg/ml RNase A, è stata aggiunta ai pellet cellulari e l'incubazione è stata protratta per 4 h al buio a 4 °C

prima delle analisi citofluorimetriche. L'analisi dei dati è stata condotta mediante il software Expo32.

5.2 Saggio dell'arancio di acridina ed etidio bromuro

Per studiare la morte apoptotica è stato adoperato il saggio colorimetrico dell'arancio di acridina/etidio bromuro (AO/EB) seguendo il protocollo riportato da D. Ribble et al. [94]. Il saggio combina due molecole fluorescenti intercalanti del DNA, permettendo così di discriminare le cellule vitali da quelle morte. Dopo colorazione, le cellule vitali assumono una colorazione verde diffusa; le cellule morte, invece, si presenteranno o in apoptosi precoce (con colorazione nucleare verde-giallo), o in apoptosi tardiva (con colorazione della cromatina arancione). Per svolgere l'esperimento, le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8×10^3 cellule/200 μ l di terreno di coltura), trattate con il composto e colorate con 8 μ l di una soluzione composta da 100 μ g/ml arancio di acridina e 100 μ g/ml di etidio bromuro. A seguire, sono stati osservati gli effetti e le immagini sono state acquisite mediante un microscopio invertito a fluorescenza Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania) sfruttando i filtri rodamina (lunghezza d'onda di eccitazione 596 nm e lunghezza d'onda di emissione 620 nm) e fluoresceina isotiocianato (FITC, lunghezza d'onda di eccitazione 485 nm e lunghezza d'onda di emissione 530 nm). Le immagini acquisite con i singoli filtri sono state utilizzate per eseguire il merge con il software Leica Q Fluoro (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania).

5.3 Saggio dell'Annessina V / Propidio Ioduro

Gli effetti apoptotici sono stati inoltre studiati adoperando il Saggio dell'AnnessinaV/PI, che permette di individuare uno degli eventi che si manifesta precocemente durante questo processo, ossia l'esternalizzazione della fosfatidilserina (PS), un fosfolipide di membrana collocato sul versante interno della membrana plasmatica. La fosfatidilserina lega con elevata affinità l'Annessina V, la quale, coniugata con fluorocromi quali l'Allofocianina (APC), risulta essere un marcatore sensibile per l'analisi citofluorimetrica delle cellule in apoptosi. Da queste analisi è possibile identificare le cellule in apoptosi o in necrosi. Osservando la positività o meno delle cellule all'Annessina V-APC e allo Ioduro di Propidio (PI) si possono infatti distinguere cellule necrotiche (positive al PI e negative all'Annessina V); cellule in apoptosi tardiva (positive sia all'Annessina V che al PI);

cellule in apoptosi precoce (positive all'Annexina V e negative al PI) e cellule vitali (negative all'Annexina V e al PI).

Le cellule HCT116 (2×10^5 /2 ml di terreno per pozzetto) sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e quindi sottoposte ai trattamenti con il composto. Al termine del trattamento le cellule sono state prelevate mediante tripsinizzazione, centrifugate a 120xg per 8 minuti, risospese in PBS e contate. In seguito, 10^5 cellule sono state incubate con Annexina V-APC (BD Pharmingen) e PI (Sigma-Aldrich) al buio, secondo le indicazioni del produttore. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati analizzati mediante citofluorimetro FACS Aria Cell Sorter (BD Pharmingen). I dati ottenuti sono stati poi esaminati con il software FlowJo (TreeStar, OR).

5.4 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

La perdita del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) è uno degli eventi intracellulari che si manifestano durante l'apoptosi e coincide con l'aumento della permeabilità mitocondriale [95]. Il $\Delta\psi_m$ è stato misurato secondo quanto indicato nel protocollo fornito dalla Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) adoperando il fluorocromo JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetil-benzimidazolilcarbocianina ioduro), una sonda cationica lipofila in grado di attraversare le membrane cellulari. Quando le cellule sono vitali e possiedono mitocondri con potenziale di membrana integro (con elevato $\Delta\psi_m$), la sonda si accumula all'interno degli organelli formando strutture dette J-aggregati che emettono fluorescenza rosso-arancione, che viene analizzata mediante filtro rodamina; al contrario, quando le cellule non sono vitali, esprimono un basso $\Delta\psi_m$ poiché il mitocondrio si depolarizza, e il JC-1 rimane nella forma monomerica (JC-1 monomeri) accumulandosi prevalentemente nel citosol, dove emette fluorescenza nel verde che viene osservata mediante filtro FITC. Per valutare l'effetto dell'estratto MPE sul $\Delta\psi_m$, le cellule HT29, HCT116 e Caco-2 sono state piastrate in piastre da 96 pozzetti (8×10^3 cellule/200 μ l di terreno di coltura). In seguito a trattamento con MPE le cellule sono state incubate per ulteriori 15 minuti a 37 °C con una soluzione contenente il fluorocromo JC-1. Dopo aver allontanato il terreno contenente il fluorocromo, sono stati effettuati due lavaggi in PBS. Infine, le cellule sono state visualizzate utilizzando il microscopio a fluorescenza Leica (Leica Microsystems) dotato di DC 300F camera (Wetzlar, Germania) con software Leica Q Fluoro. Sono stati selezionati almeno tre campi per ogni condizione per calcolare il rapporto JC-1 aggregati/JC-1 monomeri. La riduzione di questo rapporto è stata considerata come caduta del $\Delta\psi_m$.

6. Valutazione della produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule trattate con il composto, è stata misurata utilizzando l'H₂DCFDA (diidrodiclorofluoresceina diacetato, Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR), una sonda non fluorescente caratterizzata dalla presenza di due gruppi acetilici che, conferendole caratteristiche lipofile, ne consentono il passaggio attraverso la membrana plasmatica. Dopo l'ingresso nella cellula, le esterasi intracellulari rimuovono i gruppi acetile, e la molecola ottenuta (DCFH) viene così ossidata dai ROS eventualmente prodotti e trasformata in un aggregato verde fluorescente (DCF, diclorofluoresceina). Per valutare i ROS, le cellule di carcinoma del colon sono state piastrate in numero di 8×10^3 cellule/200 μ l terreno in piastre da 96 pozzetti ed incubate con il composto per i diversi tempi. Alla fine del trattamento, il terreno è stato sostituito e le cellule sono state incubate con 20 μ M di H₂DCFDA a 37 °C per 30 minuti. Successivamente il terreno è stato sostituito con PBS contenente 5 mM di glucosio, e dopo 20 minuti la fluorescenza è stata visualizzata direttamente mediante microscopio Leica DMR con telecamera DC 300F adoperando un filtro FITC (isotiocianato di fluoresceina) con lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 530 nm. Le immagini sono state acquisite utilizzando il software Leica Q Fluoro. Le cellule con fluorescenza verde sono state monitorate e contate mediante fluorimetro Varian CARY Eclipse Fluorescence (Varian Medical Systems Italia SpA, Milan, Italy) e normalizzate rispetto al numero di cellule totali per ogni campo analizzato. Sono stati esaminati tre campi per ciascuna condizione. I valori sono indicati in termini di intensità di fluorescenza relativa.

7. Valutazione della produzione dell'anione superossido mitocondriale

La produzione dell'anione superossido mitocondriale ($O_2^{\cdot-}$) è stata misurata adoperando il MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific, Monza, Italia), una sonda cationica specifica mitocondriale che produce fluorescenza rossa quando viene ossidata dall'anione superossido. Per questo esperimento, le tre linee cellulari di carcinoma del colon sono state seminate in piastre da 96 pozzetti (8×10^3 cellule/200 μ l terreno) e trattate con MPE per i diversi tempi. Al termine del trattamento, le cellule sono state incubate per 10 minuti in una soluzione 5 μ M di MitoSOX Red, preparata in HBSS/Ca/Mg secondo le indicazioni

del produttore. Le cellule incubate con rotenone sono state impiegate come controllo positivo della produzione di anione superossido. Le cellule positive al trattamento sono state visualizzate mediante microscopio a fluorescenza Leica adoperando un filtro rodamina con lunghezza d'onda di eccitazione di 596 nm e lunghezza d'onda di emissione di 620 nm. Le immagini sono state acquisite con il Software Leica Q Fluoro e l'analisi quantitativa è stata effettuata adoperando il Software ImageJ.

8. Preparazione della frazione citosolica e mitocondriale

Il frazionamento subcellulare per ottenere le frazioni citosoliche e mitocondriali, è stato effettuato secondo protocollo di Di Mauro et al. [96]. 1.5×10^7 cellule/condizione sono state trattate con MPE e, al termine, dopo aver effettuato un lavaggio in PBS, le cellule sono state staccate e il pellet è stato ottenuto mediante centrifugazione a 77xg per 8 minuti. Ogni campione è stato diluito adoperando il tampone STM (250 mM saccarosio, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, e cocktail di inibitori delle proteasi) e passato attraverso una siringa da 25 gauge per circa 30-40 volte (passaggio ripetuto due volte). Successivamente, gli omogenati sono stati posti in ghiaccio per 30 minuti, vortexati per 15 secondi e centrifugati a 800xg per 15 minuti a 4 °C (questa temperatura è stata utilizzata per tutte le centrifugazioni successive). A questo punto, il surnatante ottenuto (S1) è stato adoperato per isolare la frazione mitocondriale e citosolica. Dopo una centrifugazione a 800xg per 10 minuti, eliminato il pellet, il surnatante S2 è stato centrifugato a 15500xg per 15 minuti, ottenendo così il surnatante (S3) ed il pellet (P3). Il pellet P3 è stato risospeso nel tampone STM e sottoposto ad una centrifugazione a 13000xg per 10 minuti. Il pellet P4 ottenuto, risospeso nel tampone SOL (50 mM Tris HCl pH 6.8, 1 mM EDTA, 0.5% Triton-X-100 ed inibitori delle proteasi) è la "frazione mitocondriale". Il surnatante (S3) è stato precipitato con acetone al 100% (1:1 in volume) per 2-3 ore a -20 °C e successivamente centrifugato a 13000xg per 5 minuti. Da questo pellet, diluito in tampone STM, è stata ottenuta la frazione citosolica. 30 µg di proteine delle frazioni citosoliche e mitocondriali sono state analizzate mediante western blotting al fine di valutare i livelli del citocromo C e di AIF. COX IV e γ -tubulina sono stati utilizzati come marcatori per il corretto caricamento delle rispettive frazioni mitocondriali e citosoliche.

9. Estrazione delle proteine e analisi Western Blotting

L'analisi dei livelli delle proteine è stata effettuata mediante tecnica di western blotting. Per l'esecuzione degli esperimenti le cellule sono state seminate in piastre da 6 pozzetti (2×10^5 cellule/2 ml di terreno di coltura). Dopo il trattamento con i composti, le cellule sono state distaccate con Tripsina-EDTA, prelevate e centrifugate ad una velocità di $77 \times g$ per 8 minuti. In seguito a rimozione del surnatante, i pellet cellulari sono stati risospesi nel tampone di lisi RIPA, costituito da NP-40 all'1%, sodio deossicolato 0.5%, SDS 0.1 %, preparato in PBS (pH 7.4) contenente gli inibitori delle proteasi (aprotinina 25 $\mu\text{g/ml}$, fluoruro di fenilmetansulfonile (PMSF) 1 mM, leupeptina 25 $\mu\text{g/ml}$ e pirofosfato di sodio 0.2 mM) (SIGMA FAST, cocktail di inibitori delle proteasi, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). I lisati cellulari sono stati successivamente sottoposti a sonicazione (3 cicli da 10 secondi, intervallati da 5 secondi) ad una intensità di 10 REV (Soniprep 150, Cellai Srl, Milano, Italia). La concentrazione proteica dei singoli estratti cellulari è stata determinata adoperando il saggio di Bradford (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Segrate, Milano). In seguito, 40 μg di proteine di ciascun campione sono stati preparati in tampone di caricamento 2X (Tris-HCl 50 mM, β -mercaptoetanol 100 mM, SDS al 2%, blu di bromofenolo allo 0.1%, glicerolo al 10%, pH 6.8) e denaturate per 5 minuti a 95 °C. I campioni sono stati sottoposti a migrazione elettroforetica tramite SDS-PAGE (Sodio Dodecil Solfato - Elettroforesi su Gel di Poliacrilammide) dopo caricamento nei pozzetti di gel di poliacrilammide. I singoli campioni proteici sono stati caricati in parallelo a standard di proteine a peso molecolare noto (Amersham, GE Healthcare Life Science, Milano, Italia) e, a seguire, sottoposti a scorrimento elettroforetico verticale a 100V (20mA) per circa 2 ore in presenza del tampone di scorrimento Tris glicina 1X (25 mM tris base, 250 mM glicina, 0.1% SDS, pH 8.3). Al termine le proteine sul gel sono state trasferite mediante elettroblotting (20V, per una notte), su un filtro di nitrocellulosa (Bio-Rad Laboratories Srl) in presenza di tampone di trasferimento 1X (glicina 39 mM, tris base 48 mM, SDS allo 0.037% e metanolo al 20%, pH 8.3). Per accertare l'avvenuto trasferimento delle proteine e per valutare l'omogeneità del contenuto proteico dei singoli campioni sottoposti ad analisi, il filtro di nitrocellulosa è stato colorato con il Rosso Ponceau 1X, un colorante rosso che colora in modo reversibile e aspecifico le proteine trasferite sul filtro. Al termine, il filtro è stato sottoposto a decolorazione eseguendo una serie di lavaggi in TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 allo 0.005%, a pH 7.5) e successivamente incubato per 1h in una soluzione di blocco (latte o albumina a percentuali variabili a seconda dell'anticorpo

impiegato, solubilizzati in TBST). Al termine dell'incubazione, il filtro è stato sottoposto a 3 lavaggi da 10 minuti ciascuno in TBST. Si è quindi proceduto all'incubazione della membrana in presenza dell'anticorpo primario di interesse. L'incubazione è stata condotta a 4 °C per una notte. Per la rilevazione delle proteine AIF, ATG1/ULK1, ATG7, Bcl2, BclXL, Catalasi, CHOP, cJun, COX IV, γ -H2AX, JNK, pJNK, GRP78, Mcl-1, MnSOD, pATM, pERK 1/2, ERK 1/2, pNrf2, p53, PCNA, pro-caspasi 3, VDAC1 sono stati impiegati anticorpi primari acquistati presso la ditta Santa Cruz Biotechnology (diluiti 1:200, Santa Cruz, CA, USA), citocromo C, PARP1 e pro-caspasi 9 dalla ditta Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA, diluito 1:1000); p62 (diluito 1:1000) dalla ditta Sigma Aldrich (Milano, Italia); LC3 e mitofillina (diluiti 1:1000) dalla Novus Biologicals (Milano, Italia). Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario, il filtro è stato sottoposto a tre lavaggi da 10 minuti in TBST per eliminare eventuali residui di anticorpo primario non legato ed è stato incubato per 1 h con l'anticorpo secondario (diluito 1:5000, Amersham, GE Healthcare Life Science, Milano, Italia) coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). Le bande di interesse delle proteine sono state osservate in chemiluminescenza (ECL) mediante l'impiego del kit di reagenti Cyanagen (Bologna, Italia) contenente Luminol-Enhancer solution e Peroxide Solution. Il segnale ottenuto tramite sviluppo in ECL è stato rilevato mediante lo strumento ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le analisi densitometriche sono state effettuate adoperando il software Quantity One (Bio-rad). La γ -tubulina o la β -actina (diluite 1:1000; Sigma-Aldrich, Milan, Italy) sono state impiegate come controllo di un corretto caricamento e per la normalizzazione delle bande, dopo aver verificato che i livelli delle proteine non fossero influenzati dai trattamenti.

10. Misurazione dei gruppi tiolici intracellulari

Per saggiare la concentrazione dei gruppi tiolici è stato adoperato il metodo del reattivo di Ellman [97]. Per la valutazione dei tioli intracellulari, le cellule (1×10^6 cellule/5 ml di terreno in Petri da 10 cm) dopo il trattamento con il composto, sono state distaccate mediante tripsinizzazione, lavate in PBS e risospese in 30 mM Tris- HCl, 3 mM EDTA, pH 8.2. Le proteine cellulari sono state precipitate aggiungendo alle aliquote 25 μ l di DTNB 1.5 mM (Reattivo di Ellman) e 400 μ l di metanolo. La miscela è stata sottoposta a centrifugazione a 3000xg per 5 minuti, e successivamente 250 μ l di ogni surnatante sono stati trasferiti in piastre da 96 pozzetti ed è stata eseguita una lettura al lettore per

micropiastre ELISA (OPSYS MR, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) a 412 nm. Per analizzare i gruppi tiolici liberi, le cellule sono state risospese con 25 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 10% e sottoposte a centrifugazione. A seguire, 50 µl di ogni surnatante sono stati trasferiti in supporti da 96 pozzetti, aggiungendo 200 µl di 0.2 M Tris-HCl pH 8.9 e 20 µl di DTNB. Il contenuto finale di tioli proteici intracellulari è stato determinato misurando l'assorbanza a 412 nm. I risultati ottenuti dall'analisi del contenuto di gruppi tiolici sono stati normalizzati al contenuto proteico totale ed espresse sotto forma di nanomoli di gruppi SH per 10⁵ cellule, facendo uso di una curva standard di GSH.

11. HPLC-ESI-QTOF-MS

La caratterizzazione del MPE è stata effettuata in collaborazione con i colleghi della Sezione di Chimica del Dipartimento Stebicef. La determinazione quantitativa delle componenti dell'estratto di esocarpo di *M. indica* è stata condotta mediante HPLC/MS. Il sistema di HPLC usato è un Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA). È stata inoltre usata la colonna in fase inversa [Phenomenex Luna C18(2) (dimensione colonna 150 mm x 4.6 mm, misura delle particelle 3 µm, Phenomenex Inc., Bologna, Italia) con Phenomenex C18 security guard (dimensione colonna 4 mm x 3 mm), Phenomenex Inc., Bologna, Italia]. È stata settata una portata di 0.5 ml/min e la temperatura della colonna è stata settata a 30 °C. Il volume iniettato di campione è stato impostato a 25 µL. Per l'eluizione sono state adoperate: la fase A, 0.1% di acido formico in acqua; la fase B, 0.1% di acido formico in acetonitrile. Gradienti impiegati: 0-5 minuti, 5% B (isocratico); 5-15 minuti, da 5% a 15% B (gradiente lineare); 15-20 minuti, 15% B (isocratico); 20-25 minuti, da 15% a 30% B (gradiente lineare); 25-35 minuti, 30% B (isocratico); 35-45 minuti, 5% B (per lavaggio e ricondizionamento). Per monitorare l'eluato è stato usato un cromatogramma di corrente ionica totale (TIC). Il campione è stato sottoposto a ionizzazione mediante elettrospray (ESI) Dual AJS ESI source (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA) e per la registrazione dello spettro è stato impiegato lo spettrometro di massa Agilent 6540 UHD accurate-Q-TOF (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, USA). Tutti gli esperimenti sono stati fatti in modalità ionica negativa. Come gas di desolvatazione è stato impiegato N₂ (300 °C, 8 L/min); nebulizzatore (45 psig), sheat gas (400 °C, 12 L/min). Il potenziale di capillarità è stato settato a 2.6 kV e il frammentatore settato a 75 V. Il range dell'MS utilizzato è stato

100-1000 m/z. Gli standard di acido gallico e mangiferina, acquistati presso la ditta Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), sono stati impiegati per preparare delle rette di taratura per la determinazione quantitativa di questi analiti nell'estratto dell'esocarpo di *M. indica*.

12. Valutazione dei vacuoli autofagici mediante colorazione con monodansilcadaverina (MDC)

La formazione di organelli vescicolari acidi è stata evidenziata attraverso colorazione con monodansilcadaverina (MDC), una molecola fluorescente verde che consente di riconoscere i vacuoli autofagici come strutture *dot-like* distinte, che si presentano con una colorazione verde intensa e rilevabile mediante microscopia a fluorescenza. La MDC tende ad accumularsi nei compartimenti acidi come gli autofagosomi, legando in modo specifico i lipidi presenti sulla membrana di questi organelli. Per questo esperimento, le cellule HCT116 sono state seminate (8×10^3 cellule/200 μ l di terreno di coltura) in piastre da 96 pozzetti per i tempi indicati e dopo il trattamento, colorate direttamente in piastra con MDC 0,05 mM in PBS per 10 minuti a 37 °C al buio e analizzate al microscopio a fluorescenza LEICA DMR utilizzando il filtro DAPI. Le immagini sono state acquisite tramite telecamera Leica DC300F (Wetzlar, Germania). Sono stati esaminati tre diversi campi per ciascuna condizione.

13. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati, riportati come media \pm SD, è stata effettuata tramite il software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA). Il test *t* di Student è stato adoperato per valutare le differenze significative tra campioni trattati e non trattati. Un *p* value < 0.05 è stato considerato il livello soglia per le differenze significative.

Risultati

EFFETTI DELL'ESTRATTO DI ESOCARPO DI *Mangifera indica* (MPE) SU CELLULE DI CARCINOMA DEL COLON

1. L'estratto di esocarpo di mango (MPE) provoca effetti citotossici e cambiamenti morfologici in cellule di carcinoma del colon.

Per valutare gli effetti esercitati dall'MPE su diverse linee di carcinoma del colon, sono stati inizialmente condotti test di vitalità cellulare MTT su cellule HT29, Caco-2 e HCT116 analizzando l'efficacia dopo 24 e 48 h di trattamento con diverse concentrazioni dell'estratto (15-600 µg/ml). Le analisi sono state effettuate utilizzando come cellule controllo fibroblasti umani HDFa [98]. Come mostrato in Figura 1A, già dopo 24 ore di trattamento l'estratto è in grado di ridurre la vitalità di tutte e tre le linee cellulari di colon in modo dose-dipendente. Infatti, l'effetto inizia a manifestarsi alla concentrazione 180 µg/ml e adoperando la concentrazione più elevata di 600 µg/ml la vitalità residua è del 46%, 35% e 44% nelle HT29, Caco-2 e HCT116 rispettivamente. Questo effetto è ancora più evidente prolungando l'incubazione con il composto e raggiunge il picco a 48 h con la dose 360 µg/ml. Nessun effetto citotossico è stato invece osservato a questa concentrazione nelle cellule controllo non tumorali, rappresentate in questo studio dai fibroblasti HDFa. A concentrazioni più elevate, si assiste ad un progressivo aumento della tossicità aspecifica anche nelle cellule non tumorali, pertanto, la dose di 360 µg/ml è stata utilizzata per tutti gli esperimenti successivi.

Come si osserva dalle immagini al microscopio ottico in Figura 1B, una larga porzione di cellule esposte al trattamento iniziano a distaccarsi dal substrato, manifestando chiari cambiamenti morfologici: le membrane presentano bordi irregolari, le cellule sono tondeggianti e presenti in numero ridotto rispetto alle cellule controllo non esposte al trattamento. Questi cambiamenti non sono tuttavia visibili nella linea cellulare normale di fibroblasti HDFa (Figura 1A).

La capacità dell'MPE di inibire la crescita cellulare è stata inoltre confermata dall'analisi di western blotting della proteina PCNA, noto marker di proliferazione cellulare, i cui livelli subiscono un decremento in seguito al trattamento con MPE in tutte e tre le linee di carcinoma del colon.

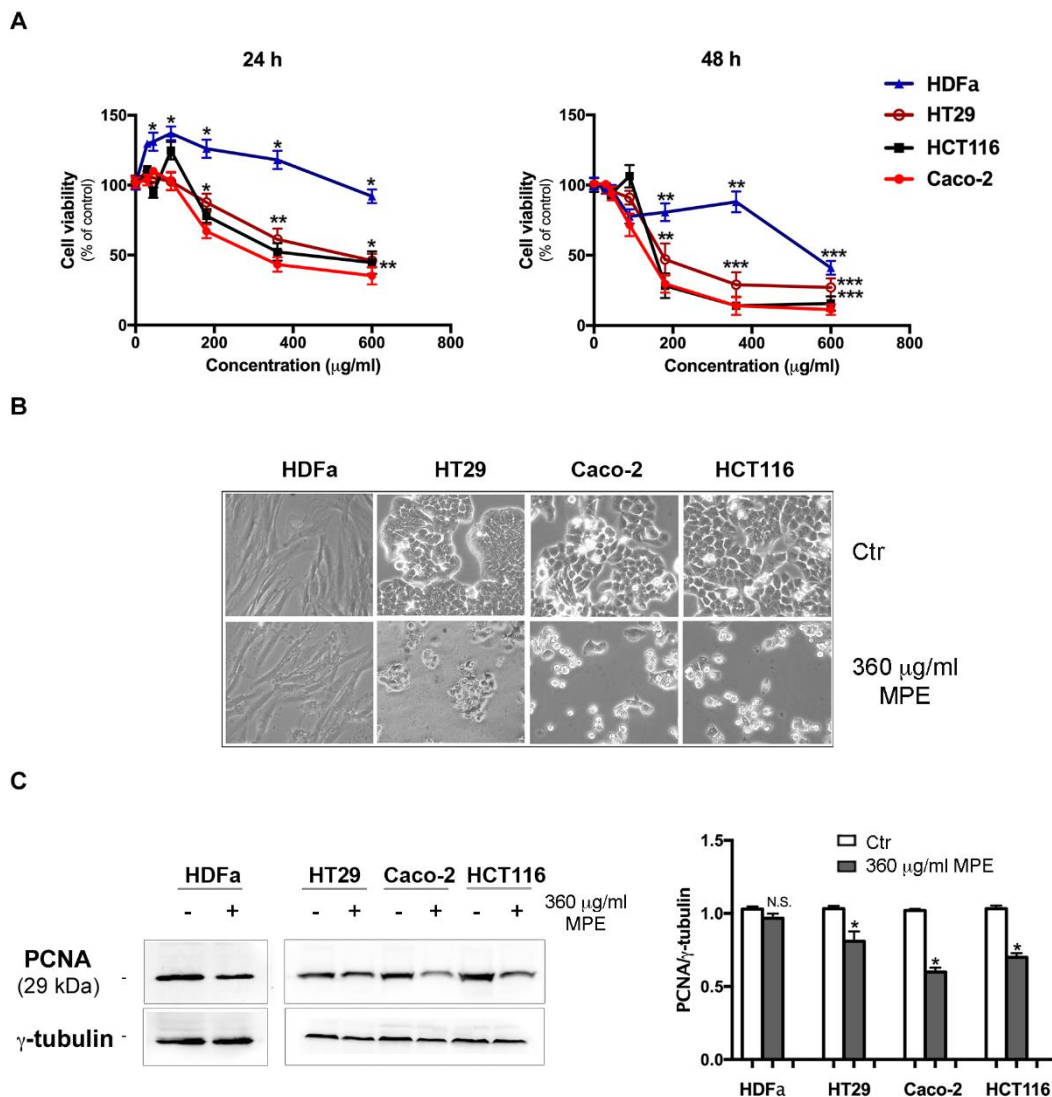


Figura 1. Effetti dell'MPE sulla vitalità cellulare e sui livelli del marker di proliferazione PCNA (antigene nucleare di proliferazione cellulare) in linee cellulari di fibroblasti umani e su cellule di carcinoma del colon. (A) Fibroblasti umani (HDFa) e cellule di carcinoma del colon (HT29, Caco-2 e HCT116) sono state incubate in presenza di diverse concentrazioni di MPE per 24 e 48 h come riportato nei Materiali e Metodi. Successivamente, la percentuale di cellule vitali è stata valutata adoperando il saggio MTT. I dati riportati sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test t di Student: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo. **(B)** Variazioni morfologiche indotte da 48 h di trattamento con MPE 360 $\mu\text{g/ml}$ ed acquisite con microscopio invertito Leica. Le immagini riportate in figura sono state acquisite ad un ingrandimento 200X mediante software IM50 Leica. **(C)** Analisi di western blotting dei livelli della proteina PCNA in fibroblasti normali HDFa e in cellule di carcinoma del colon. È riportato il blot della γ -tubulina come controllo di un omogeneo caricamento. I valori di densitometria sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti normalizzati alla γ -tubulina. (*) $p < 0.05$ rispetto al controllo. N.S., non significativo.

2. Il trattamento con estratto di esocarpo di mango (MPE) inibisce la capacità clonogenica delle cellule di carcinoma del colon

L'inibizione della crescita cellulare delle cellule di carcinoma del colon è stata inoltre supportata dal saggio clonogenico (Figura 2) che tiene conto dell'abilità di singole cellule

di proliferare formando colonie. Adoperando dosi crescenti di MPE (15-90 $\mu\text{g/ml}$), è stato osservato che, rispetto alle cellule controllo, la concentrazione 15 $\mu\text{g/ml}$ è in grado di ridurre in modo significativo l'efficienza di crescita cellulare delle Caco-2 (36.4%) e delle HCT116 (33.1%), mentre influenza solo in minima parte le cellule HT29 (17.2%). La capacità di formare cloni si annulla alla concentrazione 30 $\mu\text{g/ml}$ nelle cellule Caco-2 e HCT116 mentre nelle cellule HT29 ciò si verifica ad una dose più alta (90 $\mu\text{g/ml}$), confermando così una minore sensibilità di queste cellule all'estratto.

I risultati ottenuti mettono in evidenza la capacità dell'MPE di contrastare la capacità proliferativa delle cellule di carcinoma del colon, riducendone la vitalità e il potenziale clonogenico.

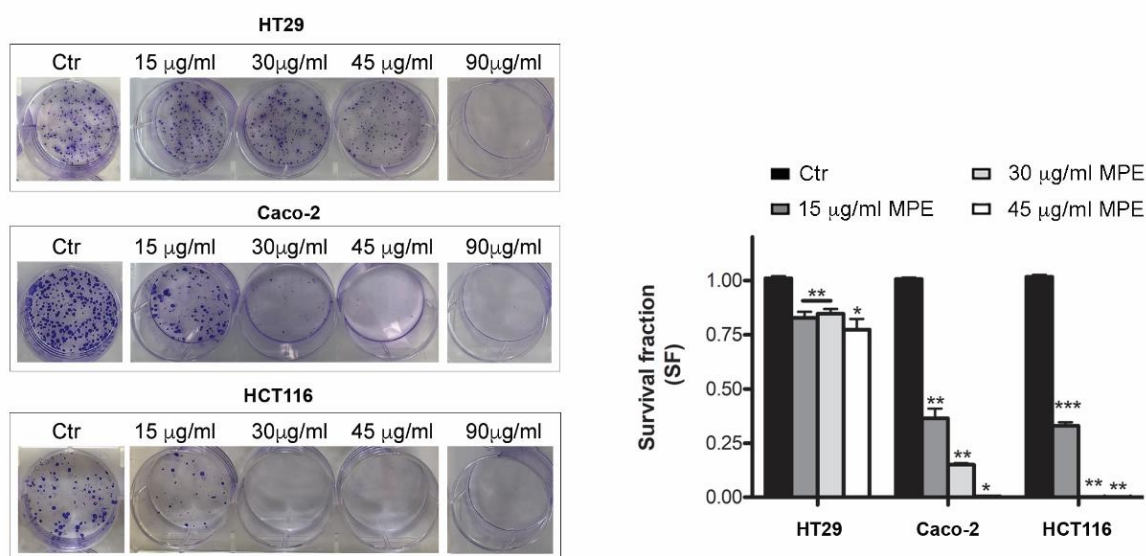


Figura 2. Effetti citotossici dell'MPE valutati mediante saggio clonogenico in cellule di carcinoma del colon. La capacità delle cellule di formare colonie, come riportato nei Materiali e Metodi, è stata valutata dopo 10 giorni. Si riporta l'immagine di un esperimento rappresentativo. Le piastre Petri dopo fissaggio delle cellule sono state colorate con cristal violetto. Nel pannello di destra, i risultati delle analisi statistiche dei saggi sono riportati come frazione di sopravvivenza (SF) del numero di colonie rispetto alla condizione controllo non trattata. Le differenze significative sono state invece calcolate mediante test *t* di Student (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo. I dati riportati sono espressi come media \pm SD di tre differenti esperimenti.

3. Valutazione dello stress ossidativo nelle cellule trattate con MPE

Dopo aver valutato gli effetti del composto sulla vitalità cellulare, è stato approfondito il possibile coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nel meccanismo d'azione del composto. Per tale motivo è stata effettuata l'analisi dei livelli dei ROS, monitorando l'abilità delle cellule ad ossidare il fluorocromo H₂DCFDA, una sonda adoperata come indicatore della produzione dei ROS a livello cellulare. Una analisi in time-course (Figura 3A) illustra come i livelli dei ROS incrementino rapidamente nelle cellule trattate con MPE, raggiungendo il picco massimo dopo 30 min-1 h in tutte e tre le linee di carcinoma del colon, con circa il 90% delle cellule che esibiscono una fluorescenza verde pronunciata, rilevabile mediante microscopia a fluorescenza o spettrofluorimetria. Successivamente, l'effetto si riduce al 35-40% a 24 h di trattamento. L'aggiunta di apocianina, un inibitore della NADPH ossidasi, riduce in modo marcato i livelli dei ROS ad 1 h di trattamento, facendo ipotizzare il coinvolgimento di questo sistema nella loro produzione. È inoltre interessante notare che l'aggiunta del NAC (N-Acetilcisteina), un noto antiossidante, è in grado di bloccare la produzione dei ROS dopo tempi brevi (30 minuti-2 h) (Figura 3A), ma non è più capace di inibire la citotossicità causata dal composto dopo lunghi tempi di trattamento (24-48 h) (Figura 3B). Questi dati confermano il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno nel meccanismo citotossico indotto dall'MPE già durante le prime fasi del trattamento.

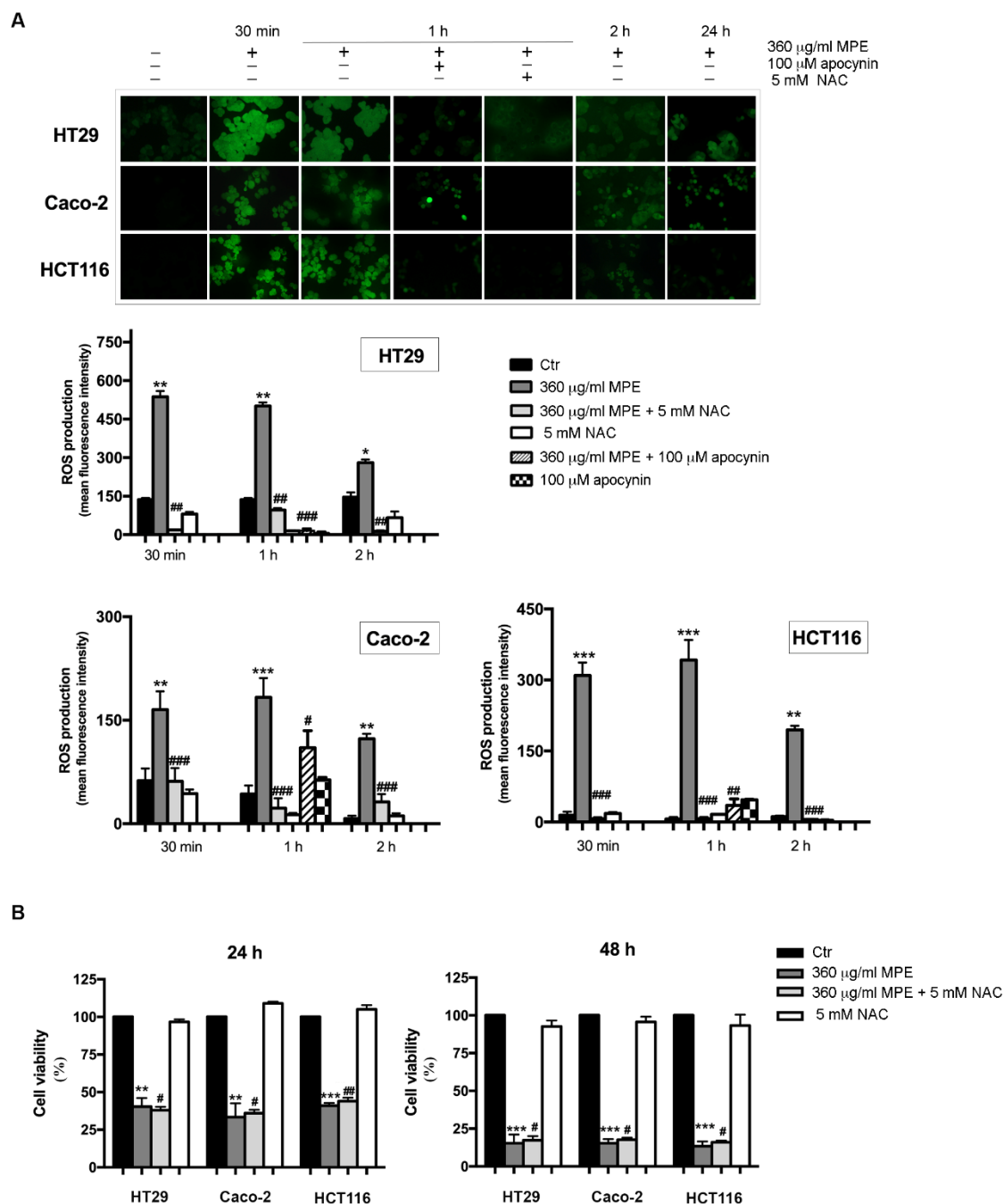


Figura 3. Il trattamento con MPE causa lo sviluppo di specie reattive dell'ossigeno (ROS). (A) Micrografia a fluorescenza che evidenzia lo sviluppo dei ROS dopo trattamento delle cellule di carcinoma del colon con MPE, osservato mediante filtro di fluoresceina isotiocianato (FITC) (pannello superiore). La fluorescenza è stata misurata adoperando uno spettrofluorimetro Varian ed i valori sono stati riportati come intensità di fluorescenza media (pannello inferiore). (B) Effetti citotossici dell'MPE sulle cellule di carcinoma del colon trattate in presenza o assenza di NAC 5mM. La vitalità cellulare è stata determinata tramite saggio MTT come riportato nei Materiali e Metodi. I dati presentati sono espressi come valore medio \pm SD. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo. (#) $p < 0.05$, (##) $p < 0.01$, (###) $p < 0.001$, rispetto al campione trattato con MPE.

Gli eventi osservati si accompagnano anche a cambiamenti nei livelli di proteine cellulari protagoniste della risposta cellulare allo stress. In una prima fase sono stati valutati i livelli di pERK 1/2, un membro della famiglia delle proteine chinasi attivate da mitogeni, che solitamente sono coinvolte nei meccanismi di proliferazione cellulare, apoptosi e stress cellulare [99]. È interessante notare che, in accordo con i dati riguardanti la produzione precoce dei ROS, l'incremento di pERK1/2 avviene già a tempi brevi di incubazione con l'MPE (1-8 h, Figura 4) e si protrae fino a 48 h (Figura 5), sebbene sia contrastato dall'aggiunta del NAC soltanto nelle prime fasi del trattamento (Figura 4).

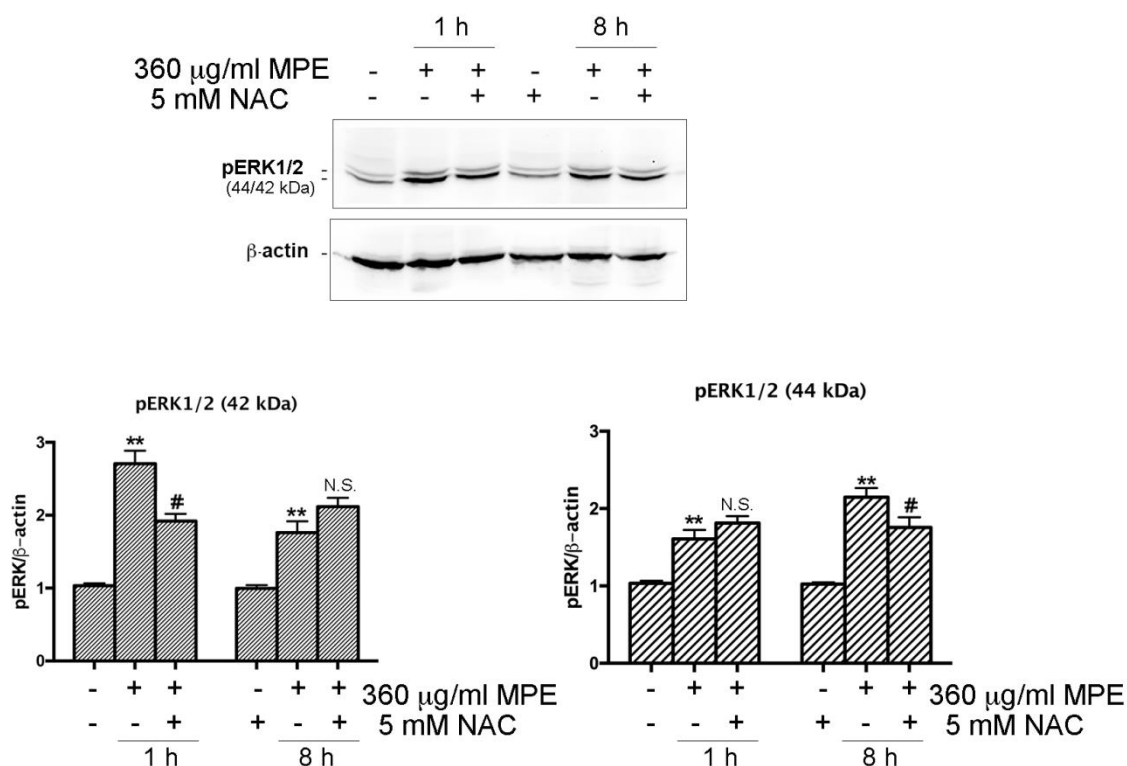


Figura 4. Il trattamento con MPE provoca un incremento dei livelli di una delle proteine protagoniste dello stress: pERK1/2. Le cellule HT29 sono state trattate con MPE per i tempi indicati in presenza o assenza di NAC 5mM. Infine, analisi di western blotting sono state condotte per studiare gli effetti dell'MPE sui livelli totali di pERK1/2 durante la prima fase del trattamento (1-8 h). Il blot della β -actina è stato riportato come controllo di un caricamento omogeneo. I risultati e gli istogrammi delle analisi densitometriche riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti e sono stati normalizzati alla β -actina. (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo. (#) $p < 0.05$ rispetto ai campioni trattati. N.S., non significativo rispetto alle cellule trattate con MPE.

Come riportato in Figura 5, esaminando i livelli di ERK1/2/pERK1/2 e di JNK/pJNK, il trattamento con MPE in tutte e tre le linee di carcinoma del colon induce un incremento dei livelli di pERK1/2 e di altre MAP chinasi coinvolte nello stress cellulare come pJNK, sebbene la sua variazione sia meno pronunciata rispetto a quella di pERK1/2. Non si assiste a variazioni significative delle forme non fosforilate delle proteine (ERK e JNK), eccetto per le Caco-2 in cui si osserva un aumento dei livelli di ERK.

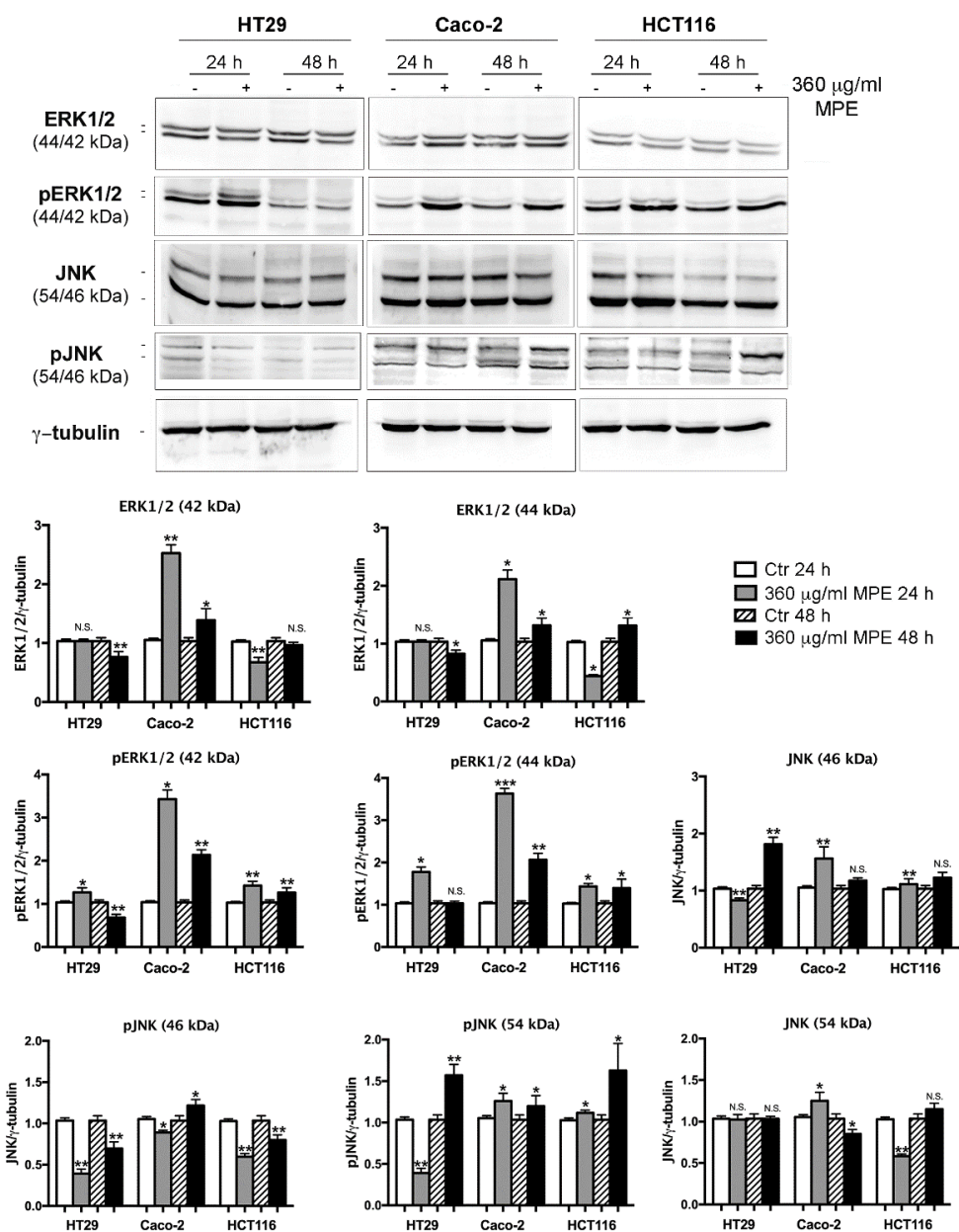


Figura 5. Il trattamento con MPE genera un incremento dei livelli di proteine protagoniste dello stress: pERK1/2 e pJNK. Le cellule di carcinoma del colon sono state trattate con MPE per i tempi indicati, successivamente sono state eseguite le analisi di western blotting adoperando anticorpi specifici. Il corretto e omogeneo caricamento è stato accertato con immunoblotting della γ -tubulina. Sono illustrati i blot e gli istogrammi delle analisi densitometriche rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo. N.S., non significativo.

Avendo osservato la significativa induzione di stress cellulare provocata dall'MPE, ci siamo chiesti se in seguito al trattamento venissero attivati eventi citoprotettivi come risposta allo stress. Per tale motivo, sono stati esaminati i livelli della catalasi, enzima che detossifica le cellule dal perossido di idrogeno. Come si evidenzia in Figura 6, nelle cellule HT29 trattate i livelli di catalasi rimangono sostanzialmente invariati, ma si assiste all'incremento di Nrf-2 (fattore di trascrizione nucleare eritroide-2), fattore di trascrizione che, quando fosforilato e attivo, promuove l'espressione di enzimi target antiossidanti come la catalasi ed anche MnSOD [100]. Queste attività enzimatiche rappresentano un importante meccanismo di difesa per le cellule che di solito viene impiegato per detossificarsi dal sovraccarico dei ROS ripristinando il bilancio redox cellulare [101]. Analisi di western blotting hanno confermato l'innalzamento dei livelli di Nrf-2 dopo 48 h di trattamento, e tale effetto si accompagna alla comparsa di una banda a minore mobilità elettroforetica, che corrisponde alla forma fosforilata e attiva del fattore di trascrizione (Figura 6). Nel complesso, questi risultati indicano che la genesi precoce dei ROS potrebbe svolgere un ruolo importante nell'azione citotossica dell'MPE promuovendo un danno ossidativo oltre all'incremento di pERK1/2 e di pJNK.

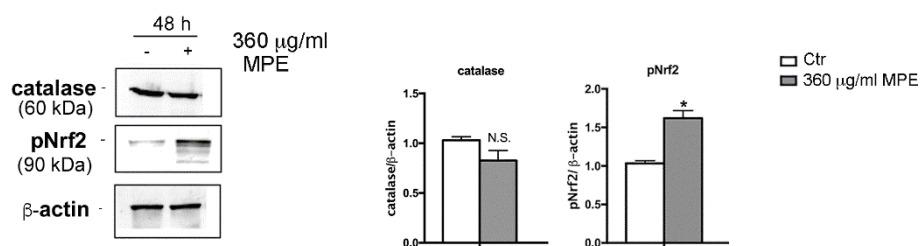


Figura 6. Il trattamento con MPE genera una risposta antiossidante. Le cellule di carcinoma HT29 sono state incubate con MPE per 48 h. Successivamente, sono state lisate e le proteine sono state sottoposte a western blotting adoperando anticorpi specifici per catalasi e pNrf2, come riportato nella sezione Materiali e Metodi. Il corretto caricamento è stato accertato dall'immunoblotting della β -actina. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (*) $p < 0.05$ rispetto al controllo. N.S., non significativo.

4. Il trattamento con MPE provoca diminuzione del contenuto di gruppi tiolici, incremento dei livelli di MnSOD e produzione dell'anione superossido a livello mitocondriale.

Per meglio definire l'azione antitumorale dell'estratto, sono stati intrapresi studi volti ad esplorare se l'MPE potesse influenzare la funzionalità del mitocondrio: la centrale energetica della cellula. A tale scopo ho focalizzato l'attenzione sull'analisi del sistema di bilancio redox delle cellule tumorali, ed in particolare sugli antiossidanti non-enzimatici

noti come tioli. È noto, infatti, che il mantenimento dello stato dei tioli, dato dal bilancio tioli/disolfuri, rappresenta uno dei più importanti scopi della cellula. I tioli totali - rappresentati dai tioli intracellulari ed extracellulari, oltre che dai tioli legati alle proteine - sono parte del sistema di protezione cellulare, utile per contrastare il danno ossidativo. Cambiamenti del loro status si associano infatti a patogenesi di disturbi associati allo stress [102]. A tale scopo, è stato valutato il contenuto di tioli liberi e proteici mediante il metodo di Ellman. Le cellule sono state trattate per diversi tempi (12, 24 e 48 h) in presenza di MPE. Analizzando poi il contenuto tiolico delle cellule trattate, è stato rilevato che l'estratto promuove una notevole riduzione sia dei gruppi tiolici liberi che di quelli proteici. Il decremento è chiaramente visibile in tutte e tre le linee di carcinoma del colon dopo 24 h di incubazione, e risulta ancora più pronunciato dopo 48 h di trattamento, tempo in cui il contenuto dei tioli raggiunge nelle cellule HCT116 un valore molto vicino allo zero (Figura 7).

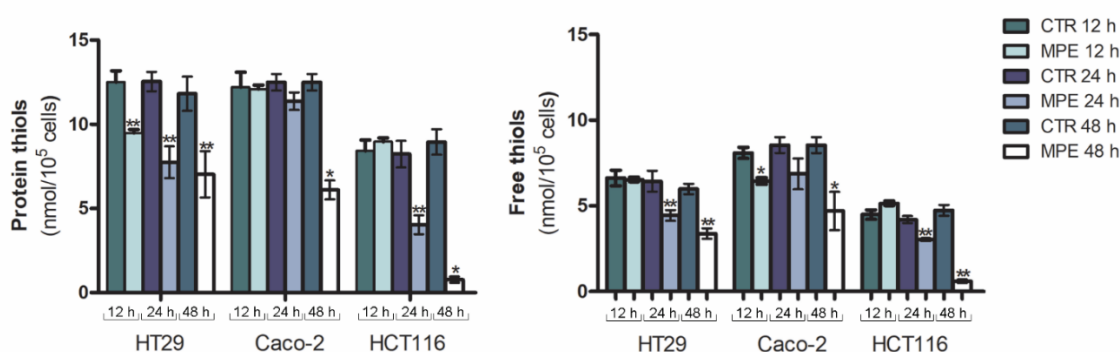


Figura 7. Il trattamento con MPE favorisce la riduzione del contenuto di gruppo tiolici. Per questi esperimenti, 10^6 cellule/condizione sono state incubate per diversi tempi (12,24,48 h) con 360 $\mu\text{g/ml}$ di MPE, e successivamente è stata valutata la quantità di gruppi tiolici liberi e dei tioli proteici, come riportato nella sezione dei Materiali e Metodi. I valori, espressi come $\text{nmol}/10^5$ cellule sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative sono state calcolate mediante test *t* di Student (*) $p < 0.05$, e (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo.

Come si evidenzia in Figura 8A, la diminuzione del contenuto di gruppi tiolici che si ottiene come risposta cellulare allo stress, si accompagna, dopo solo 12 h di trattamento, all'incremento dell'enzima MnSOD.

Per valutare se la caduta nel contenuto dei gruppi tiolici possa essere attribuita a danno mitocondriale mediato da eventi di stress, le cellule sono state incubate con la sonda fluorescente specifica mitocondriale MitoSOX Red. Come illustrato in Figura 8B, l'esposizione delle cellule all'estratto promuove un immediato sviluppo dell'anione superossido, che raggiunge il suo massimo effetto dopo appena 30 minuti di trattamento.

Questi risultati sono in accordo con i dati precedentemente illustrati (Figura 3) che mostrano una precoce produzione dei ROS nelle cellule di carcinoma del colon esposte al trattamento con MPE.

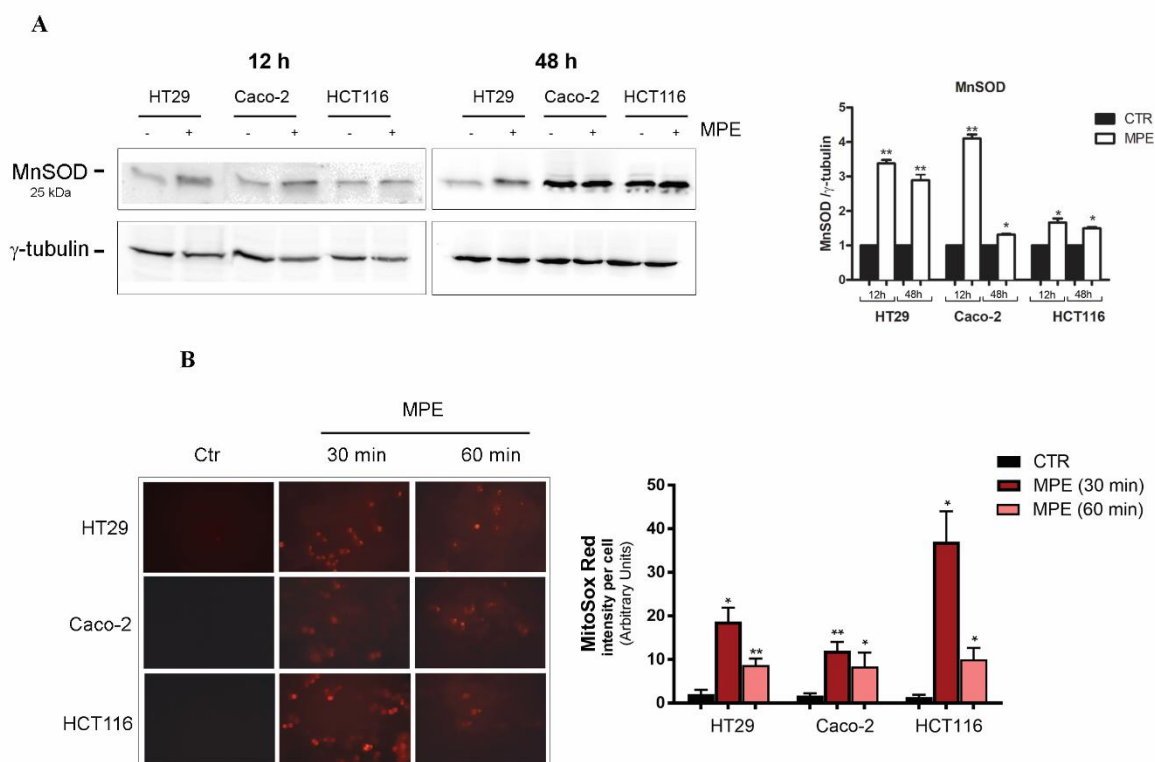


Figura 8. Valutazione degli effetti a livello mitocondriale, in cellule di carcinoma del colon trattate con MPE. (A) Analisi di western blotting riportano la proteina MnSOD in cellule di carcinoma del colon trattate con MPE alla concentrazione 360 μ g/ml per 12 h e 48 h. Le analisi sono state eseguite come riportato nei Materiali e Metodi. Il caricamento omogeneo delle proteine è stato confermato dall'immunoblotting per la γ -tubulina. Le immagini e gli istogrammi delle analisi densitometriche in figura sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo. (B) Micrografia a fluorescenza che mostra la comparsa dell'anione superossido mitocondriale nelle cellule di carcinoma del colon incubate in presenza o in assenza di MPE 360 μ g/ml per i tempi sopra riportati. Il grafico a barre nella parte destra del pannello riporta le analisi quantitative del contenuto di O_2^- nelle cellule positive al MitoSOX-Red. Le immagini sono state acquisite mediante microscopio a fluorescenza Leica adoperando un filtro rodamina. (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo.

5. L'MPE provoca dissipazione del potenziale di membrana nelle cellule di carcinoma del colon

Dopo aver studiato gli effetti del trattamento dell'MPE sul bilancio redox cellulare e sulla produzione dell'anione superossido mitocondriale, è stato approfondito l'effetto citotossico dell'estratto sulla funzionalità mitocondriale. A tale proposito, è stata valutata la dissipazione del potenziale di membrana ($\Delta\psi_m$) sulle cellule di carcinoma del colon mediante impiego di JC-1, una sonda fluorogena permeabile alla membrana mitocondriale

comunemente adoperata per valutarne l'integrità. Come mostrato in Figura 9A, i dati evidenziano che rispetto alla condizione controllo in cui le cellule emettono fluorescenza rossa, le cellule trattate sono caratterizzate dall'emissione di una forte fluorescenza verde, indicativa della dissipazione del potenziale di membrana. È stato poi calcolato il rapporto cellule rosse/verdi per avvalorare i dati ottenuti. Tale rapporto diminuisce nelle cellule trattate con MPE, dove si osserva un decremento del 74% nelle cellule HT29, del 52% nelle Caco-2 e del 56% nelle HCT116.

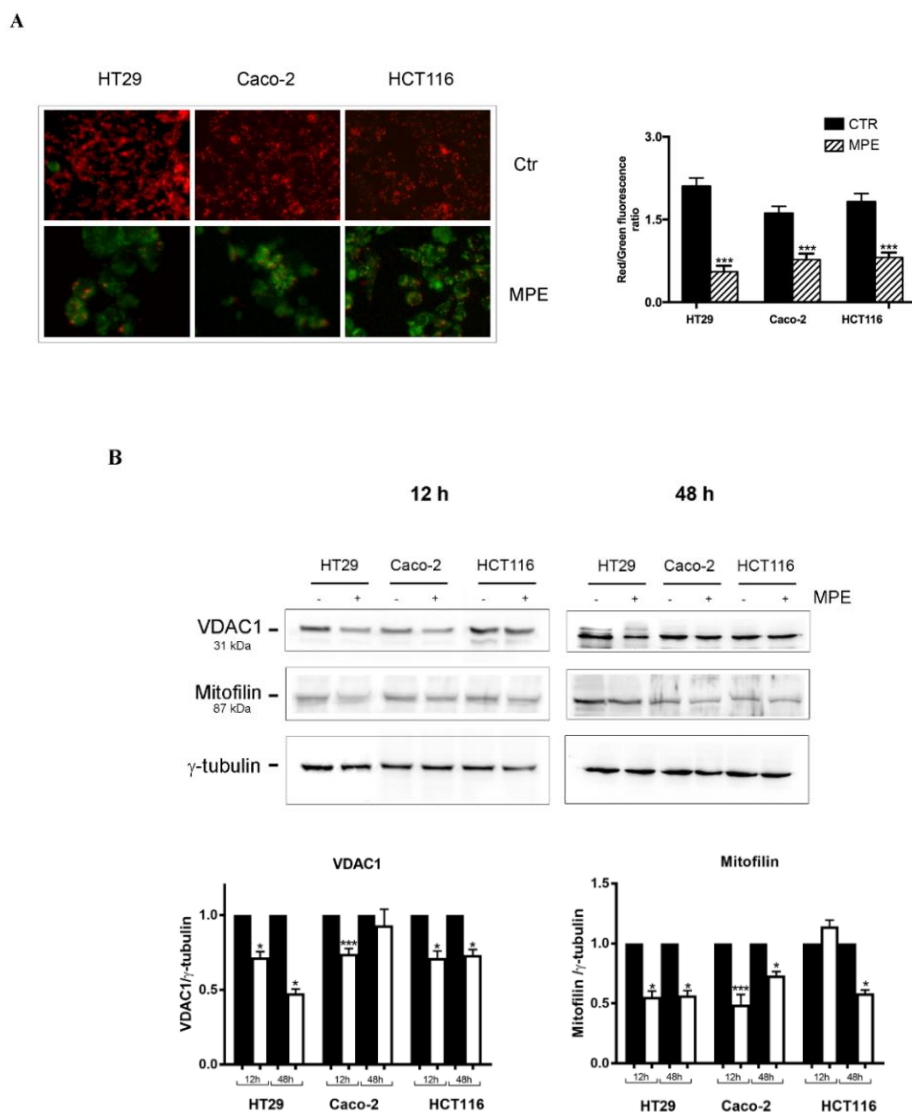


Figura 9. Il trattamento con MPE causa dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) e variazioni nel livello di proteine mitocondriali. (A) Colorazione con JC-1 di cellule di carcinoma del colon HT29, Caco-2 e HCT116 trattate per 48 h con MPE 360 $\mu\text{g/ml}$. Si osserva fluorescenza rossa, indicativa di un elevato potenziale di membrana in quasi tutte le cellule controllo (quando il $\Delta\psi_m$ è preservato si formano gli aggregati del JC-1); mentre si osserva fluorescenza verde, indicativa di un basso potenziale di membrana, nelle cellule di carcinoma del colon trattate con MPE (la depolarizzazione favorisce la presenza di monomeri di JC-1). Le immagini sono state ottenute come riportato nella sezione Materiali e Metodi, e acquisite mediante ingrandimento originale 200X. Il grafico a barre riporta la quantificazione (in percentuale) delle cellule fluorescenti verdi e rosse. I dati sono riportati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo. **(B)** Analisi di western blotting di proteine localizzate a livello

mitocondriale. Le cellule sono state incubate con il composto per 12 e 48 h. Il corretto caricamento è stato verificato dall'immunoblotting della γ -tubulina. Le analisi densitometriche riportate sono la media dei risultati ottenuti da tre esperimenti separati che sono stati normalizzati alla γ -tubulina. (*) $p < 0.05$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo.

Il danno mitocondriale è stato inoltre valutato mediante analisi condotte sui livelli di alcune delle proteine coinvolte nel mantenimento dell'integrità mitocondriale, come VDAC1 e mitofillina. Come è già noto in letteratura, VDAC1 è una proteina mitocondriale multifunzionale, la quale forma un canale ionico nella membrana mitocondriale esterna, utile per monitorare lo scambio di metaboliti tra mitocondri e citosol [103]. Come si evidenzia in Figura 9B, la caduta del potenziale di membrana mitocondriale si associa ad una diminuzione di VDAC1, che, dopo sole 12 ore di trattamento si rivela più consistente nelle cellule HT29 e Caco-2 rispetto alle cellule HCT116. Di notevole interesse è anche l'effetto dell'MPE sulla mitofillina, una proteina che agisce "rimodellando" i mitocondri. La sua localizzazione nella membrana mitocondriale interna (MMI) favorisce la regolazione della morfologia delle creste mitocondriali e ne dirige il rimodellamento facilitando la giunzione delle creste nella MMI [104]. Negli esperimenti svolti, i livelli della proteina mitofillina si riducono nelle cellule trattate con MPE rispetto alle cellule controllo, suggerendo che l'effetto citotossico di questa frazione del mango, in combinazione con il decremento di VDAC1 e la produzione di anione superossido, sono da attribuire a danno a livello mitocondriale.

6. Il trattamento con MPE influenza i livelli di alcuni membri della famiglia antiapoptotica Bcl-2

Per meglio comprendere il probabile meccanismo citotossico promosso dall'MPE sulle cellule di carcinoma del colon, sono stati investigati gli effetti dell'estratto sui livelli dei membri della famiglia Bcl-2. Come illustrato in Figura 10, il trattamento con MPE riduce il contenuto dei livelli di entrambe le proteine Bcl-2 e Bcl-XL in tutte e tre le linee di carcinoma del colon. Un effetto particolarmente interessante è stato quello osservato sui livelli di Mcl-1, membro della famiglia Bcl-2 con ruolo antiapoptotico, di cui l'overespressione e l'amplificazione rappresentano eventi che si verificano frequentemente nel cancro. Alcuni studi hanno enfatizzato il suo ruolo come protagonista fondamentale nella stabilizzazione di funzioni mitocondriali quali: la generazione dell'ATP, la genesi del potenziale di membrana mitocondriale ed il ritmo di consumo dell'ossigeno. In seguito ad analisi di western blotting è stato osservato che le cellule di carcinoma del colon, ed in particolare Caco-2 e HCT116, esprimono elevati livelli della proteina Mcl-1, che si

riducono drammaticamente in seguito a trattamento con MPE, in particolare a 48 h. L'effetto osservato è in accordo con quanto riportato da Tong et al., che suggerisce un ruolo essenziale di Mcl-1 nel controllo della resistenza delle cellule di carcinoma del colon esposte a trattamenti chemioterapici mirati [105].

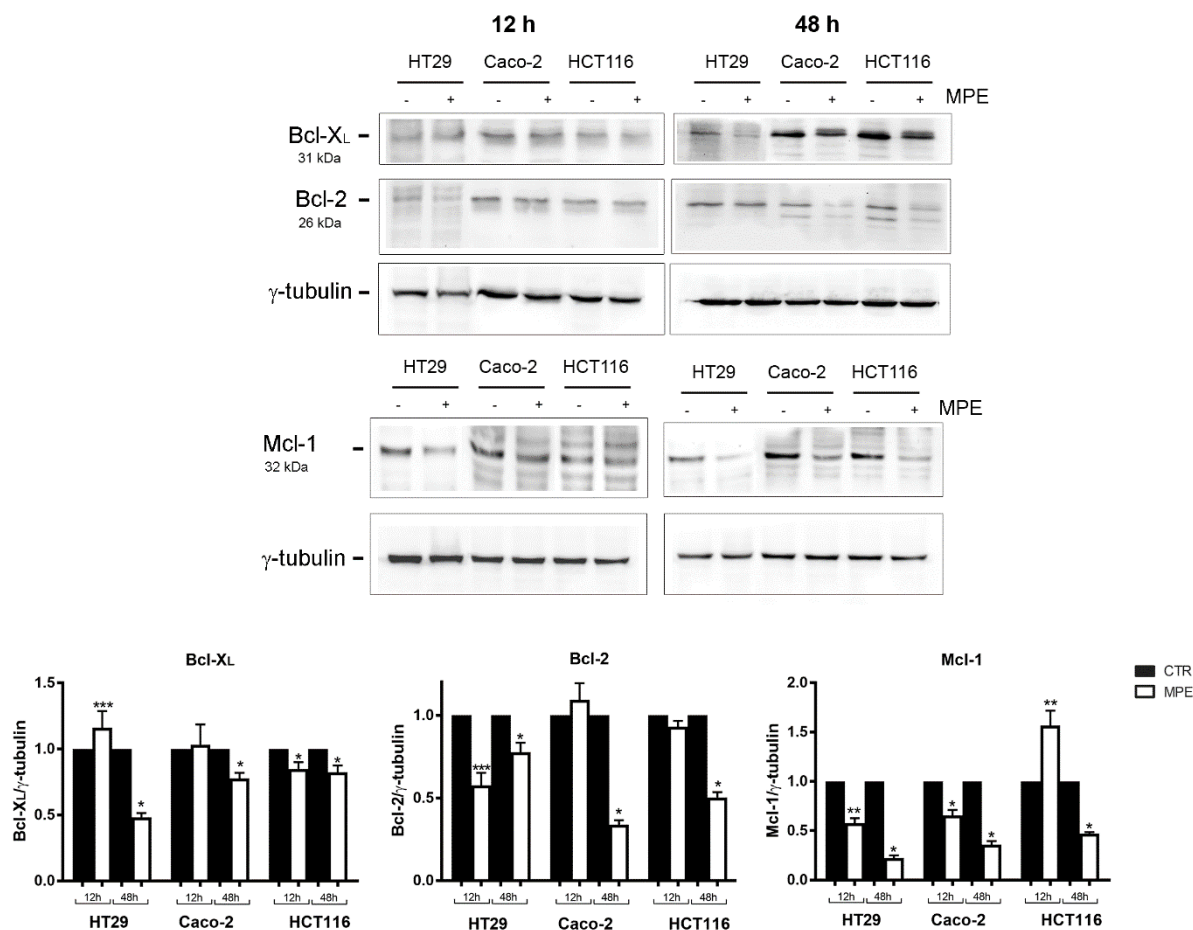


Figura 10. Valutazione dei livelli dei membri antiapoptotici della famiglia Bcl-2 in seguito a trattamento con MPE. Dopo 12 e 48 h di incubazione in presenza o assenza di MPE 360 µg/ml, le linee cellulari di carcinoma del colon (HT29, Caco-2 e HCT116) sono state lisate e le proteine sono state analizzate mediante western blot, adoperando anticorpi specifici per le proteine di interesse. L'omogeneità del contenuto delle proteine nei singoli pozzetti è stata accertata on l'analisi della γ-tubulina. Le analisi densitometriche sono state ottenute mediante il software Quantity One. Per ogni set di dati, i valori riportati sono il risultato di tre esperimenti indipendenti, ciascuno dei quali è stato normalizzato in riferimento alla γ-tubulina. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo.

7. Il danno mitocondriale mediato dall'MPE provoca il rilascio di proteine mitocondriali apoptogeniche: citocromo C e AIF

Al fine di valutare se il danno mitocondriale causato dall'MPE potesse promuovere il rilascio dal mitocondrio dei fattori apoptogenici, è stata analizzata la distribuzione del citocromo C e di AIF nelle frazioni citosoliche e mitocondriali. Come riportato nella Figura 11, nel citosol di tutte e tre le linee di carcinoma del colon esposte a trattamento con

MPE, si osserva un incremento di 3-4 volte del contenuto di citocromo C, e tale effetto si esplica in concomitanza alla sua riduzione nella frazione mitocondriale. Il risultato appare maggiormente evidente nelle cellule Caco-2 e HCT116. È inoltre interessante notare che, nelle stesse condizioni sperimentali, anche i livelli della proteina AIF risultano incrementati nella frazione citosolica, indicando pertanto che l'MPE induce il rilascio dei fattori mitocondriali apoptogenici, probabilmente come conseguenza della dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale.

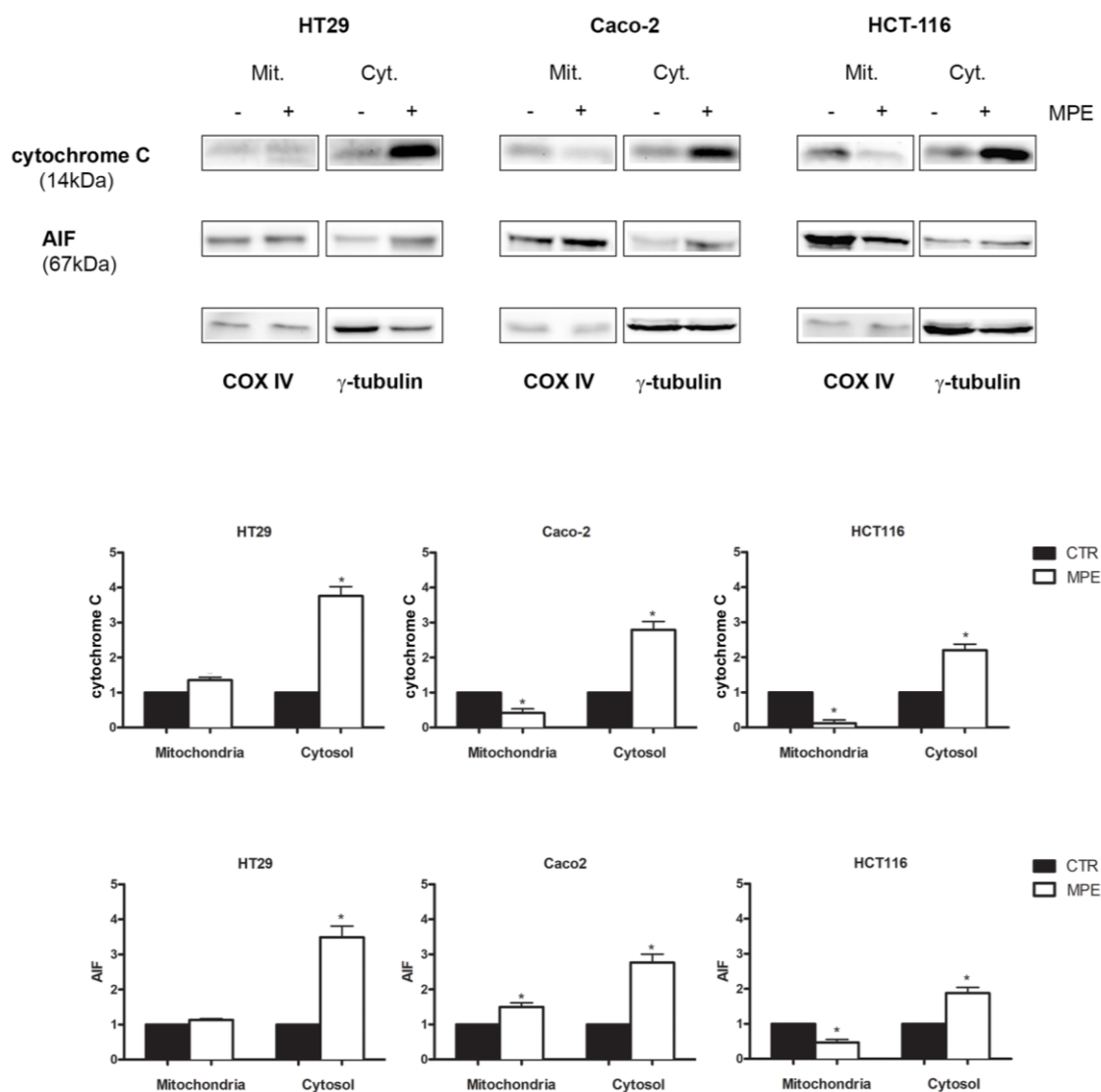


Figura 11. L'MPE esplica la sua attività citotossica mediante il rilascio di fattori apoptogenici. Le cellule di carcinoma del colon HT29, Caco-2 e HCT116 (1.5×10^7) sono state incubate con MPE per 48 h e successivamente sono state lisate e sottoposte a frazionamento subcellulare come descritto nei Materiali e Metodi. 30 μ g di proteine di ogni frazione sono stati caricati in un gel di poliaccrilammide e sottoposte ad analisi di western blot. Come controlli di un caricamento omogeneo per le frazioni mitocondriali e citosoliche sono state impiegate rispettivamente le proteine COX IV e γ -tubulina. (*) $p < 0.05$ rispetto al controllo.

8. L'MPE provoca frammentazione del DNA e morte cellulare per apoptosi in cellule di carcinoma del colon

Successivamente, è stato valutato se l'effetto citotossico e il danno ossidativo indotti dall'MPE si accompagnassero a cambiamenti nell'integrità del DNA con attivazione di morte cellulare per apoptosi. Come si nota dal contenuto di DNA negli istogrammi riportati in Figura 12, il trattamento con MPE incide sulla distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare, provocando un notevole accumulo di cellule nella fase Sub G0-G1, ossia quelle cellule che presentano DNA frammentato, associato a morte cellulare per apoptosi.

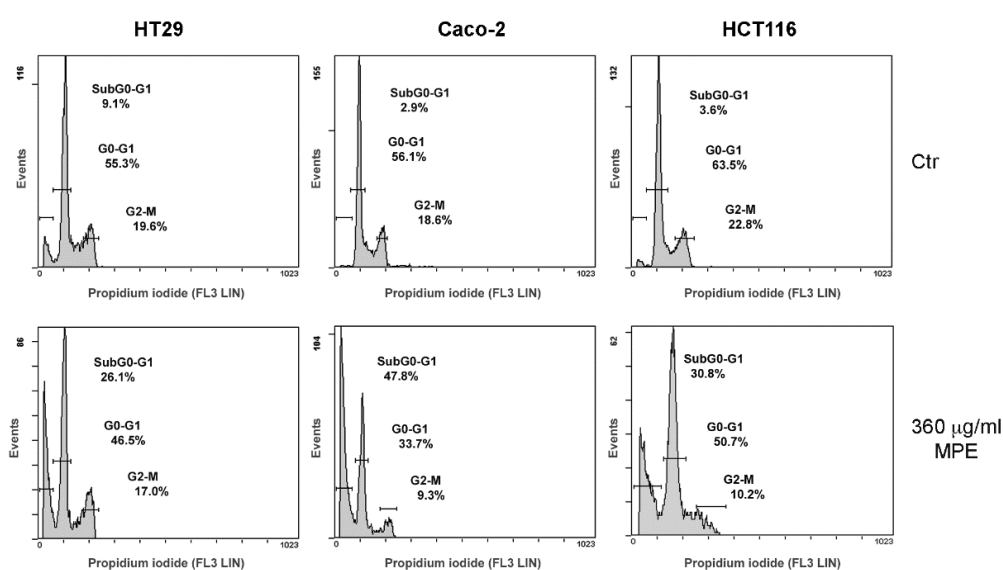


Figura 12. Effetti dell'MPE sulla distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Analisi citofluorimetriche della distribuzione delle cellule HT29, Caco-2 e HCT116 nelle fasi del ciclo cellulare in seguito ad incubazione con MPE per 48 h.

Questi dati sono stati inoltre supportati dalla doppia colorazione con arancio di acridina/etidio bromuro, la quale è in grado di identificare i cambiamenti morfologici associati a morte apoptotica [106]. I risultati mostrano che le cellule trattate con MPE sono caratterizzate dalla presenza di cellule con nuclei colorati in giallo-verde (apoptosi precoce) o cellule con nuclei condensati colorati in arancione (apoptosi tardiva). Le cellule vive, non trattate, presentano invece una colorazione verde diffusa (Figura 13).

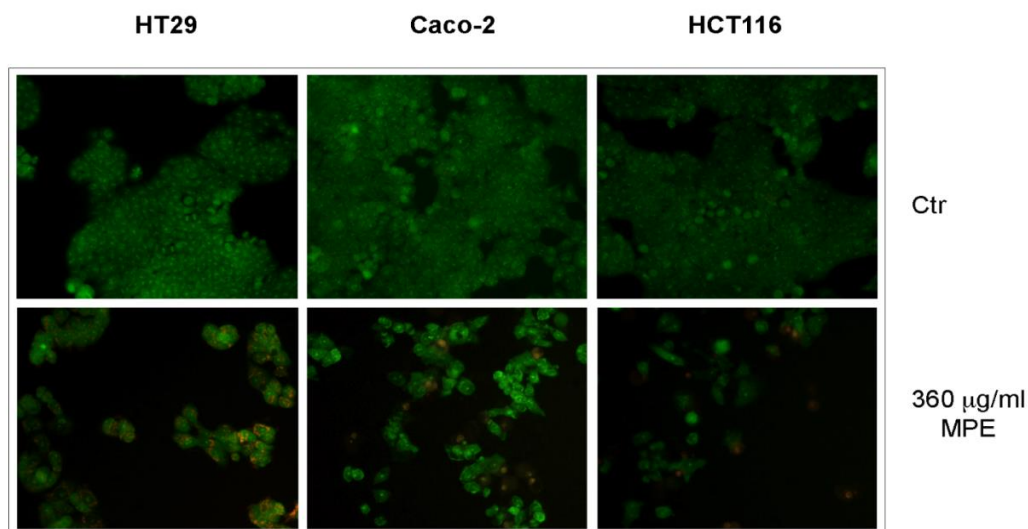


Figura 13. Il trattamento con MPE induce morte cellulare apoptotica in cellule di carcinoma del colon. Le cellule sono state trattate con MPE per 48 h e successivamente esposte alla doppia colorazione con arancio di acridina/etidio bromuro come riportato nei Materiali e Metodi. Le cellule apoptotiche sono caratterizzate da una colorazione che presenta spot giallo-verdi (apoptosi precoce); oppure si presentano con spot di colore arancio concentrati a livello dei nuclei (apoptosi tardiva) rispetto alla fluorescenza verde che è invece indicativa di cellule vive. Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza Leica (ingrandimento originale 200X) e processate adoperando il software Leica Q Fluoro.

L'apoptosi indotta dal trattamento è stata inoltre confermata dal decremento nei livelli delle pro-caspasi 9 e pro-caspasi 3, espressione indiretta della loro attivazione, e dalla frammentazione di PARP1, noto substrato della caspasi 3 (Figura 14).

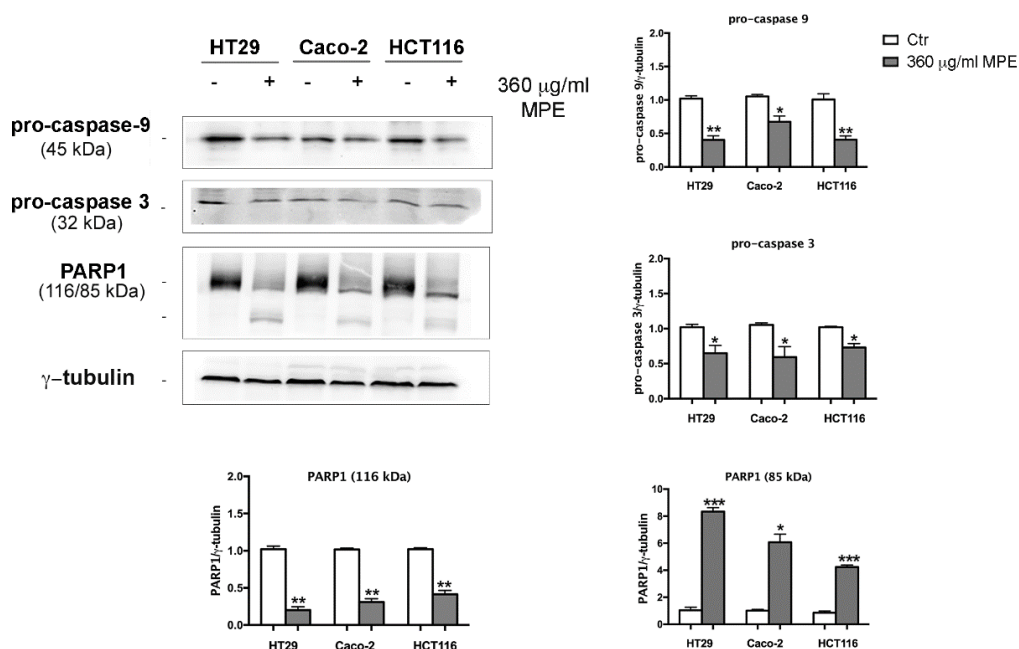


Figura 14. Effetti dell'MPE sull'attivazione delle caspasi e sulla frammentazione della PARP1. Le analisi di western blotting di pro-caspasi 9, pro-caspasi 3 e PARP1 sono state eseguite come riportato in Materiali e Metodi. Il blot della γ -tubulina è stato riportato come controllo di caricamento. Le immagini e gli istogrammi delle analisi densitometriche in figura sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo.

9. La frammentazione del DNA e la morte cellulare per apoptosi indotta dall'MPE è correlata al danno genotossico mediato da γ H2AX

Per dimostrare che l'effetto dell'MPE è capace di indurre danno al DNA, le cellule sono state colorate con Hoechst 33342 vitale, una sonda specifica che, così come indicato da Kelly [107], permette l'identificazione di cellule che presentano frammentazione o condensazione cromatinica, tipici eventi di danno al DNA. In Figura 15A, è possibile osservare che le cellule non trattate mostrano una debole colorazione blu diffusa, data dalla sonda; al contrario, quando tutte e tre le linee cellulari sono incubate con MPE, si nota la presenza di una intensa colorazione blu brillante, indice di condensazione cromatinica e DNA frammentato.

Sono stati quindi studiati gli eventi molecolari responsabili del danno al DNA, del blocco della proliferazione cellulare e dello stress ossidativo. Primariamente, abbiamo analizzato l'istone H2AX fosforilato in corrispondenza della serina 139, noto come γ H2AX. Questa proteina, quando viene attivata per fosforilazione dalla serina/treonina chinasi ATM [108], rappresenta un efficiente sistema di riconoscimento e riparo della rottura della doppia elica del DNA [109]. Il pannello B della Figura 15 mostra che, in tutte e tre le linee di carcinoma del colon, il trattamento con MPE induce un notevole incremento sia dei livelli di γ H2AX che della proteina fosforilata ATM (pATM), suggerendo il coinvolgimento di questo sistema di riparo in seguito alla rottura del DNA. D'altra parte, non è da escludere il coinvolgimento delle proteine da stress con l'incremento di γ H2AX.

Inoltre, il danno al DNA che interessa le cellule Caco-2 e HCT116, si accompagna anche ad un incremento dei livelli di p53. Questo effetto non si osserva nelle cellule HT29, che esprimono una forma mutata di questa proteina [110-112].

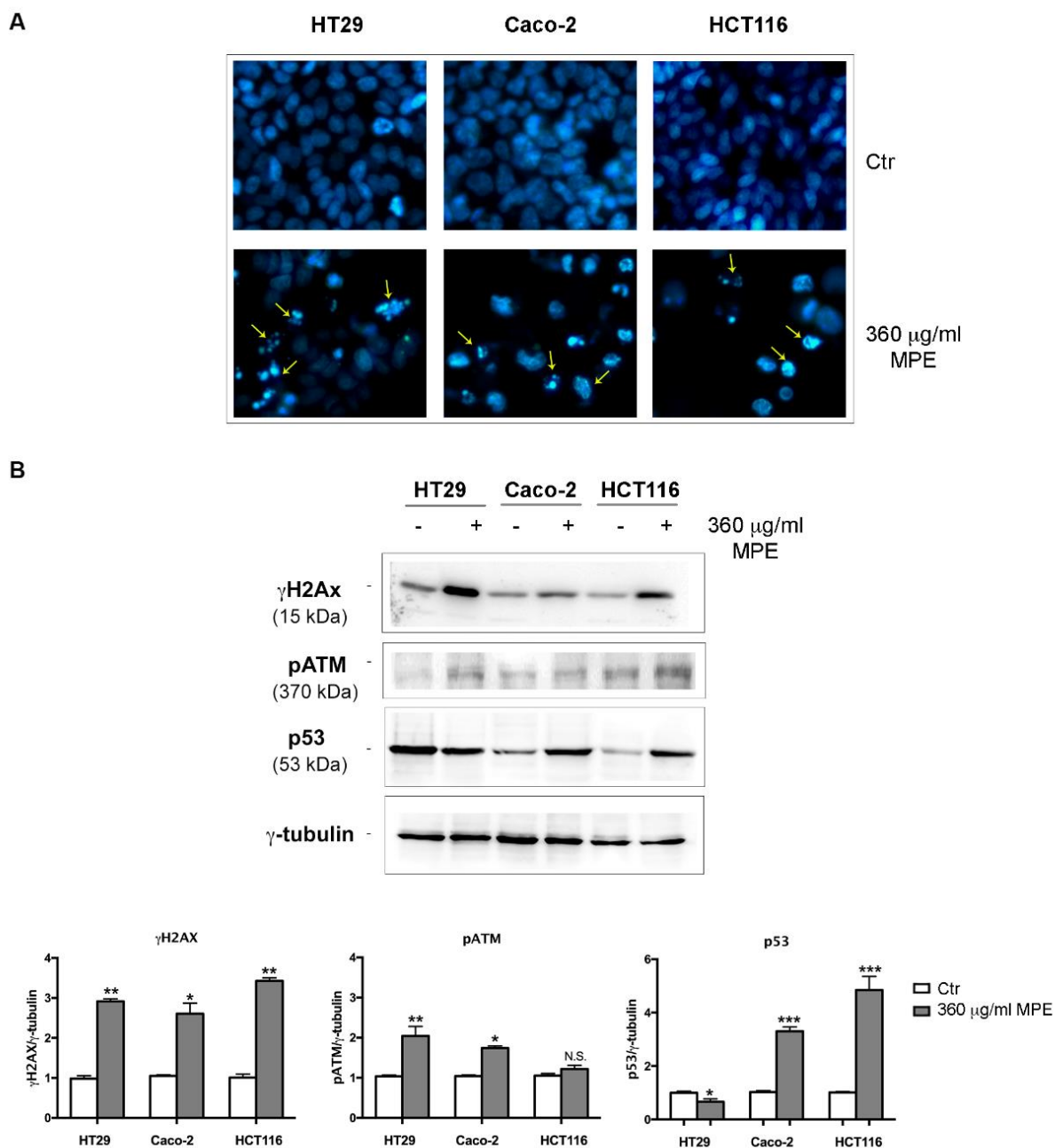


Figura 15. Effetti dell'MPE sul danno al DNA. (A) L'effetto dell'MPE sul danno al DNA è stato valutato adoperando la colorazione con Hoechst 33342 nelle cellule di carcinoma del colon incubate con MPE per 48 h. Le immagini (ingrandimento originale 400X) sono state acquisite con filtro 4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) tramite un microscopio a fluorescenza invertito e con software Leica Q Fluoro. Le frecce gialle indicano la cromatina condensata o frammentata. (B) L'incubazione con MPE provoca la fosforilazione di entrambe le proteine H2AX (γ H2AX) e ATM (pATM) e l'incremento di p53. Tutte le linee cellulari (HT29, Caco-2 e HCT116) sono state trattate per 48 h in presenza di 360 µg/ml di MPE. In seguito, i lisati cellulari sono stati sottoposti a western blotting adoperando gli anticorpi diretti verso le proteine di interesse, come riportato in Materiali e Metodi. Il corretto caricamento è stato accertato dall'immunoblotting della γ -tubulina. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo. N.S., non significativo.

Come mostrato in Figura 16, l'incremento di γ H2AX avviene già precocemente ad 1-8 h di incubazione con l'MPE, suggerendo che il reclutamento di questa proteina avvenga già durante le prime fasi del trattamento ed in concomitanza con l'aumento delle specie reattive dell'ossigeno. In linea con questa osservazione, l'aggiunta del NAC, in cotrattamento con l'MPE, sopprime completamente la fosforilazione di γ H2AX durante le prime fasi di esposizione al trattamento, effetto che però scompare per tempi più lunghi di trattamento (8 h).

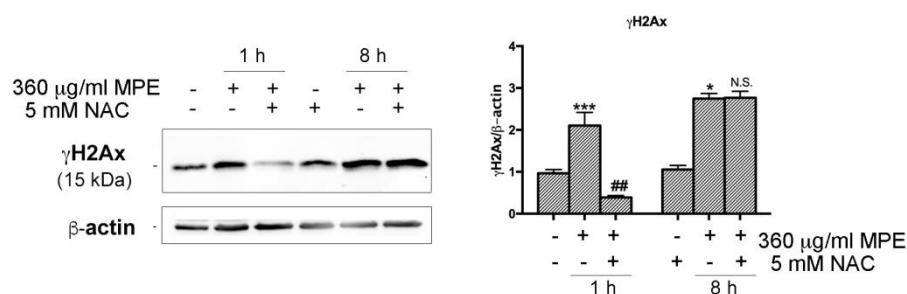


Figura 16. L'attivazione di γ -H2AX indotta dal trattamento con MPE è mediato da stress ossidativo. Le cellule sono state trattate per i tempi indicati in presenza o in assenza di NAC. Infine, sono state effettuate analisi di western blotting per studiare gli effetti del trattamento sui livelli totali di γ -H2AX. La γ -tubulina è stata riportata come controllo di un caricamento omogeneo. I risultati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (*) $p < 0.05$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo. (##) $p < 0.01$ rispetto alle cellule trattate con MPE. N.S., non significativo rispetto alle cellule trattate con MPE.

10. L'analisi HPLC-ESI-QTOF-MS rivela la composizione dell'estratto di esocarpo di Mango (MPE)

I dati finora ottenuti hanno messo in luce che l'estratto di esocarpo di *M. indica* possiede effetti antiproliferativi e citotossici, che, oltre a causare danno al DNA e stress ossidativo cellulare, indirizzano le cellule a morte cellulare per apoptosi dipendente dal mitocondrio: la centrale energetica della cellula. Il passo successivo è stato quello di analizzare la composizione chimica di questa porzione del frutto, al fine di conoscere ed eventualmente studiare gli effetti delle singole componenti.

La caratterizzazione e la determinazione quantitativa delle componenti dell'estratto di esocarpo di *M. indica*, è stata condotta in collaborazione con il Prof. Palumbo Piccionello e la Prof.ssa Maggio della Sezione di Chimica del Dipartimento Stebicef mediante HPLC/MS. Come indicato nella Tabella II ed in Figura 17, l'analisi ha identificato 16 composti polari raggruppabili in acidi organici, gallati, gallotannini e derivati di xantoni e di benzofenoni. Tra gli acidi organici individuati vi sono: l'acido chinico (picco 2, min 6.70, m/z 191.0562), l'acido citrico (picco 6, min 8.39, m/z 191.0198) e l'acido gallico

(picco 7, min 8.63, m/z 169.0141). La presenza di tali composti è in accordo con quanto presente in letteratura circa la composizione dell'esocarpo di mango [113]. Sono stati evidenziati, inoltre, diversi composti appartenenti alla famiglia dei gallati e dei gallotannini quali il glucosilgallato (picco 3, min 7, m/z 331.0673), l'acido digallico (picco 11, min 25.46, m/z 321.0255), il tetragalloil glucosio (picco 13, min 26.73, m/z 787.0998), il metilgallato (picco 14, min 26.36, m/z 183.0301), il pentagalloil glucosio (picco 15, min 26.73, m/z 939.1100) e il metil-digallato estere (picco 16, min 29.68, m/z 335.0411). Sono stati anche riconosciuti tre O-glucosidi derivati dal benzofenone maclurin: maclurin mono-O-galloil-glucoside (picco 8, min 24.74, m/z 575.1041), l'acido digallico (picco 11, min 25.46, m/z 321.0255) e il maclurin tri-O-galloil-glucoside (picco 12, min 26.21, m/z 879.1253).

Tramite l'utilizzo di uno standard apposito, è stata identificata la mangiferina (picco 9, min 25.01, m/z 421.0776) appartenente alla classe degli xantoni.

Infine, è stata rilevata la presenza dell'acido lepidimoico (picco 5, min 7.70, m/z 965.2614), recentemente considerato sostanza allelopatica con potente attività stimolante per la crescita di altre specie di piante [114]. Questo composto non era fino ad adesso mai stato identificato nel frutto del mango.

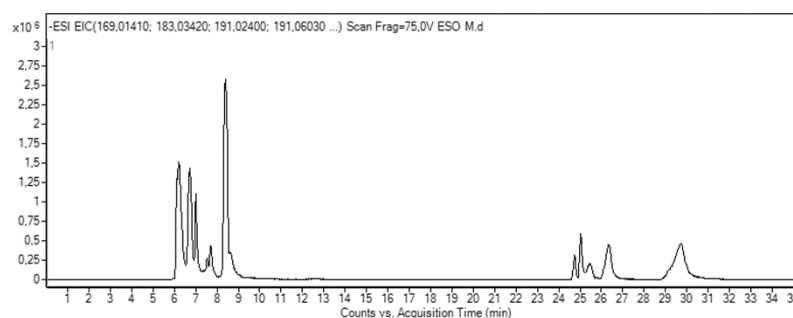


Figura 17. Rappresentazione grafica del cromatogramma ottenuto analizzando la composizione di MPE tramite cromatografia liquida ad alta prestazione con ionizzazione a elettrospray e quadrupolo-TOF (HPLC/ESI/Q-TOF) come descritto nei Materiali e Metodi. Il cromatogramma presenta sull'asse delle ordinate il TIC (Total Ion Count) e sull'asse delle ascisse il tempo di ritenzione. I picchi ottenuti sono stati analizzati tramite spettrometria di massa ed i fitochimici riscontrati sono stati riportati nella tabella sovrastante indicando il nome del composto, il tempo di ritenzione, la massa teorica, la massa sperimentale ed il peso molecolare. Di alcuni composti è, inoltre, indicata la quantità in mg/100 g di MPE stabilita tramite l'utilizzo di curve di taratura a concentrazione nota.

La Tabella II mostra la quantificazione di composti polari liberi nell'MPE, espressi come mg/100 g di peso secco, ed è stata ottenuta tramite l'utilizzo di curve di taratura. Dalla quantificazione complessiva, è emerso che i composti più abbondanti sono il metil-digallato estere (487.15 mg/100 g) e il metilgallato (225.87 mg/100 g).

Compound		RT (min)	ESI- [M-H] ⁻ (m/z)		Molecular Formula	mg/100g
			<i>Teor.</i>	<i>Exp.</i>		
1	Disaccaride	6.22	341.1089 [M-H] ⁻	341.1090 [M-H] ⁻	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	ND ^a
			377.0856 [M+Cl] ⁻	377.0857 [M+Cl] ⁻		
			387.1144 [M+FA] ⁻	387.1145 [M+FA] ⁻		
2	Quinic acid	6.70	191.0561 [M-H] ⁻	191.0562 [M-H] ⁻	C ₇ H ₁₂ O ₆	ND ^a
3	Glucosyl gallate	7.00	331.0671 [M-H] ⁻	331.0673 [M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	108.14
4	Gluconolactone	7.53	223.0459 [M+FA] ⁻	223.0460 [M+FA] ⁻	C ₆ H ₁₀ O ₆	ND ^a
5	Lepidimoic Acid	7.70	965.2627 [3M-H] ⁻	965.2614 [3M-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₄ O ₃₀	ND ^a
6	Citric acid	8.39	191.0197 [M-H] ⁻	191.0198 [M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	ND ^a
7	Gallic acid	8.63	169.0142 [M-H] ⁻	169.0141 [M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	118.57
8	Maclurin mono-O-galloyl-glucoside	24.74	575.1042 [M-H] ⁻	575.1041 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₅	72.03
9	Mangiferin	25.01	421.0776 [M-H] ⁻	421.0776 [M-H] ⁻	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	2.81
10	Maclurin di-O-galloyl glucoside	25.34	727.1152 [M-H] ⁻	727.1145 [M-H] ⁻	C ₃₃ H ₂₈ O ₁₉	20.21
11	Digallic acid	25.46	321.0252 [M-H] ⁻	321.0255 [M-H] ⁻	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	Trace
12	Maclurin tri-O-galloyl-glucoside	26.21	879.1262 [M-H] ⁻	879.1253 [M-H] ⁻	C ₄₀ H ₃₂ O ₂₃	6.05
13	Tetragalloyl glucose	26.31	787.0999 [M-H] ⁻	787.0998 [M-H] ⁻	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	4.88
14	Methylgallate	26.36	183.0299 [M-H] ⁻	183.0301 [M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₅	225.87
15	Pentagalloyl glucose	26.73	939.1109 [M-H] ⁻	939.1100 [M-H] ⁻	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	17.89
16	Methyl-digallate ester	29.68	335.0409 [M-H] ⁻	335.0411 [M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₉	487.15

^aNot determined

Tabella II. Composizione dell'estratto di esocarpo di mango (MPE).

L'MPE contiene numerosi composti polari liberi. Come di solito si osserva nei frutti tropicali, i derivati degli acidi fenolici ed in particolare i derivati dell'acido gallico, risultano molto abbondanti. Questi ultimi in particolare, possiedono elevata attività

antiossidante e apportano benefici alla salute che vanno dall'azione neuroprotettiva [115] all'attività antitumorale [116].

11. Analisi degli effetti citotossici esercitati dai fitochimici contenuti nell'MPE

Come si nota dai saggi MTT presentati in Figura 18, l'attività biologica e citotossica dell'MPE osservata nelle cellule di carcinoma del colon, potrebbe essere attribuita ai fitochimici acido gallico (GA), mangiferina (MNG), pentagalloyl glucosio (PGG), metilgallato (MG) e acido citrico (CA). Questi composti infatti, usati singolarmente, sono in grado di ridurre notevolmente la vitalità cellulare in modo dose dipendente in tutte e tre le linee di carcinoma del colon dopo 48 h di trattamento. In particolare, come si nota in Figura 18, in cellule Caco-2 e HCT116 un effetto inibitorio di circa il 50% si osserva alle concentrazioni 200 μ M di GA e 10 mM di CA rispettivamente, mentre nelle cellule HT29 le stesse concentrazioni risultano poco efficaci.

Il risultato più significativo ottenuto in tutte e tre le linee cellulari si può notare dopo incubazione con pentagalloyl glucosio e con metilgallato, che esercitano una potente inibizione della crescita (Figura 18). Per tale motivo, dopo aver messo in evidenza che gli esteri dell'acido gallico si sono rivelati più efficaci nell'inibire la crescita delle cellule tumorali di colon, gli esperimenti successivi sono stati focalizzati sullo studio degli effetti del metilgallato (MG), uno dei fitochimici più abbondanti presenti nell'estratto, al fine di comprendere se questo composto potesse essere il responsabile degli effetti precedentemente osservati negli studi sulle tre linee di carcinoma del colon.

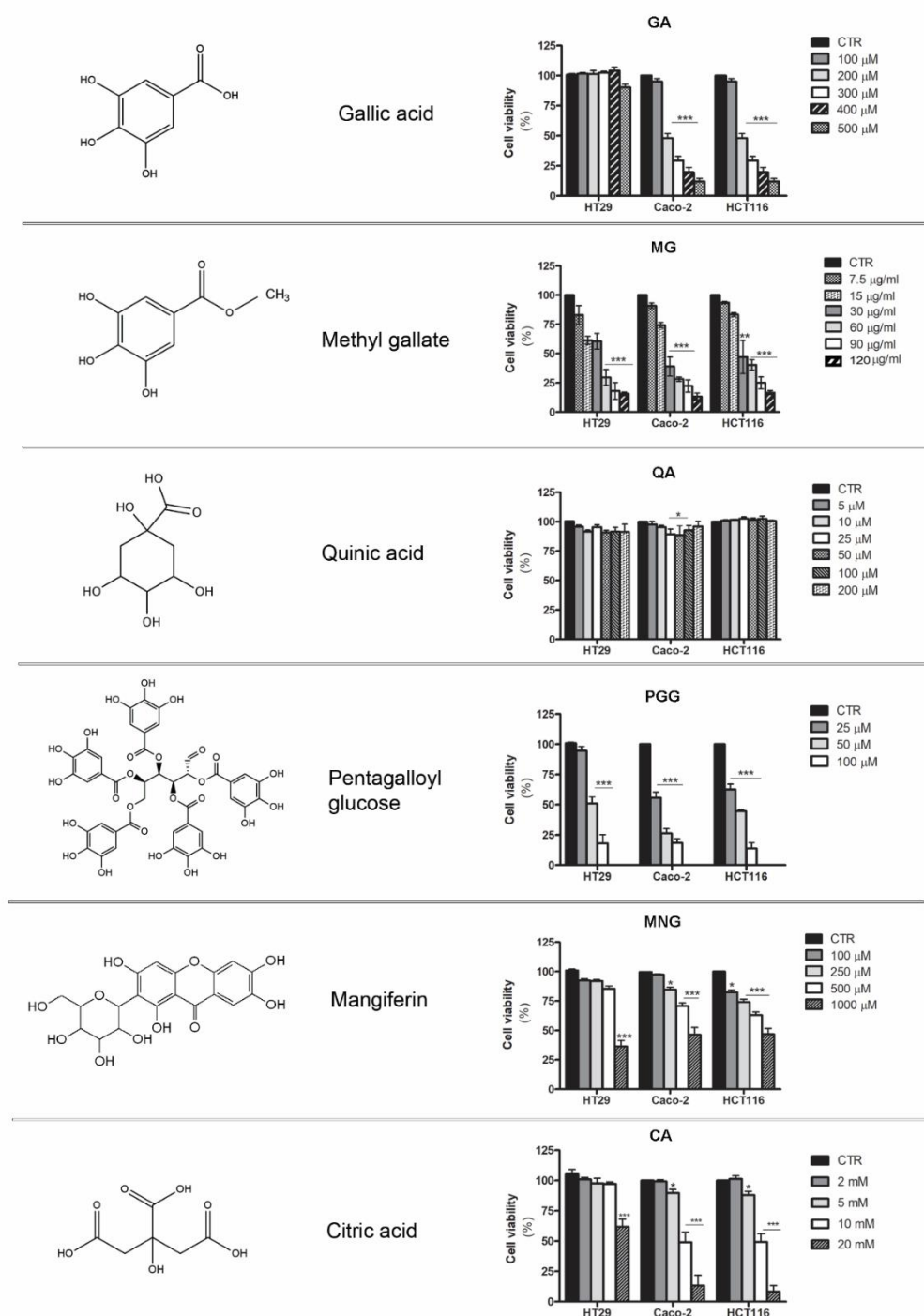


Figura 18. Vitalità cellulare in cellule di carcinoma del colon trattate con i fitocomposti presenti nell'MPE. Le cellule di carcinoma del colon, lisate, sono state incubate con diverse dosi dei principali fitochimici contenuti nell'estratto di esocarpo per 48 h (GA: acido gallico; MG: metil gallato; QA: acido chinico; PGG: pentagalloyl glucosio; MNG: mangiferina e CA: acido citrico). Nel pannello di sinistra sono riportate le strutture chimiche dei fitocomposti, ottenute con il software ChemDraw. La percentuale di cellule vitali è stata valutata mediante saggio MTT, come riportato nei Materiali e Metodi. Nella figura, i dati riportati nel grafico a barre sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test t di Student: (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo.

EFFETTI DEL FITOCHIMICO METILGALLATO (MG) SU CELLULE DI CARCINOMA DEL COLON HCT116

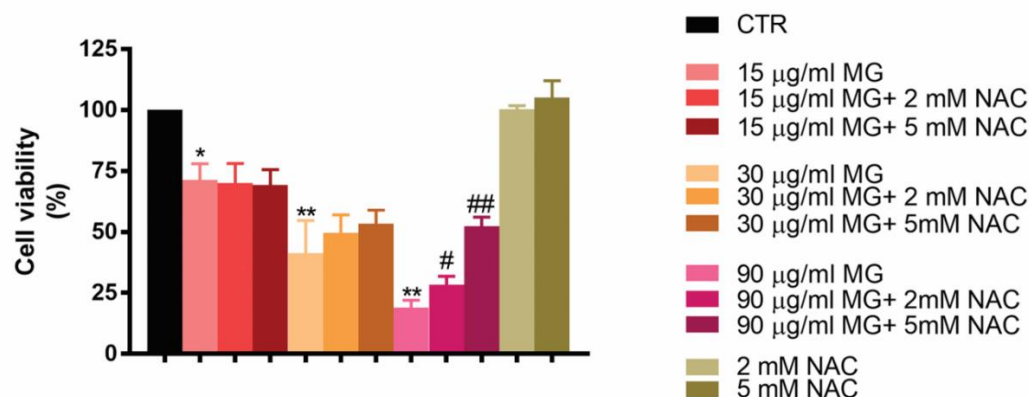
1. Effetto citotossico del Metilgallato (MG) su cellule di carcinoma del colon HCT116.

Il metilgallato o metil 3,4,5- triidrossibenzoato (MG) come precedentemente riportato in Tabella II, è una delle molecole bioattive più abbondanti dell'estratto di esocarpo di mango e poco si conosce sull'azione che esercita in cellule di carcinoma del colon. Per tale motivo, sono stati esplorati gli effetti a livello cellulare e molecolare sulle cellule HCT116, ipotizzando il possibile meccanismo mediante il quale tale composto esplica la sua azione.

In una prima fase, sono stati effettuati studi di vitalità cellulare con il saggio MTT utilizzando il MG a diverse concentrazioni (15-90 µg/ml). Come mostrato in Figura 19A, rispetto alle cellule controllo, il trattamento è in grado di ridurre la vitalità cellulare dopo 48 h. L'effetto ha un andamento dose-dipendente ed è parzialmente contrastato dall'aggiunta dell'antiossidante NAC.

Le analisi morfologiche al microscopio ottico in campo chiaro hanno confermato che la riduzione della vitalità è associata a riduzione del volume cellulare. Le cellule acquisiscono anche morfologia tondeggianti e mostrano distacco dal substrato: indici di evidente tossicità (Figura 19B). La tossicità del composto, in accordo con quanto osservato nel saggio MTT, è in parte contrastata dal NAC, facendo ipotizzare che le cellule trattate possano andare incontro a stress ossidativo provocato da un accumulo di specie reattive dell'ossigeno. Le concentrazioni 30 e 90 µg/ml sono state selezionate per esplorare il meccanismo d'azione del fitochimico.

A



B

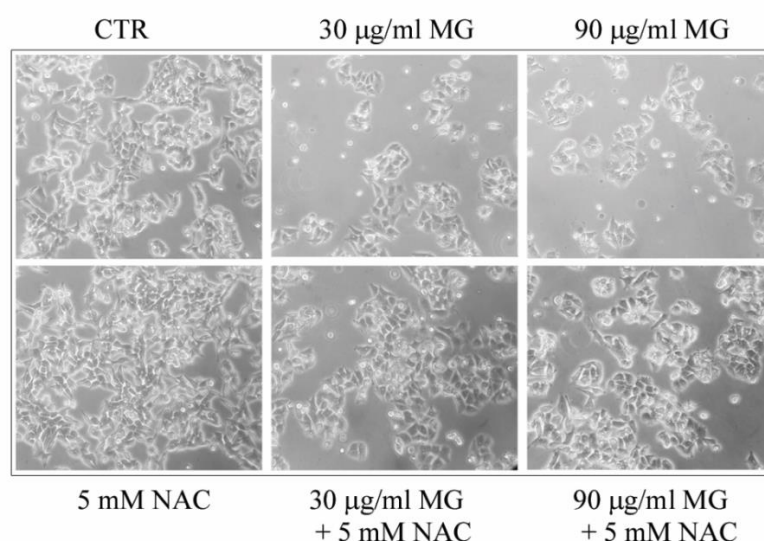
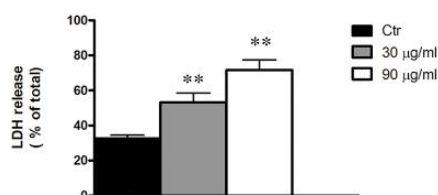


Figura 19. Il trattamento con il fitochimico MG induce un rallentamento proliferativo nelle cellule HCT116. (A) Le cellule HCT116 sono state trattate per 48 h con dosi crescenti del composto (15,30,90 µg/ml) in presenza o assenza di NAC 2mM o 5mM (pretrattamento per 2 h). La vitalità è stata valutata attraverso saggio MTT come descritto in Materiali e Metodi. Il grafico mostra sull'asse delle ascisse la concentrazione e sull'asse delle ordinate la vitalità cellulare. I dati riportati sono rappresentati come media \pm SD di tre differenti esperimenti. Le differenze significative tra campioni trattati e non trattati sono state valutate mediante il test *t* di Student: (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo, (#) $p < 0.05$ e (##) $p < 0.01$ rispetto al campione trattato con MG. (B) Variazioni morfologiche indotte dal trattamento con MG (30, 90 µg/ml) in presenza o assenza di NAC 5mM, ottenute dopo 48 h di trattamento e visualizzate mediante microscopio invertito Leica. Le immagini riportate in figura sono state acquisite con un ingrandimento 200X con software IM50 Leica.

In una seconda fase, per confermare l'effetto citotossico indotto dal MG sulle cellule HCT116, è stato eseguito il saggio della lattico deidrogenasi (LDH). In Figura 20A si osserva che il trattamento con MG per 48 h incrementa il rilascio di LDH rispetto alle cellule controllo. Inoltre, incubando le cellule con dosi crescenti di MG (0.46 - 7.5 µg/ml), è stato ulteriormente confermato che il MG è in grado di contrastare la capacità

proliferativa delle cellule, come evidenziato dal saggio clonogenico (Figura 20B). Queste dosi sono state scelte sulla base di esperimenti precedenti (dati non mostrati) in cui adoperando concentrazioni maggiori di 7.5 µg/ml non si era osservata la crescita di colonie.

A



B

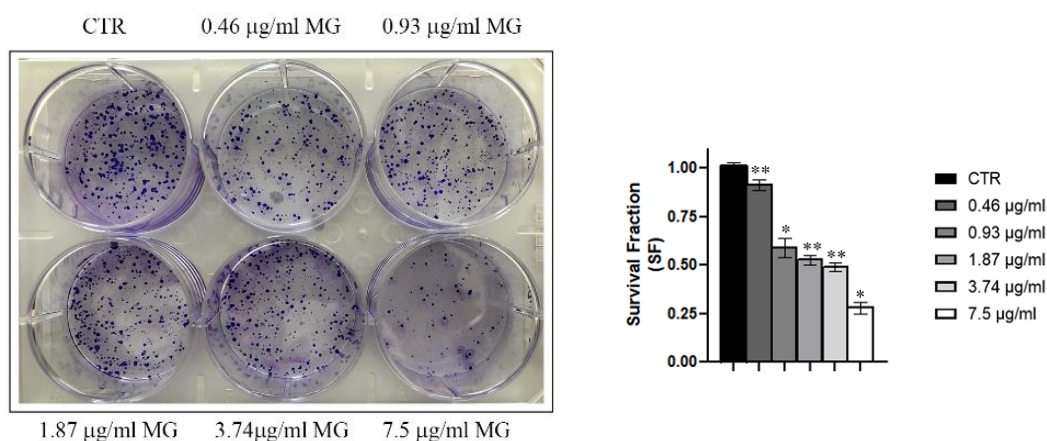


Figura 20. Effetti citotossici del MG valutati mediante saggio LDH e saggio clonogenico. (A) Valutazione del rilascio di LDH in cellule di carcinoma colon rettale trattate con MG. Le cellule HCT116 sono state incubate per 48 h con MG (30,90 µg/ml) e successivamente è stato svolto il saggio dell'LDH come descritto nei Materiali e Metodi. Nel grafico sull'asse delle ascisse sono riportate le concentrazioni e sull'asse delle ordinate il rilascio di LDH. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo **(B)** Le cellule sottoposte a saggio clonogenico sono state fissate in seguito al trattamento e poi colorate con cristal violetto. La capacità delle cellule di formare colonie, come riportato nei Materiali e Metodi, è stata valutata dopo 10 giorni. Si riporta l'immagine di un esperimento rappresentativo. Nel pannello di destra i risultati del saggio sono riportati come frazione di sopravvivenza (SF) del numero di colonie rispetto alla condizione controllo. I dati riportati sono espressi come media \pm SD di tre differenti esperimenti. (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$ rispetto al controllo.

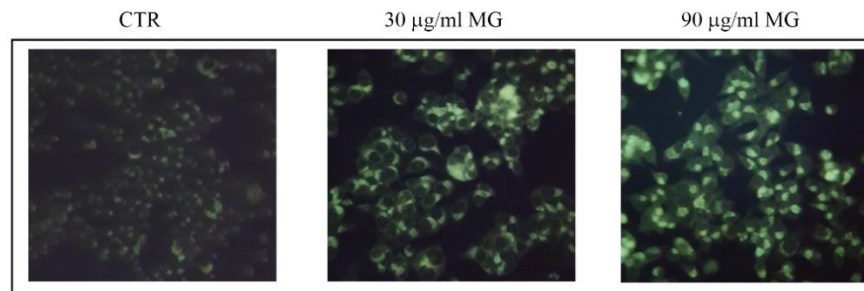
I dati ottenuti mediante i saggi di vitalità cellulare hanno dunque suggerito che il fitochimico presente nell'estratto di esocarpo esercita un effetto citotossico su cellule di carcinoma del colon HCT116, che si manifesta con una riduzione del numero di cellule accompagnato da un rallentamento nella proliferazione.

2. Il trattamento con MG attiva il processo autofagico e induce stress cellulare

Dopo aver valutato gli effetti del fitochimico sulla vitalità cellulare, è stato approfondito il meccanismo indotto dal trattamento con MG, rivolgendo l'attenzione alla possibile induzione del percorso autofagico. È stato interessante ottenere una prima conferma dell'induzione del processo autofagico fin dalle prime ore di incubazione con il composto (24 h). Le osservazioni sono state effettuate al microscopio a fluorescenza in seguito a colorazione con monodansilcadaverina (MDC) (Figura 21A), una molecola fluorescente capace di evidenziare la presenza di vacuoli autofagici [117]. La Figura 21A mostra che, rispetto alla fluorescenza verde diffusa osservata nelle cellule controllo, il trattamento con MG induce dopo 24 h la formazione di strutture "dot like" nelle cellule HCT116.

Per approfondire il coinvolgimento di questo processo è stato studiato poi il meccanismo molecolare, analizzando i livelli di alcuni dei principali markers autofagici: ULK1, LC3 e p62. I livelli della proteina ULK1, coinvolta nella fase iniziale del processo autofagico, risultano incrementati dopo incubazione con entrambe le concentrazioni 30 e 90 µg/ml. La proteina LC3, marker degli autofagosomi esiste in due forme: LC3-I è la forma solubile citosolica che viene convertita in LC3-II durante l'assemblaggio dell'autofagosoma. Osservando l'immagine (21B) che riporta le analisi di western blotting vi è un chiaro incremento dei livelli di espressione di entrambe le bande, in particolare quella a più basso peso molecolare. p62, marker dell'andamento del flusso autofagico, risulta anch'essa incrementata. Diversamente, non si notano variazioni nei livelli della proteina ATG7.

A



B

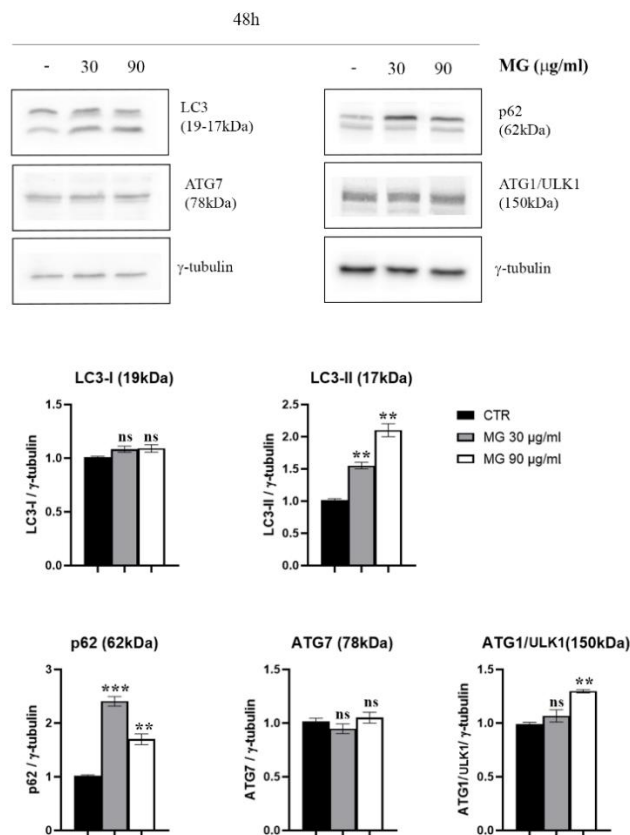


Figura 21. Il trattamento con MG induce formazione di organelli vescicolari acidi e induce incremento dei markers autofagici. (A) Effetto del MG adoperato alle concentrazioni 30 e 90 µg/ml sulla formazione di autofagosomi. Dopo 24h di esposizione al composto, le cellule sono state incubate con MDC 50 µM per 15 minuti a 37 °C ed analizzate mediante microscopio a fluorescenza invertito Leica Q Fluoro, come descritto nei materiali e metodi. (B) Analisi di western blotting dei livelli di LC3, p62, ATG1/ULK1 e ATG7 in cellule HCT116 in seguito a trattamento per 24 h con MG. Nelle figure, il blot della γ-tubulina è stato riportato come controllo di un caricamento omogeneo.

Il processo autofagico si accompagna inoltre a stress cellulare ed in particolare stress del reticolo (ER stress). Come è risaputo, l'ER stress è una condizione di alterazione nell'equilibrio di questo organello derivato dall'accumulo di proteine non correttamente

ripiegate e denaturate che può avere diverse cause. Per fronteggiarlo, l'ER stress promuove l'espressione di una serie di fattori e proteine chaperons, al fine di ripristinare l'omeostasi cellulare; tra questi vi sono GRP78 (*glucose related protein*), uno dei principali sensori dello stress del reticolo ed il fattore trascrizionale CHOP (proteina omologa di C/EBP, anche nota come GADD153) [118]. Come si osserva in Figura 22, i livelli di entrambe le proteine risultano incrementati rispetto alle cellule controllo già dopo 24 h di trattamento, e continuano ad essere elevati anche dopo 48 h. Inoltre, il trattamento con MG induce un innalzamento dei livelli di altre due proteine connesse con lo stress quali pERK 1/2, ed il fattore di trascrizione cJun, che può svolgere anche ruoli di protezione dall'ER stress [119].

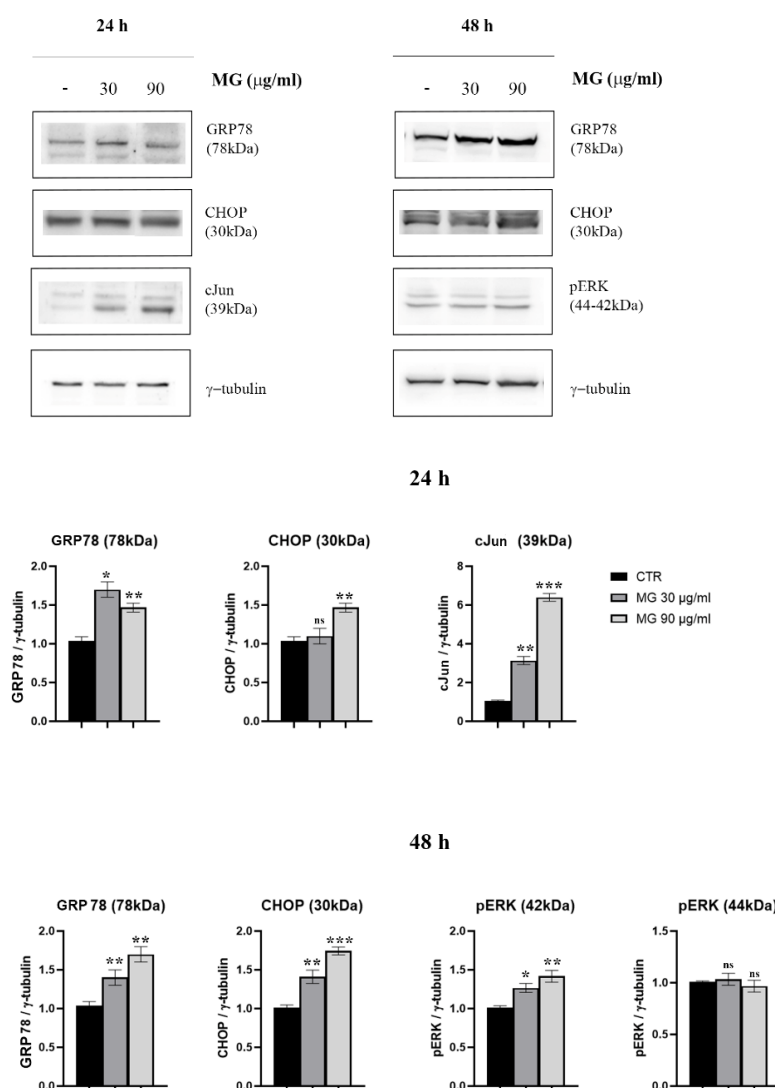


Figura 22. Valutazione dei markers dell'ER stress in cellule di carcinoma del colon. Analisi di western blotting dei livelli di GRP78, CHOP, cJun e pERK in seguito a incubazione delle cellule HCT116 con MG per 24 o 48 h. Le cellule sono state successivamente lisate e incubate con gli anticorpi per le proteine di interesse. Come controllo di un caricamento omogeneo è stato riportato il blot della γ -tubulina. I dati riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo, n.s., non significativo.

Nel complesso, questi dati hanno portato a ipotizzare il coinvolgimento dell'autofagia nelle prime ore di incubazione delle cellule HCT116 con il fitochimico, come confermato dall'incremento dei markers autofagici. Tale processo potrebbe essere messo in atto dalle cellule che al contempo vanno incontro a stress come dimostrato dall'aumento dei livelli di specifici mediatori, e potrebbe poi concludersi, in accordo con i dati di vitalità cellulare ottenuti per tempi più lunghi di trattamento (48 h), con la morte delle cellule.

3. Il trattamento con MG induce danno al DNA e morte per apoptosi

Nell'ultima parte degli studi, per valutare se gli altri effetti indotti dall'estratto totale di esocarpo fossero ascrivibili anche parzialmente al MG, abbiamo studiato gli effetti sulla frammentazione del DNA e sui marker di danno al DNA dopo colorazione delle cellule con Hoechst vitale 33342. Come evidenziato in Figura 23A, il trattamento delle cellule con MG induce a 48 h di trattamento una marcata condensazione cromatinica, che non è invece riscontrabile nelle cellule controllo. Dall'analisi dei markers di danno al DNA (Figura 23B), i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'incubazione delle cellule HCT116 con il fitochimico, induce dopo 48 h un incremento della proteina γ H2AX, evento che si accompagna anche ad innalzamento dei livelli di p53.

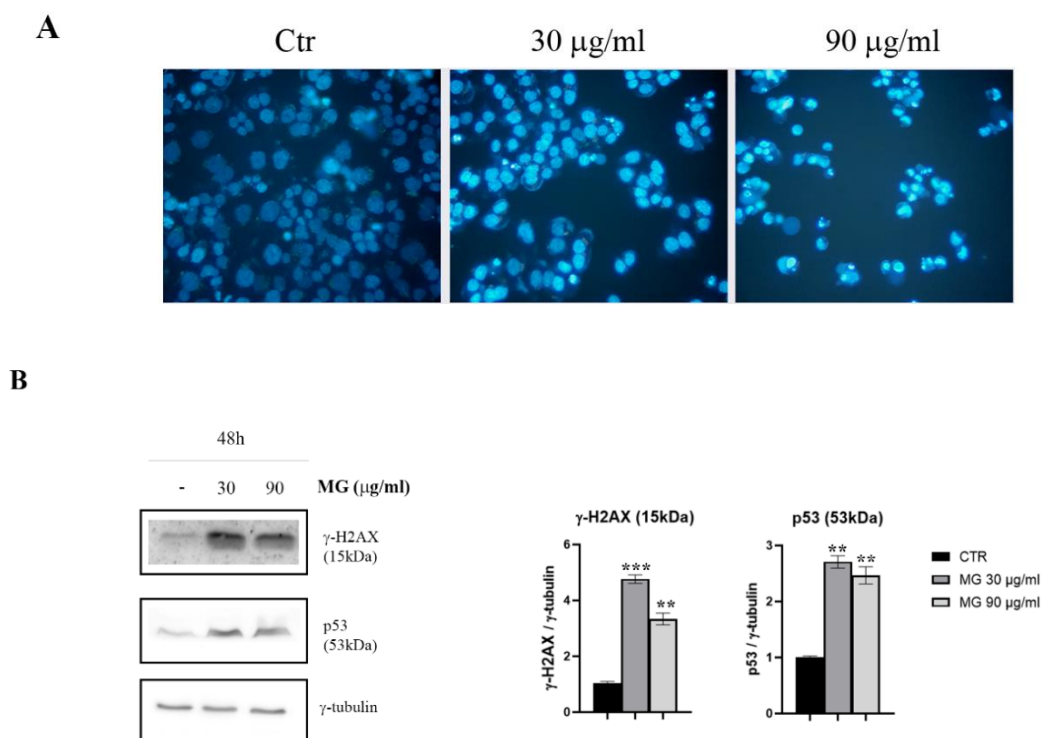


Figura 23. Valutazione del danno al DNA in cellule di carcinoma del colon HCT116 trattate con MG
(A) Analisi morfologica delle cellule HCT116 dopo colorazione con Hoechst vitale 33342. Le cellule sono state trattate con MG alle concentrazioni 30 e 90 μ g/ml per 48 h. L'effetto di frammentazione e condensazione cromatinica appare chiaro dopo osservazione al microscopio a fluorescenza in seguito a

colorazione con il fluorocromo. Le frecce gialle indicano la cromatina condensata o frammentata. Le immagini (ingrandimento originale 400X) sono state acquisite con filtro 4',6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) tramite un microscopio a fluorescenza invertito ed elaborate con il software Leica Q Fluoro come riportato in Materiali e Metodi. **(B)** Analisi dei livelli dei markers di danno al DNA: γ H2AX e p53. Le cellule sono state trattate con MG 30 e 90 μ g/ml per i tempi indicati. Al termine, sono state lisate e le proteine sono state analizzate mediante western blotting adoperando anticorpi specifici per le molecole di interesse. Il blot della γ -tubulina è stato inserito come controllo dell'omogeneità di caricamento. I blot e gli istogrammi delle analisi densitometriche riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (**) $p < 0.01$, e (***) $p < 0.001$ rispetto al controllo.

Per confermare il tipo di morte cellulare indotta dal composto, è stata pertanto condotta un'analisi di citofluorimetria dopo colorazione con Annessina V e Ioduro di Propidio (PI). Per questo esperimento le cellule sono state incubate con il fitochimico per 48 h alle concentrazioni indicate. Come si osserva in Figura 24A, rispetto alle cellule controllo vitali (area Q4), nelle cellule esposte al trattamento si osserva una popolazione Ann V⁺/PI⁻ pari al 13,9% (Q3) con la dose di MG 30 μ g/ml. Tale effetto incrementa ulteriormente con la dose 90 μ g/ml in cui risulta il 40,9% AnnV⁺/PI⁻(Q3) e il 19% AnnV⁺/PI⁺ (Q2). L'effetto risulta quindi essere dose dipendente. Le analisi citofluorimetriche riportate hanno permesso di attestare che l'azione citotossica del MG è associata a morte di tipo apoptotico accompagnata a esternalizzazione della fosfatidilserina a livello della membrana cellulare. Il coinvolgimento dell'apoptosi è stato confermato dall'analisi mediante western blotting dei marker specifici PARP1 e procaspasi-3. Come mostrato in Figura 24B, il trattamento a 48h con MG induce un decremento della forma pro-enzimatica della caspasi -3, indicandone l'attivazione, confermata dall'analisi dei livelli della PARP1. Uno dei principali target della caspasi-3 attiva è infatti la Poli-(ADP-ribosio) -polimerasi, che risulta chiaramente frammentata in seguito a trattamento. Questi risultati nel complesso indicano che il trattamento con il fitochimico esaminato, indirizza le cellule a morte cellulare per via apoptotica dipendente da p53. Studi successivi saranno necessari per comprendere meglio la relazione esistente tra l'induzione del processo autofagico durante le prime ore di trattamento e i principali protagonisti dello stress e della morte per apoptosi.

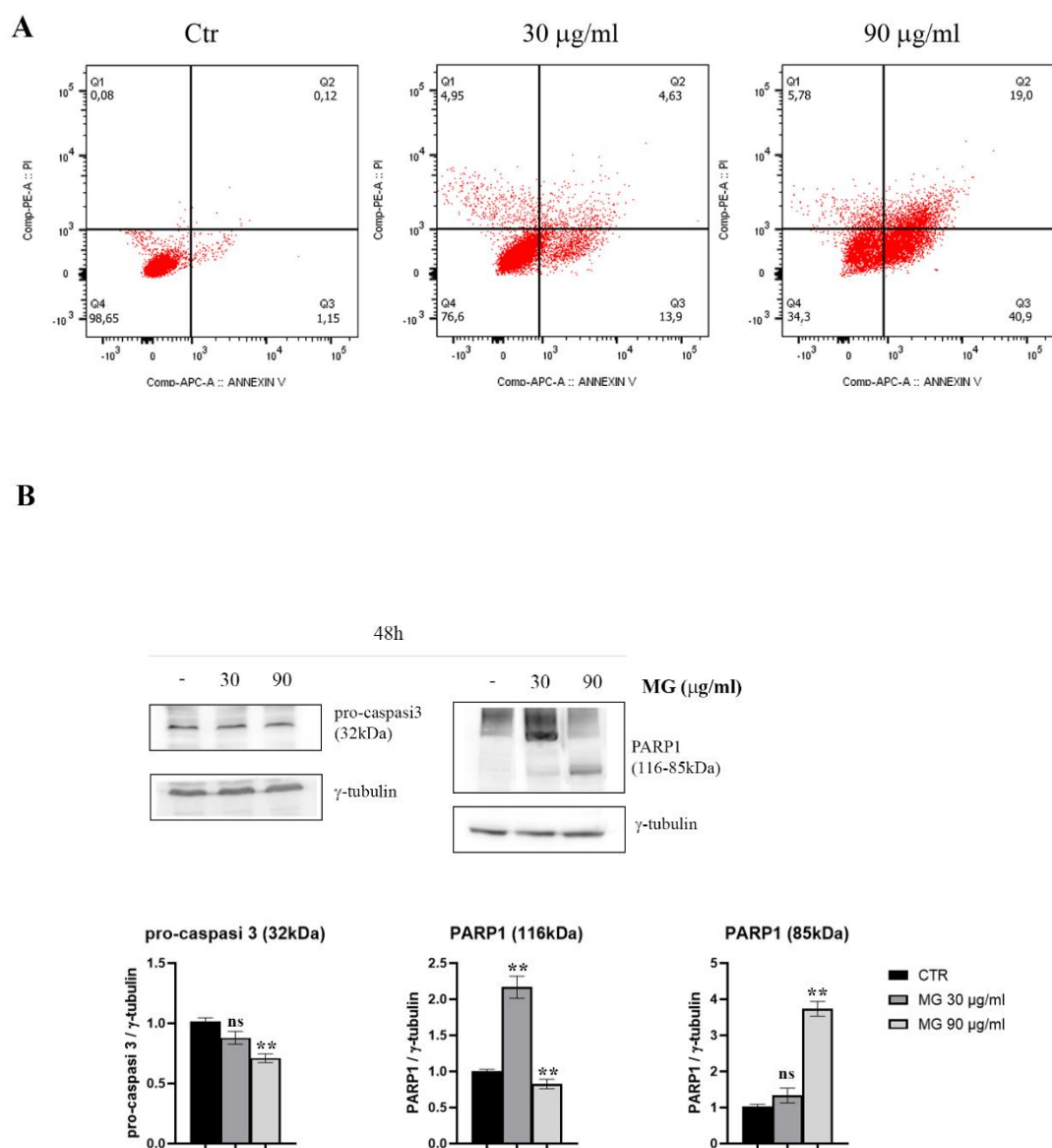


Figura 24. Valutazione della morte cellulare apoptotica in cellule di cancro del colon HCT116 trattate con MG. (A) Analisi citofluorimetriche degli effetti del MG sulle cellule HCT116. Dopo incubazione con MG 30 e 90 $\mu\text{g/ml}$ per 48 h, le cellule (1×10^5) sono state sottoposte a doppia colorazione con Annessina V/PI, come riportato nei materiali e metodi, e successivamente sono state analizzate mediante citofluorimetria. L'area Q1 rappresenta le cellule in necrosi, l'area Q2 riporta quelle in apoptosi tardiva, le cellule in apoptosi precoce sono riportate nell'area Q3; invece, le cellule nell'area Q4 sono vitali. (B) Le analisi di western blotting di pro-caspasi 3 e PARP1 sono state eseguite come riportato in Materiali e Metodi. Il blot della γ -tubulina è stato riportato come controllo di un caricamento omogeneo. Gli istogrammi delle analisi densitometriche indicati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (**) $p < 0.01$ e n.s. non significativo.

Discussione

Negli ultimi anni è cresciuto sempre di più l'interesse verso il ruolo ed il meccanismo d'azione delle componenti bioattive e dei composti naturali, elementi fondamentali da integrare nell'alimentazione di ciascuno di noi per il loro contributo al benessere [120,121]. Questo interesse è stato supportato anche da studi epidemiologici che mostrano il valore di alcuni composti di origine naturale nel contrastare la crescita cellulare nei tumori, offrendo così un'azione chemopreventiva. In questo scenario, sono stati descritti una grande moltitudine di effetti benefici riguardanti il frutto di *M. indica*, il quale possiede un valido potenziale nutraceutico dovuto alle sue proprietà immunomodulatorie, radioprotettive, antidiabetiche, antiinfiammatorie, antiossidanti e, di notevole interesse, anche quelle antitumorali [122-126]. La capacità antitumorale degli estratti crudi del frutto di mango è stata, infatti, largamente studiata.

Lo studio riportato in questa tesi ha avuto lo scopo di indagare il meccanismo d'azione dell'estratto di esocarpo di mango (MPE), considerata la sua capacità di contrastare la proliferazione cellulare sulle diverse linee di carcinoma del colon. È necessario precisare che, sebbene la letteratura riporti le proprietà benefiche e nutraceutiche dei frutti di mango provenienti dalle aree tropicali, nessun dato era presente sull'esocarpo del mango coltivato in Sicilia (nella zona di Balestrate) prima di questi studi, e in particolare sulla sua attività antitumorale. La Sicilia, essendo caratterizzata da un ambiente pedoclimatico favorevole, è una regione particolarmente adatta alle coltivazioni di mango e ne conferisce particolari caratteristiche. Per queste ragioni l'interesse del mio progetto si è focalizzato in una prima fase sull'analisi dell'attività antitumorale dell'estratto ottenuto da frutti provenienti dalle coltivazioni di mango delle aree rurali siciliane sulle cellule di carcinoma del colon, individuandone il possibile meccanismo d'azione, e, in un secondo tempo, sulla caratterizzazione chimica dell'MPE e sugli effetti del metilgallato, uno dei polifenoli più abbondanti.

I risultati riportati nella seguente tesi hanno mostrato in modo chiaro che l'MPE possiede un'azione anti-carcinogenica selettiva che consiste nella riduzione della vitalità delle cellule di carcinoma del colon, con danno genotossico mediato da γ -H2AX e frammentazione del DNA, mentre non mostra effetti tossici su fibroblasti umani non tumorali. Tale evento si accompagna a produzione precoce di specie reattive dell'ossigeno che inducono attivazione per fosforilazione di proteine associate a stress (come pJNK) ed un esteso danno al DNA che conducono le cellule tumorali incontro a morte apoptotica mediata da γ -H2AX. Questi dati sono in accordo con risultati presenti in letteratura che dimostrano come l'incremento di pJNK possa essere attribuito all'attivazione del

programma di morte apoptotica come recentemente osservato nelle cellule di leucemia mieloide cronica trattate con resveratrolo [127], uno dei polifenoli più conosciuti presente nelle piante. È stato inoltre dimostrato che l'MPE promuove l'incremento dei livelli di pERK 1/2, membro della famiglia di proteine chinasi attivate dai mitogeni e in grado di mediare proliferazione cellulare ed apoptosi [128], oltre che indurre la NADPH ossidasi. In aggiunta all'attivazione delle chinasi da stress pJNK e pERK 1/2, il danno da stress ossidativo indotto dall'MPE si accompagna al reclutamento di Nrf-2, un noto fattore utile nella difesa e nella protezione delle cellule dagli eventi tossici e ossidanti. Nrf-2 è un fattore di trascrizione che, quando è fosforilato [129,130], trasloca nel nucleo dove attiva l'espressione di una serie di geni con capacità antiossidante come la superossido dismutasi (MnSOD), la catalasi, la NAD(P)H chinone reduttasi, la glutatione-S-trasferasi, e l'HO-1 [131,132]. Dagli esperimenti condotti è stato evidenziato che l'attivazione della risposta di protezione mediata da Nrf-2 e dal suo target MnSOD sia un tentativo della cellula di contrastare il danno ossidativo indotto dall'MPE. Insieme, questi dati supportano la partecipazione dello stress ossidativo all'effetto del MPE sulle cellule.

Il meccanismo d'azione indotto dall'MPE sulle cellule di carcinoma del colon analizzate, coinvolge in modo significativo il mitocondrio. Il trattamento con MPE, infatti, è capace di innescare una precoce produzione dell'anione superossido mitocondriale, che si associa a caduta del contenuto di gruppi tiolici. Questi eventi potrebbero essere alla base di una disfunzione mitocondriale, che si accompagna a dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale $\Delta\psi_m$ conseguente alla permeabilizzazione della membrana mitocondriale osservata dopo trattamento. A sua volta, la dissipazione del $\Delta\psi_m$ è un evento strettamente connesso al pathway apoptotico [133] e ha come conseguenza il rilascio di due noti fattori apoptogenici; il citocromo C e AIF. AIF (fattore di induzione dell'apoptosi) può essere rilasciato dai mitocondri in seguito a caduta del potenziale di membrana, e si ridistribuisce nel compartimento nucleare per contribuire alla condensazione cromatinica e alla frammentazione del DNA [134]. Nelle stesse condizioni sperimentali, la disfunzione mitocondriale è accompagnata anche dalla diminuzione dei livelli delle proteine VDAC1 e mitofillina. Questi dati sono in accordo con uno studio effettuato da Madungwe et al. che dimostrano come il knockdown della mitofillina sia un evento necessario per innescare l'apoptosi mediata dal pathway AIF-PARP1 [135]. La riduzione dei livelli proteici di VDAC1 può essere, inoltre, correlata alla dissipazione del $\Delta\psi_m$, poiché contribuisce alla sua formazione. È stato evidenziato da Maldonado et al. che in cellule di epatocarcinoma

HepG2 il silenziamento di ogni isoforma di VDAC è in grado di determinare una riduzione nel $\Delta\Psi_m$ [136].

Inoltre, nel mio studio, l'esteso danno al DNA promosso dall'MPE, si accompagna ad un incremento nei livelli di γ -H2AX, pATM e p53. Come riportato in letteratura, l'attivazione di γ -H2AX rappresenta il primo passo per il reclutamento delle proteine di riparo del DNA nei siti di danno. H2AX è uno dei cinque istoni appartenenti alla famiglia istonica H2A, e particolarmente rilevante è la sua forma fosforilata in serina 139, indicata con γ -H2AX, che rappresenta un indicatore sensibile al danno al DNA provocato da fonti esterne alla cellula [137]. Questi dati presenti in letteratura sono in linea con i dati che mostrano come l'incremento di γ -H2AX è collegato con la morte cellulare apoptotica indotta dall'MPE. I livelli di questa proteina incrementano rapidamente durante le prime fasi del trattamento, rimanendo alti durante tutto il tempo di trattamento, finché le cellule tumorali vanno incontro a morte (Figura A). Ciò è in accordo con quanto dimostrato da Rogakou che, studiando la cinetica di formazione di γ -H2AX in cellule Jurkat esposte a staurosporina, un induttore di apoptosi, ha fornito un'analisi dettagliata del "timing" di γ -H2AX e della frammentazione del DNA nelle cellule che vanno incontro a morte. Effetti simili sono stati descritti in altri sistemi apoptotici come le cellule HL-60 trattate con staurosporina o cellule Jurkat esposte a trattamento con etoposide [137]. Soiler et al. hanno inoltre analizzato la presenza di γ -H2AX e di H2B fosforilato in una nuova forma cellulare chiamata "anello apoptotico" in cui le varianti istoniche sono reclutate e attivate dal danno al DNA [138]. In linea con queste osservazioni, più recentemente è stato descritto un pathway di segnalazione apoptotica dipendente dall'attivazione dell'asse H2AX-CARP-1 (proteine regolatrice del ciclo cellulare e dell'apoptosi), e questo si è dimostrato essere un evento chiave nella trasduzione del segnale apoptotico in seguito a danno al DNA [139].

Nel loro insieme, i risultati ottenuti sembrano indicare che la perdita dell'equilibrio redox cellulare, mediata sia dallo stress genotossico che dal danno mitocondriale, potrebbero contribuire all'azione antitumorale dell'MPE. Lo stesso trattamento causa, inoltre, rilascio del citocromo C, e questa traslocazione è in accordo con gli effetti che mostrano la morte cellulare programmata per via apoptotica. Il citocromo C infatti, partecipa nel processo di morte cellulare associandosi con Apaf-1 (fattore 1 attivante la proteasi) per formare l'apoptosoma, oppure si localizza nel nucleo per supportare i meccanismi di riparo molecolare nei siti di DNA danneggiato indotti da eventi caspasi-indipendenti [140,141]. Tuttavia, non è possibile escludere la possibilità che il rilascio del citocromo C sia

connesso anche con la diminuzione dei livelli di mitofillina in seguito al trattamento. Questa ipotesi è sostenuta in letteratura da Yang et al. che descrive come il knockdown della mitofillina renda le cellule più propense ad andare incontro a morte cellulare per apoptosi intrinseca, causando il rilascio del citocromo C dalle creste mitocondriali (Figura A) [142].

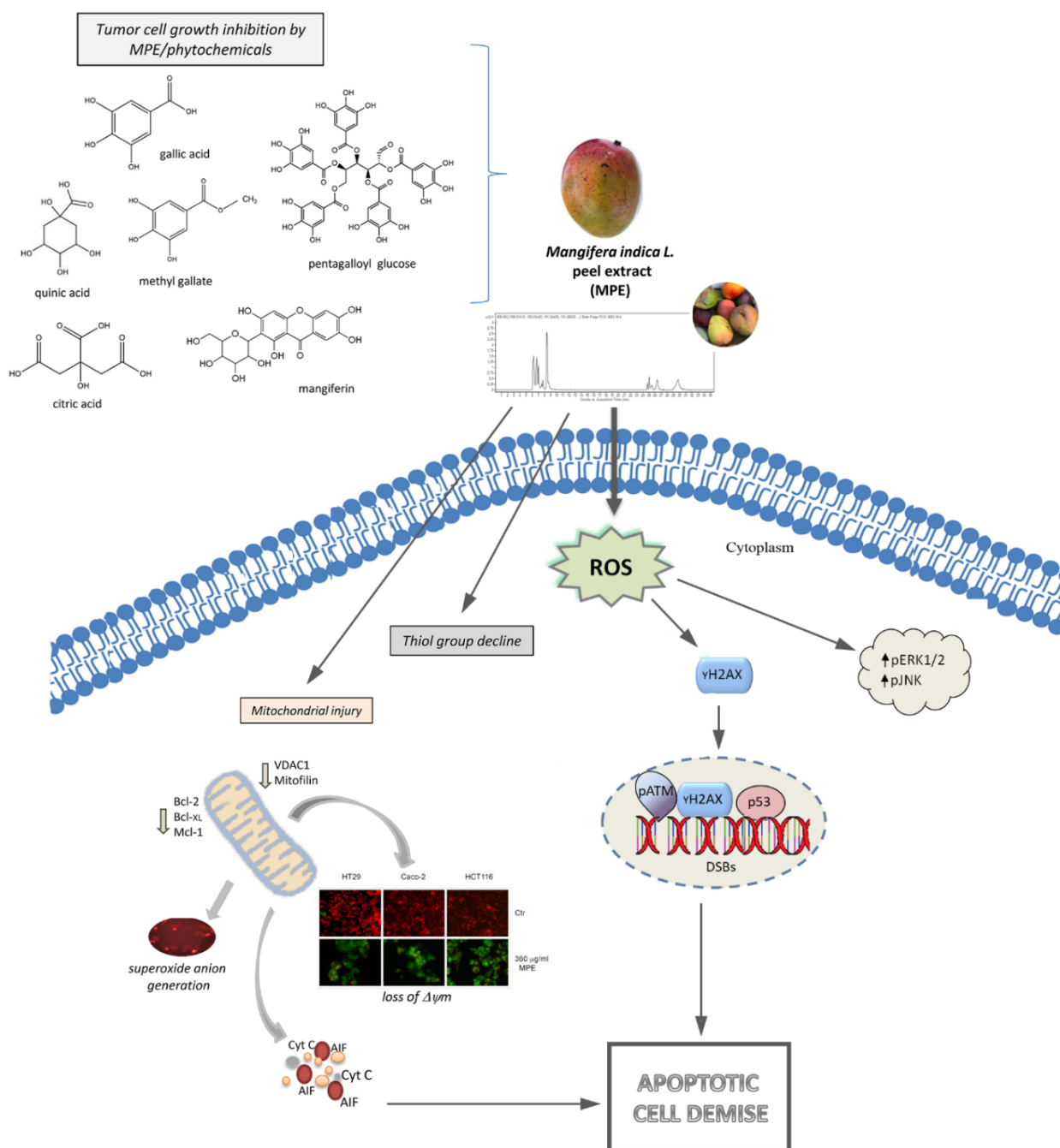


Figura A. Rappresentazione schematica dell'attività antitumorale dell'MPE.

I dati presentati evidenziano quindi che l'MPE è in grado di indurre nelle cellule di carcinoma del colon morte cellulare programmata per via apoptotica, che probabilmente ha

origine a livello mitocondriale ed è orchestrata da stress genotossico mediato dalle specie reattive dell'ossigeno con frammentazione del DNA e della PARP1, e tutto ciò è accompagnato da un notevole incremento dei livelli della proteina γ -H2AX. Tuttavia, dal momento che questi effetti si manifestano già nelle prime ore di incubazione con il composto, quando le cellule sono ancora vive, è possibile che, nonostante si attivi il pathway che conduce le cellule verso l'apoptosi, esse cerchino di difendersi attivando sistemi citoprotettivi come Nrf-2 ed il suo target trascrizionale MnSOD, che però fallisce nel sostenere la crescita tumorale. Così, le cellule tumorali, trovandosi disarmate nei loro sistemi di difesa, collassano, andando incontro ad apoptosi.

Alla luce degli effetti osservati, la seconda parte degli studi ha avuto l'obiettivo di caratterizzare e analizzare chimicamente l'MPE siciliano mediante HPLC/MS. È stato interessante notare che tra i fitochimici da cui è composta questa porzione del frutto, suddivisi in acidi organici, gallati e gallotannini, derivati di xantoni e di benzofenoni, i più rappresentati sono gli esteri dell'acido gallico. Questi, oltre ad arricchire in termini nutraceutici la frazione, potrebbero essere i principali protagonisti degli effetti osservati. La presenza di questi composti è in accordo con quanto indicato in letteratura, tranne che per la presenza dell'acido lepidimoico, un disaccaride evidenziato nell'esocarpo di mango per la prima volta. Valutando gli effetti di alcuni dei fitochimici presenti nella miscela usati singolarmente, è emerso il potenziale citotossico di mangiferina (MNG), acido gallico (GA), acido citrico (CA), pentagalloyl glucosio (PGG) e metilgallato (MG) sulle cellule di carcinoma del colon. Questi risultati hanno messo in evidenza che i fitochimici si dimostrano meno efficaci se impiegati da soli e che l'utilizzo dell'intero estratto mostra effetti maggiori, suggerendo che il sinergismo tra i polifenoli è essenziale per esercitare al meglio la loro attività biologica [143]. La mangiferina e l'acido gallico sono due tra i polifenoli maggiormente presenti non solo nell'MPE ma nell'intero frutto, e ne sono note le proprietà antiossidanti e antitumorali [144-146]. L'effetto antiproliferativo dell'acido citrico è abbastanza noto in letteratura su diverse linee cellulari tumorali [147-149]. Tra i composti che invece si sono rivelati più efficaci nel ridurre la vitalità cellulare vi sono il PGG e il MG. La citotossicità del PGG sulle cellule di carcinoma del colon è conforme con quanto presente in letteratura [150,151], sebbene esso sia anche capace di contrastare la vitalità di altre linee cellulari tumorali come quelle di carcinoma polmonare A549 [150], carcinoma alla prostata [152], melanoma, [153] ed epatocarcinoma [154].

Il metilgallato, polifenolo derivato dell'acido gallico ed abbondante nella frazione dell'MPE, è presente anche in molti frutti e piante, come ad esempio la specie *Meliaceae*,

Galla rhois e in alcune *Anacardiaceae* come *Mangifera indica*, *Mangifera pajang* e *Spondias pinnata*. Si ritrova in abbondanza anche nei semi di *Givotia rottleriformis* Griff. e nelle foglie dell'acero [155,156], ed è stato isolato anche dalla corteccia di *Acer barbinerve* [157]. In letteratura sono state descritte diverse proprietà biologiche: dall'attività antispastica a quella anti-aterogena, antinfiammatoria ed antiossidante [158,159]. Ne sono noti anche gli effetti antiproliferativi su numerose linee cellulari tumorali di carcinoma al seno MDA-MB-231 [160] e MCF7 [161], carcinoma alla prostata (PC-3) [160], glioma (C6 e U373) [162], glioblastoma (U87) [163], carcinoma all'epidermide [164], oltre che su cellule di epatocarcinoma [165] e di carcinoma pancreatico CP-2 [166]. Per quanto concerne gli effetti conosciuti sulle cellule di carcinoma del colon, il metilgallato estratto dai semi del Bambagan (*Mangifera pajang*), un frutto simile al mango, mostra effetti citotossici sulle cellule di adenocarcinoma del colon HT29 [166] e su quelle di carcinoma del colon HCT116 [161]. Dal punto di vista molecolare, poche informazioni sono reperibili circa il meccanismo d'azione di questo fitocomposto sulle cellule di carcinoma del colon. Mandal et al. hanno messo in evidenza gli effetti del MG estratto dalla corteccia di *Spondias pinnata* sulle cellule di glioma, dove è in grado di inibire la crescita cellulare determinando morte per apoptosi associata ad attivazione delle caspasi-3 e 9 e della PARP1, segni peculiari del processo apoptotico [163].

Negli studi qui riportati, è stato accertato che il MG è in grado di indurre citotossicità su cellule di carcinoma HCT116, riducendone la vitalità cellulare, il potenziale clonogenico e indirizzandole a morte cellulare per via apoptotica. Tale effetto viene contrastato dall'utilizzo dell'antiossidante NAC, facendo presupporre un possibile coinvolgimento dei ROS nel meccanismo d'azione del composto. I ROS svolgono un ruolo fondamentale nel bilancio redox della cellula, ma anche nella morte cellulare. L'omeostasi redox può determinare il destino delle cellule tumorali, che possono andare incontro a diversi pathway inclusi l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi e l'autofagia [167]. Nel processo autofagico le cellule tentano di ricavare energia e nutrienti auto-digerendosi per mantenere l'omeostasi. In condizioni di stress, come lo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress), le cellule tumorali inducono questo processo, promuovendo così la sopravvivenza cellulare [168]; oppure possono andare incontro a morte. I dati ottenuti evidenziano che le cellule HCT116 sottoposte a incubazione con MG vanno incontro a ER stress, come dimostrato dall'incremento di CHOP e GRP78, due marker rappresentativi dell'evento. L'induzione dello stress del reticolo endoplasmatico potrebbe essere alla base dell'attivazione del meccanismo autofagico [169], quest'ultimo confermato dall'incremento di LC3-II, forma

clivata di LC3 che partecipa alla formazione dell'autofagosoma. A ciò si accompagna l'innalzamento dei livelli di ULK1 coinvolto nel processo di induzione autofagico [170] e di p62, altra proteina marker dell'andamento del flusso autofagico. In questo caso, il meccanismo autofagico potrebbe avere un ruolo di "protezione cellulare", essendo innescato in contemporanea allo stress reticolare. Tuttavia, per tempi più lunghi di trattamento, le cellule non riescono a difendersi e vanno incontro a danno genotossico e frammentazione cromatinica, attestati anche dal coinvolgimento dell'istone fosforilato γ -H2AX che viene attivato e dall'incremento di p53. In conclusione, le cellule vanno incontro a morte per apoptosi con decremento dei livelli della pro-caspasi 3 e frammentazione della PARP1. Questi dati sono in accordo con quanto recentemente riportato da Huang et al., in cui in cellule di epatocarcinoma Hep3B e HepJ5 trattate con il MG si innesca inizialmente il processo autofagico con innalzamento dei livelli di markers autofagici, tra cui LC3-II, ma infine si attiva un percorso di morte apoptotico per via intrinseca, con incremento delle forme clivate sia della PARP1 che della caspasi-3 [165]. Complessivamente, sebbene da sottoporre a ulteriori approfondimenti, questi dati illustrano il meccanismo d'azione dell'MPE, sottolineandone l'efficacia antitumorale. Inoltre, è stato identificato il MG come potenziale responsabile degli effetti antiproliferativi dell'intero estratto osservati nelle linee cellulari di carcinoma del colon.

Bibliografia

- [1] Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS PharmSci*, 5(3), 27–28.
- [2] Bonala, S., Gupta, M. K., & Vadde, R. (2020). Functional Foods in the Prevention of Colorectal Cancer. *Critical ReviewsTM in Oncogenesis*, 25(2), 111–128.
- [3] Kapinova, A., Stefanicka, P., Kubatka, P., Zubor, P., Uramova, S., Kello, M., Mojzis, J., Blahutova, D., Qaradakhi, T., Zulli, A., Caprnda, M., Danko, J., Lasabova, Z., Busselberg, D., & Kruzliak, P. (2017). Are plant-based functional foods better choice against cancer than single phytochemicals? A critical review of current breast cancer research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1465–1477.
- [4] Riezzo, G., Chiloiro, M., & Russo, F. (2005). Functional Foods: Salient Features and Clinical Applications. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 5(3), 331–337.
- [5] Gul, K., Singh, A. K., & Jabeen, R. (2015). Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(16), 2617–2627.
- [6] Rani, V., Deep, G., Singh, R. K., Palle, K., & Yadav, U. C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 148, 183–193.
- [7] Leitzmann, C. (2016). Characteristics and Health Benefits of Phytochemicals. *Complementary Medicine Research*, 23(2), 69–74.
- [8] Wiseman, H. (2013). Phytochemicals: Health Effects. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 47–51.
- [9] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306.
- [10] Carter, L. G., D’Orazio, J. A., & Pearson, K. J. (2014). Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), R209–R225.
- [11] Errante, P. R. (2021). Resveratrol and Colorectal Cancer: Focus In vitro, In vivo and Clinical Assays. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 33(4).
- [12] Sánchez-Melgar, A., Muñoz-López, S., Albasanz, J. L., & Martín, M. (2021). Antitumoral Action of Resveratrol Through Adenosinergic Signaling in C6 Glioma Cells. *Frontiers in Neuroscience*, 15.
- [13] Hashimoto, T., He, Z., Ma, W. Y., Schmid, P. C., Bode, A. M., Yang, C. S., & Dong, Z. (2004). Caffeine Inhibits Cell Proliferation by G0/G1Phase Arrest in JB6 Cells. *Cancer Research*, 64(9), 3344–3349.
- [14] Du, G. J., Zhang, Z., Wen, X. D., Yu, C., Calway, T., Yuan, C. S., & Wang, C. Z. (2012). Epigallocatechin Gallate (EGCG) Is the Most Effective Cancer Chemopreventive Polyphenol in Green Tea. *Nutrients*, 4(11), 1679–1691.

- [15] Fujiki, H., Sueoka, E., Watanabe, T., & Suganuma, M. (2014). Synergistic enhancement of anticancer effects on numerous human cancer cell lines treated with the combination of EGCG, other green tea catechins, and anticancer compounds. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(9), 1511–1522.
- [16] Suzuki, R., Kang, Y., Li, X., Roife, D., Zhang, R., & Fleming, J. B. (2014). Genistein potentiates the antitumor effect of 5-Fluorouracil by inducing apoptosis and autophagy in human pancreatic cancer cells. *Anticancer research*, 34(9), 4685–4692.
- [17] Firth, J., Gangwisch, J. E., Borisini, A., Wootton, R. E., & Mayer, E. A. (2020). Food and mood: how do diet and nutrition affect mental wellbeing?. *BMJ (Clinical research ed.)*, 369, m2382. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2382>
- [18] Martinez-Gonzalez, M. A., & Martin-Calvo, N. (2016). Mediterranean diet and life expectancy; beyond olive oil, fruits, and vegetables. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 19(6), 401–407.
- [19] Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. The Development and Causes of Cancer.
- [20] Emanuele, S., Lauricella, M., Calvaruso, G., D’Anneo, A., & Giuliano, M. (2017). Litchi chinensis as a Functional Food and a Source of Antitumor Compounds: An Overview and a Description of Biochemical Pathways. *Nutrients*, 9(9), 992.
- [21] Jain, A., Madu, C. O., & Lu, Y. (2021). Phytochemicals in Chemoprevention: A Cost-Effective Complementary Approach. *Journal of Cancer*, 12(12), 3686–3700.
- [22] Mukherjee, A., Basu, S., Sarkar, N., & Ghosh, A. (2001). Advances in Cancer Therapy with Plant Based Natural Products. *Current Medicinal Chemistry*, 8(12), 1467–1486.
- [23] Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378.
- [24] Ediriweera, M. K., Tennekoon, K. H., & Samarakoon, S. R. (2017). A Review on Ethnopharmacological Applications, Pharmacological Activities, and Bioactive Compounds of *Mangifera indica* (Mango). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–24.
- [25] Shah, K., Patel, M., Patel, R., & Parmar, P. (2010a). *Mangifera Indica* (Mango). *Pharmacognosy Reviews*, 4(7), 42.
- [26] Mirza, B., Croley, C. R., Ahmad, M., Pumarol, J., Das, N., Sethi, G., & Bishayee, A. (2020). Mango (*Mangifera indica* L.): a magnificent plant with cancer preventive and anticancer therapeutic potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–27.
- [27] Jahurul, M., Zaidul, I., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F. Y., Nyam, K. L., Norulaini, N., Sahena, F., & Mohd Omar, A. (2015). Mango (*Mangifera indica* L.) by-products and their valuable components: A review. *Food Chemistry*, 183, 173–180.

- [28] Lauricella, M., Emanuele, S., Calvaruso, G., Giuliano, M., & D'Anne, A. (2017). Multifaceted Health Benefits of *Mangifera indica* L. (Mango): The Inestimable Value of Orchards Recently Planted in Sicilian Rural Areas. *Nutrients*, 9(5), 525.
- [29] Testa, R., Tudisca, S., Schifani, G., di Trapani, A., & Migliore, G. (2018). Tropical Fruits as an Opportunity for Sustainable Development in Rural Areas: The Case of Mango in Small-Sized Sicilian Farms. *Sustainability*, 10(5), 1436.
- [30] Fratianni, A., Adiletta, G., di Matteo, M., Panfili, G., Niro, S., Gentile, C., Farina, V., Cinquanta, L., & Corona, O. (2020). Evolution of Carotenoid Content, Antioxidant Activity and Volatiles Compounds in Dried Mango Fruits (*Mangifera indica* L.). *Foods*, 9(10), 1424.
- [31] Gentile, C., di Gregorio, E., di Stefano, V., Mannino, G., Perrone, A., Avellone, G., Sortino, G., Inglese, P., & Farina, V. (2019). Food quality and nutraceutical value of nine cultivars of mango (*Mangifera indica* L.) fruits grown in Mediterranean subtropical environment. *Food Chemistry*, 277, 471–479.
- [32] Farina, V., D'Asaro, A., Mazzaglia, A., Gianguzzi, G., & Palazzolo, E. (2017a). Chemicalphysical and nutritional characteristics of mature-green and mature-ripe “Kensington Pride” mango fruit cultivated in Mediterranean area during cold storage. *Fruits*, 72(4), 221–229.
- [33] Shah, K., Patel, M., Patel, R., & Parmar, P. (2010b). *Mangifera indica* (Mango). *Pharmacognosy Reviews*, 4(7), 42.
- [34] Ravani, D.C. Joshi, Mango and its by product utilization—a review, *Trends in Post Harvest Technology*, 2013, 1, 55-67
- [35] Ali, M. A., Devi, L. I., Nayan, V., Chanu, K. V., & Ralte, L. (2010). Antioxidant activity of fruits available in Aizawl market of Mizoram, India. *International Journal of Biological and Pharmaceutical*, 1(2), 76–81.
- [36] Corrales-Bernal, A., Maldonado, M. E., Urango, L. A., Franco, M. C., & Rojano, B. A. (2014). Mango de azúcar (*Mangifera indica*), variedad de Colombia: características antioxidantes, nutricionales y sensoriales. *Revista Chilena de Nutrición*, 41(3), 312–318.
- [37] Barreto, J. C., Trevisan, M. T. S., Hull, W. E., Erben, G., de Brito, E. S., Pfundstein, B., Würtele, G., Spiegelhalter, B., & Owen, R. W. (2008). Characterization and Quantitation of Polyphenolic Compounds in Bark, Kernel, Leaves, and Peel of Mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5599–5610.
- [38] Ma X., H. Wu, L. Liu et al., “Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits,” *Scientia Horticulturae*, vol. 129, no. 1, pp. 102–107, 2011
- [39] Berardini N., R. Fezer, J. Conrad, U. Beifuss, R. Carl, and A. Schieber, “Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 5, pp. 1563–1570, 2005

- [40] Stoilova I., S Gargova, D Stoyanova, L Ho, D Stoilova, R Stoyanova Antimicrobial and antioxidant activity of the polyphenol mangiferin *Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry*, 2005
- [41] Delgado-Vargas, A. R. Jimenez, and O. Paredes-L ´ opez, “Nat- ´ ural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 40, no. 3, pp. 173– 289, 2000.
- [42] Woodall, S. W.-M. Lee, R. J. Weesie, M. J. Jackson, and G. Britton, “Oxidation of carotenoids by free radicals: Relationship between structure and reactivity,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1336, no. 1, pp. 33– 42, 1997.
- [43] Gil, I. F. Duarte, I. Delgadillo et al., “Study of the compositional changes of mango during ripening by use of nuclear magnetic resonance spectroscopy,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, no. 5, pp. 1524–1536, 2000.
- [44] Jungalwala and H. R. Cama, “Carotenoids in mango (*Mangifera indica*) fruit,” *Indian Journal of Chemistry*, vol. 1, no. 1, 36 pages, 1963.
- [45] Lalel, Z. Singh, and S. C. Tan, “Aroma volatiles production during fruit ripening of ‘Kensington Pride’ mango,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 27, no. 3, pp. 323–336, 2003.
- [46] G. Ruiz-Montanez, J. A. Ragazzo-S ´ anchez, M. Calder ´ on-San- ´ toyo, G. Velazquez-De La Cruz, J. A. Ram ´ ´ irez De Leon, and A. ´ Navarro-Ocana, “Evaluation of extraction methods for prepara- ´ tive scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.),” *Food Chemistry*, vol. 159, pp. 267–272, 2014.
- [47] Sahdeo Prasad, Neetu Kalra, Madhulika Singh, Yogeshwer Shukla Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice *Asian Journal of Andrology* 2008; 10 (2): 313–318
- [48] Engels, M. Knodler, Y.-Y. Zhao, R. Carle, M. G. G ´ anzle, and A. ´ Schieber, “Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 17, pp. 7712– 7718, 2009.
- [49] Ornelas-Paz, E. M. Yahia, and A. Gardea-Bejar, “Idenntification and quantification of xanthophyll esters, carotenes, and tocopherols in the fruit of seven Mexican mango cultivars by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time-of-flight mass spectrometry [LC-(APCI+) - MS],” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 16, pp. 6628–6635, 2007
- [50] Martin Masibo & Qian Mango Bioactive Compounds and Related Nutraceutical Properties—A Review *Food reviews International* 2009 Pages 346-370

- [51] Sferrazzo, G.; Palmeri, R.; Vanella, L.; Parafati, L.; Ronsisvalle, S.; Biondi, A.; Basile, F.; Li Volti, G.; Barbagallo, I. *Mangifera indica* L. Leaf Extract Induces Adiponectin and Regulates Adipogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3211.
- [52] Abbasi, F. Liu, X. Guo, X. Fu, T. Li, and R. H. Liu, "Phytochemical composition, cellular antioxidant capacity and antiproliferative activity in mango (*Mangifera indica* L.) pulp and peel," *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 52, no. 3, pp. 817–826, 2017
- [53] Kim H., H. Kim, A. Mosaddik, R. Gyawali, K. S. Ahn, and S. K. Cho, "Induction of apoptosis by ethanolic extract of mango peel and comparative analysis of the chemical constituents of mango peel and flesh," *Food Chemistry*, vol. 133, no. 2, pp. 416–422, 2012
- [54] Noratto G.D., M. C. Bertoldi, K. Krenek, S. T. Talcott, P. C. Stringheta, and S. U. Mertens-Talcott, "Anticarcinogenic effects of polyphenolics from mango (*Mangifera indica*) varieties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 58, no. 7, pp. 4104–4112, 2010
- [55] Prasad S., N. Kalra, and Y. Shukla, "Induction of apoptosis by lupeol and mango extract in mouse prostate and LNCaP cells," *Nutrition and Cancer*, vol. 60, no. 1, pp. 120–130, 2007
- [56] Banerjee N., H. Kim, K. Krenek, S. T. Talcott, and S. U. Mertens Talcott, "Mango polyphenolics suppressed tumor growth in breast cancer xenografts in mice: Role of the PI3K/AKT pathway and associated microRNAs," *Nutrition Research*, vol. 35, no. 8, pp. 744–751, 2015.
- [57] Corrales-Bernal, L. A. Urango, B. Rojano, and M. E. Maldonado, "In vitro and in vivo effects of mango pulp (*Mangifera indica* cv. Azucar) in colon carcinogenesis," *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, vol. 64, no. 1, pp. 16–23, 2014.
- [58] Abdullah A, A. S. Mohammed, A. Rasedee, M. E. S. Mirghani, and M. S. Al-Qubaisi, "Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 15, no. 1, article no. 45, 2015.
- [59] Nguyen H.X., T. N. V. Do, T. H. Le et al., "Chemical Constituents of *Mangifera indica* and Their Antiausterity Activity against the PANC-1 Human Pancreatic Cancer Cell Line," *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 8, pp. 2053–2059, 2016.
- [60] Ediriweera, K. Tennekoon, S. Samarakoon, I. Thabrew, and E. de Silva, "Cytotoxic and apoptotic effects of the bark of two common mango (*Mangifera indica*) varieties from sri lanka on breast and ovarian cancer cells," *British Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 10, no. 2, pp. 1–7, 2016
- [61] Ganogpichayagrai, C. Palanuvej, and N. Ruangrunsi, "Antidiabetic and anticancer activities of *Mangifera indica* cv. Okrong leaves," *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, vol. 8, no. 1, pp. 19–24, 2017

- [62] J. Nunez Selles, M. Daglia, and L. Rastrelli, "The potential role" of mangiferin in cancer treatment through its immunomodulatory, anti-angiogenic, apoptotic, and gene regulatory effects," *BioFactors*, vol. 42, no. 5, pp. 475–491, 2016
- [63] Balchen, V., & Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging, Volume 11*, 967–976.
- [64] Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1).
- [65] Geiger, T. M. (2018). Colorectal Cancer Screening and Diagnosis: A Patient-Centered Approach to Understanding Avoidance. *Diseases of the Colon & Rectum*, 61(4), 417–418.
- [66] Kosmider, S. (2007). Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 13(28), 3799.
- [67] Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).
- [68] Nirmala, J. G., & Lopus, M. (2019). Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*, 36(2), 145–164.
- [69] Green, D. R., & Llamby, F. (2015). Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(12)
- [70] Iurlaro, R., & Muñoz-Pinedo, C. (2015). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS Journal*, 283(14), 2640–2652.
- [71] Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3460–3470.
- [72] Yun, C., & Lee, S. (2018). The Roles of Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3466
- [73] Codogno, P., & Meijer, A. J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death & Differentiation*, 12(S2), 1509–1518.
- [74] Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(3), 460–473.
- [75] Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z., Pollera, M., & Bergamini, E. (2001). The protection of rat liver autophagic proteolysis from the age-related decline co-varies with the duration of anti-ageing food restriction. *Experimental Gerontology*, 36(3), 497–506.
- [76] Terman, A., & Brunk, U. T. (2004). Aging as a catabolic malfunction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2365–2375.

- [77] Thukral, L., Sengupta, D., Ramkumar, A., Murthy, D., Agrawal, N., & Gokhale, R. (2015). The Molecular Mechanism Underlying Recruitment and Insertion of Lipid-Anchored LC3 Protein into Membranes. *Biophysical Journal*, 109(10), 2067–2078.
- [78] Naponelli, V., Modernelli, A., Bettuzzi, S., & Rizzi, F. (2015). Roles of Autophagy Induced by Natural Compounds in Prostate Cancer. *BioMed Research International*, 2015, 1–14.
- [79] Katsuragi, Y., Ichimura, Y., & Komatsu, M. (2015). p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS Journal*, 282(24), 4672–4678.
- [80] Galluzzi, L., Kepp, O., Trojel-Hansen, C., & Kroemer, G. (2012). Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death. *Circulation Research*, 111(9), 1198–1207.
- [81] Shadel, G.S.; Horvath, T.L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* 2015, 163, 560–569.
- [82] Mazat, J.-P.; Devin, A.; Ransac, S. Modelling Mitochondrial ROS Production by the Respiratory Chain. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020, 77, 455–465.
- [83] Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239–247.
- [84] Bienertova-Vasku, J.; Lenart, P.; Scherlinger, M. Eustress and Distress: Neither Good Nor Bad, but Rather the Same? *BioEssays* 2020, 42, 1900238.
- [85] Klaunig, J. E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116–121.
- [86] Tong, L.; Chuang, C.-C.; Wu, S.; Zuo, L. Reactive Oxygen Species in Redox Cancer Therapy. *Cancer Lett.* 2015, 367, 18–25.
- [87] Farhood, B.; Najafi, M.; Salehi, E.; Hashemi Goradel, N.; Nashtaei, M.S.; Khanlarkhani, N.; Mortezaee, K. Disruption of the Redox Balance with Either Oxidative or Anti-oxidative Overloading as a Promising Target for Cancer Therapy. *J. Cell. Biochem.* 2019, 120, 71–76.
- [88] Ly, J. D., Grubb, D. R., & Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *APOPTOSIS*, 8(2), 115–128.
- [89] Novo, N.; Ferreira, P.; Medina, M. The Apoptosis-inducing Factor Family: Moonlighting Proteins in the Crosstalk between Mitochondria and Nuclei. *IUBMB Life* 2021, 73, 568–581
- [90] Lebaka, V.R.; Wee, Y.-J.; Ye, W.; Korivi, M. Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Three Different Parts of Mango Fruit. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 741
- [91] Ediriweera, M.K.; Tennekoon, K.H.; Samarakoon, S.R. A Review on Ethnopharmacological Applications, Pharmacological Activities, and Bioactive

Compounds of *Mangifera Indica* (Mango). *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017, 2017, 1–24

- [92] Abbasi, A.; Guo, X.; Fu, X.; Zhou, L.; Chen, Y.; Zhu, Y.; Yan, H.; Liu, R. Comparative Assessment of Phenolic Content and in Vitro Antioxidant Capacity in the Pulp and Peel of Mango Cultivars. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 13507–13527.
- [93] Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6).
- [94] Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., & Shellman, Y. G. (2005). A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology*, 5(1).
- [95] Ly, J. D., Grubb, D. R., & Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *APOPTOSIS*, 8(2), 115–128.
- [96] Dimauro, I., Pearson, T., Caporossi, D., & Jackson, M. J. (2012). A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Research Notes*, 5(1).
- [97] Moser, M.; Schneider, R.; Behnke, T.; Schneider, T.; Falkenhagen, J.; Resch-Genger, U. Ellman's and Aldrithiol Assay as Versatile and Complementary Tools for the Quantification of Thiol Groups and Ligands on Nanomaterials. *Anal. Chem.* 2016, 88, 8624–8631.
- [98] De Almeida, L.C.; Bauermeister, A.; Rezende-Teixeira, P.; dos Santos, E.A.; de Moraes, L.A.B.; Machado-Neto, J.A.; Costa-Lotufo, L.V. Pradimicin-IRD exhibits antineoplastic effects by inducing DNA damage in colon cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 2019, 168, 38–47
- [99] Xing, S.-G.; Zhang, K.-J.; Qu, J.-H.; Ren, Y.-D.; Luan, Q. Propofol induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells via ERK1/2-dependent upregulation of PUMA. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018, 4341–4349.
- [100] Huang, Y.; Li, W.; Su, Z.; Kong, A.-N.T. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *J. Nutr. Biochem.* 2015, 26, 1401–1413.
- [101] Emanuele, S.; D'Anneo, A.; Calvaruso, G.; Cernigliaro, C.; Giuliano, M.; Lauricella, M. The Double-Edged Sword Profile of Redox Signaling: Oxidative Events as Molecular Switches in the Balance between Cell Physiology and Cancer. *Chem. Res. Toxicol.* 2018, 31, 201–210.
- [102] Kükürt, A.; Gelen, V.; Faruk Başer, Ö.; Ahmet Deveci, H.; Karapehlivan, M. Thiols: Role in Oxidative Stress-Related Disorders. In *Lipid Peroxidation*; IntechOpen: London, UK, 2021. Available online: <http://www.intechopen.com/online-first/thiols-role-in-oxidative-stress-related-disorders> (accessed on 20 March 2021).
- [103] Camara, A.K.S.; Zhou, Y.; Wen, P.-C.; Tajkhorshid, E.; Kwok, W.-M. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Front. Physiol.* 2017, 8, 460.

- [104] Von der Malsburg, K.; Müller, J.M.; Bohnert, M.; Oeljeklaus, S.; Kwiatkowska, P.; Becker, T.; Loniewska-Lwowska, A.; Wiese, S.; Rao, S.; Milenkovic, D.; et al. Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis. *Dev. Cell* 2011, 21, 694–707.
- [105] Tong, J.; Wang, P.; Tan, S.; Chen, D.; Nikolovska-Coleska, Z.; Zou, F.; Yu, J.; Zhang, L. Mcl-1 Degradation Is Required for Targeted Therapeutics to Eradicate Colon Cancer Cells. *Cancer Res.* 2017, 77, 2512–2521.
- [106] Liu, K.; Liu, P.; Liu, R.; Wu, X. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 2015, 21, 15–20.
- [107] Kelly, K.J.; Sandoval, R.M.; Dunn, K.W.; Molitoris, B.A.; Dagher, P.C. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am. J. Physiol. -Cell Physiol.* 2003, 284, C1309–C1318.
- [108] Kuo, L.J.; Yang, L.-X. Gamma-H2AX—A novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece* 2008, 22, 305–309. 39. Sluss, H.K.; Davis, R.J. H2AX Is a Target of the JNK Signaling Pathway that Is Required for Apoptotic DNA Fragmentation. *Mol. Cell* 2006, 23, 152–153
- [109] Nikolova, T.; Dvorak, M.; Jung, F.; Adam, I.; Krämer, E.; Gerhold-Ay, A.; Kaina, B. The γ H2AX Assay for Genotoxic and Nongenotoxic Agents: Comparison of H2AX Phosphorylation with Cell Death Response. *Toxicol. Sci.* 2014, 140, 103–117
- [110] Djelloul, S.; Forgue-Lafitte, M.-E.; Hermelin, B.; Mareel, M.; Bruyneel, E.; Baldi, A.; Giordano, A.; Chastre, E.; Gespach, C. Enterocyte differentiation is compatible with SV40 large T expression and loss of p53 function in human colonic Caco-2 cells: Status of the pRb1 and pRb2 tumor suppressor gene products. *FEBS Lett.* 1997, 406, 234–242.
- [111] Ray, R.M.; McCormack, S.A.; Johnson, L.R. Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001, 281, G37–G43.
- [112] Trainer, D.L.; Kline, T.; McCabe, F.L.; Faucette, L.F.; Feild, J.; Chaikin, M.; Anzano, M.; Rieman, D.; Hoffstein, S.; Li, D.J. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer* 1988, 41, 287–296.
- [113] Maldonado-Celis, M. E., Yahia, E. M., Bedoya, R., Landázuri, P., Loango, N., Aguillón, J., Restrepo, B., & Guerrero Ospina, J. C. (2019). Chemical Composition of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit: Nutritional and Phytochemical Compounds. *Frontiers in plant science*, 10, 1073.
- [114] Berardini, N.; Carle, R.; Schieber, A. Characterization of gallotannins and benzophenone derivatives from mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tommy Atkins”) peels, pulp and kernels by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18, 2208–2216.

- [115] Lu, Z.; Nie, G.; Belton, P.S.; Tang, H.; Zhao, B. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochem. Int.* 2006, 48, 263–274. *Antioxidants* 2019, 8, 422 20 of 21 31.
- [116] Da Silva, S.L.; Chaar, J. da S.; Yano, T. Chemotherapeutic potential of two gallic acid derivative compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). *Eur. J. Pharmacol.* 2009, 608, 76–83
- [117] Biederbick A, Kern HF, Elsässer HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol.* 1995 Jan;66(1):3-14
- [118] Zheng, Y. Z., Cao, Z. G., Hu, X., & Shao, Z. M. (2014). The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 145(2), 349–358.
- [119] Fuest, M., Willim, K., MacNelly, S., Fellner, N., Resch, G. P., Blum, H. E., & Hasselblatt, P. (2011). The transcription factor c-Jun protects against sustained hepatic endoplasmic reticulum stress thereby promoting hepatocyte survival. *Hepatology*, 55(2), 408–418.
- [120] Hasler, C.M. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the *American Council on Science and Health*. *J. Nutr.* 2002, 132, 3772–3781.
- [121] Battino M, Forbes-Hernández TY, Gasparrini M, Afrin S, Cianciosi D, Zhang J, Manna PP, Reboredo-Rodríguez P, Varela Lopez A, Quiles JL, Mezzetti B, Bompadre S, Xiao J, Giampieri F. Relevance of functional foods in the Mediterranean diet: the role of olive oil, berries and honey in the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(6):893-920.
- [122] Lebaka, V.R.; Wee, Y.-J.; Ye, W.; Korivi, M. Nutritional Composition and Bioactive Compounds in Three Different Parts of Mango Fruit. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 741.
- [123] Mirza, B.; Croley, C.R.; Ahmad, M.; Pumarol, J.; Das, N.; Sethi, G.; Bishayee, A. Mango (*Mangifera Indica* L.): A Magnificent Plant with Cancer Preventive and Anticancer Therapeutic Potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021, 61, 2125–2151.
- [124] Oliveira, R.M.; Dutra, T.S.; Simionatto, E.; Ré, N.; Kassuya, C.A.L.; Cardoso, C.A.L. Anti-Inflammatory Effects of Essential Oils from *Mangifera Indica*. *Genet. Mol. Res.* 2017, 16, 1.
- [125] Kim, H.; Venancio, V.P.; Fang, C.; Dupont, A.W.; Talcott, S.T.; Mertens-Talcott, S.U. Mango (*Mangifera Indica* L.) Polyphenols Reduce IL-8, GRO, and GM-SCF Plasma Levels and Increase *Lactobacillus* Species in a Pilot Study in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Nutr. Res.* 2020, 75, 85–94.
- [126] Batool, N.; Ilyas, N.; Shabir, S.; Saeed, M.; Mazhar, R. A Mini-Review of Therapeutic Potential of *Mangifera Indica* L. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2018, 31, 1441–1448.

- [127] Wu, X.; Xiong, M.; Xu, C.; Duan, L.; Dong, Y.; Luo, Y.; Niu, T.; Lu, C. Resveratrol induces apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cells in vitro through p38 and JNK-regulated H2AX phosphorylation. *Acta Pharmacol. Sin.* 2015, 36, 353–361.
- [128] Xing, S.-G.; Zhang, K.-J.; Qu, J.-H.; Ren, Y.-D.; Luan, Q. Propofol induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells via ERK1/2-dependent upregulation of PUMA. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018, 4341–4349.
- [129] Wu, S.; Lu, H.; Bai, Y. Nrf2 in cancers: A double-edged sword. *Cancer Med.* 2019, 8, 2252–2267.
- [130] Woo, Y.; Oh, J.; Kim, J.-S. Suppression of Nrf2 Activity by Chestnut Leaf Extract Increases Chemosensitivity of Breast Cancer Stem Cells to Paclitaxel. *Nutrients* 2017, 9, 760.
- [131] Huang, Y.; Li, W.; Su, Z.; Kong, A.-N.T. The complexity of the Nrf2 pathway: Beyond the antioxidant response. *J. Nutr. Biochem.* 2015, 26, 1401–1413.
- [132] Pall, M.L.; Levine, S. Nrf2, a master regulator of detoxification and also antioxidant, anti-inflammatory and other cytoprotective mechanisms, is raised by health promoting factors. *Sheng Li Xue Bao* 2015, 67, 1–18.
- [133] Ly J.D., D.R. Grubb, A. Lawen, The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update, *Apoptosis*, 2003, 115-128
- [134] Daugas, E.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Ferri, K.F.; Irinopoulou, T.; Larochette, N.; Prévost, M.C.; Leber, B.; Andrews, D.; Penninger, J.; et al. Mitochondrio-Nuclear Translocation of AIF in Apoptosis and Necrosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2000, 14, 729–739
- [135] Madungwe, N.B.; Feng, Y.; Lie, M.; Tombo, N.; Liu, L.; Kaya, F.; Bopassa, J.C. Mitochondrial Inner Membrane Protein (Mitofilin) Knockdown Induces Cell Death by Apoptosis via an AIF-PARP-Dependent Mechanism and Cell Cycle Arrest. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018, 315, C28–C43.
- [136] Maldonado E.N., K.L. Sheldon, D.N. Dehart, J. Patnaik, Y. Manevich, D.M. Townsend, S.M. Bezrukov, T.K. Rostovtseva, J.J. Lemasters. Voltage-dependent anion channels modulate mitochondrial metabolism in cancer cells: Regulation by free tubulin and erastin, *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288, 11920-11929
- [137] Paull, T.T.; Rogakou, E.P.; Yamazaki, V.; Kirchgessner, C.U.; Gellert, M.; Bonner, W.M. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol. CB* 2000, 10, 886–895.
- [138] Solier, S.; Pommier, Y. The nuclear γ -H2AX apoptotic ring: Implications for cancers and autoimmune diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014, 71, 2289–2297
- [139] Sekhar, S.; Venkatesh, J.; Cheriyan, V.; Muthu, M.; Levi, E.; Assad, H.; Meister, P.; Undyala, V.; Gauld, J.; Rishi, A. A H2AX–CARP-1 Interaction Regulates Apoptosis Signaling Following DNA Damage. *Cancers* 2019, 11, 221.

- [140] Martínez-Fábregas, J.; Díaz-Moreno, I.; González-Arzola, K.; Janocha, S.; Navarro, J.A.; Hervás, M.; Bernhardt, R.; VelázquezCampoy, A.; Díaz-Quintana, A.; De la Rosa, M.A. Structural and Functional Analysis of Novel Human Cytochrome c Targets in Apoptosis. *Mol. Cell. Proteom.* 2014, 13, 1439–1456.
- [141] Díaz-Moreno, I.; Velázquez-Cruz, A.; Curran-French, S.; Díaz-Quintana, A.; De la Rosa, M.A. Nuclear Cytochrome c—A Mitochondrial Visitor Regulating Damaged Chromatin Dynamics. *FEBS Lett.* 2018, 592, 172–178.
- [142] Yang, R.; Zhao, G.; Liang, S.; Zhang, Y.; Sun, L.; Chen, H.; Liu, D. Mitofilin Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis by Controlling Mitochondrial Cristae Remodeling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 428, 93–98.
- [143] Yao, Y., Luong, T., Lepik, M., Aftab, N., Fong, V., & Vieira, A. (2012). Synergism of antioxidant phytochemicals: comparison among purified polyphenols and dietary-plant extracts. *Acta Horticulturae*, 939, 121–127
- [144] Masibo M., Q. He, Major Mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health, Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety, 2008, 7, 309- 319
- [145] Sun G., S. Zhang, Y. Xie, Z. Zhang, W. Zhao, Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells, *Oncology letters*, 2016, 11, 150-158
- [146] L. Pan, A. Wang, Y. Huang, Y. Luo, M. Ling, Mangiferin Induces Apoptosis by Regulating Bcl-2 and Bax Expression in the CNE2 Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line, *Asian Pacific Journal Cancer of Prevention*, 15, 7065-7068
- [147] Fan, X., Zhou, J., Yan, X., Bi, X., Liang, J., Lu, S., Luo, L., Zhou, D., & Yin, Z. (2021). Citrate activates autophagic death of prostate cancer cells via downregulation CaMKII/AKT/mTOR pathway. *Life Sciences*, 275, 119355.
- [148] Lu Y, Zhang X, Zhang H, Lan J, Huang G, Varin E, Lincet H, Poulain L, Icard P. Citrate induces apoptotic cell death: a promising way to treat gastric carcinoma? *Anticancer Res.* 2011 Mar;31(3):797-805
- [149] Ying TH, Chen CW, Hsiao YP, Hung SJ, Chung JG, Yang JH. Citric acid induces cell-cycle arrest and apoptosis of human immortalized keratinocyte cell line (HaCaT) via caspase- and mitochondrial-dependent signaling pathways. *Anticancer Res.* 2013 Oct;33(10):4411-20
- [150] Shaikh, Q. U. A., Yang, M., Memon, K. H., Lateef, M., Na, D., Wan, S., Eric, D., Zhang, L., & Jiang, T. (2016). 1,2,3,4,6-Pentakis[-O-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)]- α,β -D-glucopyranose (PGG) analogs: design, synthesis, anti-tumor and anti-oxidant activities. *Carbohydrate Research*, 430, 72–81.
- [151] Sánchez-Tena, S., Fernández-Cachón, M. L., Carreras, A., Mateos-Martín, M. L., Costoya, N., Moyer, M. P., Nuñez, M. J., Torres, J. L., & Cascante, M. (2012). Hamamelitannin from Witch Hazel (*Hamamelis virginiana*) Displays Specific

Cytotoxic Activity against Colon Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 75(1), 26–33

- [152] Hu H, Chai Y, Wang L, Zhang J, Lee HJ, Kim SH, Lü J. Pentagalloylglucose induces autophagy and caspase-independent programmed deaths in human PC-3 and mouse TRAMP-C2 prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2009 Oct;8(10):2833-43.
- [153] Jaszewska E, Kosmider A, Kiss AK, Naruszewicz M. Oenothera paradoxa defatted seeds extract containing pentagalloylglucose and procyanidins potentiates the cytotoxicity of vincristine. *J Physiol Pharmacol.* 2010 Oct;61(5):637-43
- [154] Oh GS, Pae HO, Oh H, Hong SG, Kim IK, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. In vitro antiproliferative effect of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose on human hepatocellular carcinoma cell line, SK-HEP-1 cells. *Cancer Lett.* 2001 Dec 10;174(1):17-24.
- [155] Abou-Zaid, M. M., Lombardo, D. A., & Nozzolillo, C. (2009). Methyl gallate is a natural constituent of maple (Genus Acer) leaves. *Natural Product Research*, 23(15), 1373–1377.
- [156] R. Chaubal, V.H. Deshapande, N.R. Deshpande, Methyl gallate, the medicinally important compound: a review, *J. Environ. Agric. Food Chem.* 4 (2005) 956–962.
- [157] Lee, J. K. (2013). Anti-Depressant Like Effect of Methyl Gallate Isolated from Acer barbinervein Mice. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 17(5), 441.
- [158] Correa, L. B., Pádua, T. A., Seito, L. N., Costa, T. E. M. M., Silva, M. A., Candéa, A. L. P., Rosas, E. C., & Henriques, M. G. (2016). Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. *Journal of Natural Products*, 79(6), 1554–1566
- [159] T.J. Hsieh, T.Z. Liu, Y.C. Chia, C.L. Chern, F.J. Lu, M.C. Chuang, S.Y. Mau, S.H. Chen, Y.H. Syu, C.H. Chen, Protective effect of methyl gallate from Toona sinensis (Meliaceae) against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and DNA damage in MDCK cells. *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 843–850.
- [160] Afsar, T., Trembley, J. H., Salomon, C. E., Razak, S., Khan, M. R., & Ahmed, K. (2016). Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of Acacia hydaspica: Involvement of multiple signal transduction pathways. *Scientific Reports*, 6(1).
- [161] Rahim, A. C., Bakar, M. A., Kassim, N., Stanslas, J., & Mohamad Zain, W. W. (2018). Selective Cytotoxic Activity of Methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate Isolated from Kernel of Bambangan (Mangifera pajang). *Asian Journal of Chemistry*, 30(10), 2273–2276.
- [162] Lee, S. H., Kim, J. K., Kim, D. W., Hwang, H. S., Eum, W. S., Park, J., Han, K. H., Oh, J. S., & Choi, S. Y. (2013). Antitumor activity of methyl gallate by inhibition

of focal adhesion formation and Akt phosphorylation in glioma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(8), 4017–4029.

- [163] Mandal, N., Chaudhuri, D., Ghate, N., & Singh, S. (2015b). Methyl gallate isolated from *Spondias pinnata* exhibits anticancer activity against human glioblastoma by induction of apoptosis and sustained extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. *Pharmacognosy Magazine*, 11(42), 269.
- [164] Kamatham, S., Kumar, N., & Gudipalli, P. (2015). Isolation and characterization of gallic acid and methyl gallate from the seed coats of *Givotia rottleriformis* Griff. and their anti-proliferative effect on human epidermoid carcinoma A431 cells. *Toxicology Reports*, 2, 520–529
- [165] Huang, C. Y., Chang, Y. J., Wei, P. L., Hung, C. S., & Wang, W. (2021). Methyl gallate, gallic acid-derived compound, inhibit cell proliferation through increasing ROS production and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *PLOS ONE*, 16(3).
- [166] Ahmad, S., Sukari, M. A., Ismail, N., Ismail, I. S., Abdul, A. B., Abu Bakar, M. F., Kifli, N., & Ee, G. C. L. (2015). Phytochemicals from *Mangifera pajang* Kosterm and their biological activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1).
- [167] Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Aug;10(8):1343-74.
- [168] Wang Y, Wang K, Jin Y, Sheng X. Endoplasmic reticulum proteostasis control and gastric cancer. *Cancer Lett*. 2019 May 1; 449:263-271.
- [169] Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*. 2015 Nov 2;11(11):1956-1977.
- [170] Mizushima N. The role of the ATG1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):132-9.