



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

**Dipartimento di Biologia e Biotecnologie  
“L. Spallanzani”**

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dallo scarto agricolo al potenziale terapeutico:  
valorizzazione dei residui di potatura di *Vitis vinifera*  
nel trattamento del glioblastoma e del tumore  
al seno triplo negativo *in vitro*

Relatore:

*Prof.ssa Paola Rossi*

Correlatore:

*Dott.ssa Daniela Ratto*

Tesi Sperimentale di  
*Esi Mucaj*

Anno Accademico 2025/2026

## INDICE

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUZIONE</b>                                                                                | <b>3</b>  |
| 1.1 Dalle caratteristiche del cancro allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche                    | 3         |
| 1.2 Glioblastoma                                                                                      | 4         |
| 1.2.1 Epidemiologia e caratteristiche biologiche                                                      | 4         |
| 1.2.2 Prognosi e limiti terapeutici                                                                   | 5         |
| 1.2.3 La linea cellulare U251 come modello sperimentale                                               | 6         |
| 1.3 Carcinoma mammario triplo negativo -TNBC                                                          | 8         |
| 1.3.1 Epidemiologia e caratteristiche biologiche                                                      | 8         |
| 1.3.2 Prognosi e limiti delle terapie disponibili                                                     | 9         |
| 1.3.3 La linea cellulare 4T1 come modello sperimentale                                                | 10        |
| 1.4 Sottoprodotti di <i>Vitis vinifera</i> come fonte di composti bioattivi                           | 11        |
| 1.4.1 <i>Vitis vinifera</i> e i sottoprodotti della filiera vitivinicola                              | 11        |
| 1.4.2 Valorizzazione del legno di potatura                                                            | 13        |
| 1.4.3 Principali metaboliti bioattivi: polifenoli e stilbeni                                          | 14        |
| 1.4.4 (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina                                                  | 15        |
| 1.4.5 Fitocomplesso e possibili interazioni tra i metaboliti                                          | 17        |
| 1.5 Meccanismi molecolari coinvolti nelle attività biologiche degli estratti di <i>Vitis vinifera</i> | 17        |
| 1.5.1 Apoptosi: la via intrinseca                                                                     | 18        |
| 1.5.2 Il ruolo del rapporto Bax/Bcl-2                                                                 | 18        |
| 1.5.3 Attivazione della caspasi-3 come evento terminale dell'apoptosi                                 | 19        |
| 1.5.4 Attività antiossidante                                                                          | 20        |
| <b>2. SCOPO DEL LAVORO</b>                                                                            | <b>21</b> |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b>                                                                          | <b>23</b> |
| 3.1 Materiale vegetale                                                                                | 23        |
| 3.2 Procedura di estrazione                                                                           | 23        |
| 3.3 Linee cellulari                                                                                   | 24        |
| 3.4 Determinazione della citotossicità mediante saggi MTT e Trypan Blue                               | 25        |
| 3.4.1 Saggio MTT                                                                                      | 25        |
| 3.4.2 Saggio Trypan Blue                                                                              | 27        |
| 3.5 Saggio clonogenico                                                                                | 28        |
| 3.6 Valutazioni di immunofluorescenza                                                                 | 30        |
| 3.7 Saggio di valutazione dell'attività antiossidante cellulare                                       | 32        |
| 3.8 Analisi statistica                                                                                | 34        |
| <b>4. RISULTATI</b>                                                                                   | <b>36</b> |

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>4.1 Valutazione dell'attività citotossica degli estratti di legno di potatura di <i>Vitis vinifera</i></b> .....                                         | 36 |
| <b>4.1.1 Valutazione della citotossicità dose- e tempo- dipendente degli estratti di legno di potatura di <i>Vitis vinifera</i> in cellule di GBM</b> ..... | 36 |
| <b>4.1.2 Contributo di (E)- resveratrolo ed (E) – ε- viniferina all'attività citotossica</b> .....                                                          | 38 |
| <b>4.1.3 Attività citotossica dei campioni 3A e 3B nelle linee cellulari tumorali e non tumorali.</b> .....                                                 | 39 |
| <b>4.1.4 Conferma dell'attività citotossica di 3A e 3B mediante saggio Trypan Blue</b> .....                                                                | 42 |
| <b>4.2 Analisi dell'effetto di 3A e 3B sulla capacità clonogenica delle cellule U251 e 4T1</b> .....                                                        | 44 |
| <b>4.3 Attivazione della via apoptotica nelle cellule tumorali trattate con i campioni 3A e 3B</b> .....                                                    | 49 |
| <b>4.3.1 Modulazione del rapporto Bax/Bcl-2</b> .....                                                                                                       | 49 |
| <b>4.3.2 Attivazione della Caspasi-3 clivata</b> .....                                                                                                      | 51 |
| <b>4.4 Valutazione dell'attività antiossidante dell'estratto 3A e della frazione 3B</b> .....                                                               | 53 |
| <b>5. DISCUSSIONE</b> .....                                                                                                                                 | 55 |
| <b>6. CONCLUSIONI</b> .....                                                                                                                                 | 59 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....                                                                                                                                   | 60 |

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Dalle caratteristiche del cancro allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche

Negli ultimi decenni, la medicina oncologica ha compiuto progressi straordinari nell'ambito della prevenzione, della diagnosi e del trattamento. Ciò nonostante, il cancro continua a rappresentare una delle sfide più complesse e urgenti per la salute pubblica globale. A conferma del costante impatto di queste patologie, le stime più recenti del Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) indicano che nel 2022 si sono registrati oltre 20 milioni di nuovi casi e circa 10 milioni di decessi (Bray et al., 2024).

Il termine cancro descrive un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate sia da un accumulo di alterazioni genetiche che epigenetiche, le quali, sviluppandosi in modo progressivo, consentono alle cellule trasformate di sfuggire ai meccanismi di controllo della proliferazione e di acquisire un vantaggio selettivo rispetto alle cellule sane. In aggiunta, nelle fasi più avanzate, possono promuovere l'angiogenesi, invadere i tessuti circostanti e colonizzare organi distanti attraverso il processo metastatico (Hanahan, 2022).

I progressi nella comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la cancerogenesi hanno favorito lo sviluppo di approcci terapeutici sempre più specifici, come radioterapia, chirurgia, terapie a bersaglio molecolare, chemioterapia e immunoterapia (Zafar et al., 2024). Nonostante i progressi ottenuti nel migliorare la sopravvivenza dei pazienti affetti da numerose neoplasie, la loro efficacia rimane ancora limitata. Infatti, nei tumori più aggressivi, le cellule tumorali sono in grado di attivare meccanismi *pro-survival* che ne favoriscono l'adattamento alla pressione selettiva esercitata dai trattamenti farmacologici. Questo adattamento si realizza attraverso l'aumento dei sistemi di efflusso dei farmaci, la modificazione dei bersagli molecolari e l'inibizione dei processi apoptotici, fattori che determinano l'insorgenza di chemioresistenza e, di conseguenza, favoriscono la recidiva e la progressione della malattia (Holohan et al., 2013; Vasan et al., 2019).

A ciò si aggiunge la limitata selettività di molte terapie convenzionali, che colpiscono senza distinzione anche le cellule sane caratterizzate da una elevata attività proliferativa, come quelle dei tessuti fisiologicamente ad alto turnover: mucosa gastrointestinale, midollo osseo e follicoli piliferi. Questa mancanza di selettività causa effetti indesiderati che possono limitare la continuazione del trattamento alle dosi ottimali e comprometterne la qualità di vita (Longley & Johnston, 2005; Nurgali et al., 2018).

Per questi motivi, la ricerca oncologica è sempre più orientata verso l'identificazione di molecole capaci di colpire in modo selettivo le cellule neoplastiche. In tale prospettiva, i prodotti naturali rappresentano una risorsa di particolare interesse: una quota rilevante dei farmaci antitumorali introdotti in clinica negli ultimi decenni deriva, infatti, direttamente o indirettamente da metaboliti naturali, come dimostrano i polifenoli, i tassani, i derivati della camptotecina e gli alcaloidi della vinca (Newman & Cragg, 2020; Cory et al., 2018; Montané et al., 2020).

In questo quadro si inserisce l'interesse verso *Vitis vinifera*, una delle principali fonti naturali di stilbeni bioattivi e polifenoli, i cui estratti hanno mostrato proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e antitumorali e che ne fanno un promettente oggetto di studio per nuove strategie antitumorali.

## **1.2 Glioblastoma**

### **1.2.1 Epidemiologia e caratteristiche biologiche**

Il glioblastoma (GBM) è uno dei tumori più aggressivi del sistema nervoso centrale e rappresenta il tumore cerebrale maligno più frequente nell'adulto, costituendo circa la metà delle neoplasie maligne dell'encefalo. Colpisce prevalentemente le persone in età avanzata e presenta una frequenza maggiore negli uomini, con un tasso di 4,07 casi per 100.000 abitanti, rispetto ai 2,60 casi per 100.000 abitanti osservati nelle donne (Price et al., 2025). Negli ultimi anni, l'evoluzione delle conoscenze sui meccanismi molecolari coinvolti nella malattia ha ridefinito la classificazione del GBM. Infatti, secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del 2021, il termine GBM definisce un glioma diffuso dell'adulto di tipo IDH-wildtype, ovvero privo di mutazioni nei geni IDH1 e IDH2. Al contrario, i tumori che presentano tali mutazioni, precedentemente assimilati ai GBM, sono oggi riclassificati come astrocitomi IDH-mutati di grado 4, poiché presentano caratteristiche biologiche e cliniche differenti (Louis et al., 2021).

Dal punto di vista istologico, il GBM è caratterizzato dalla presenza di aree di necrosi, da un'elevata proliferazione cellulare e da una marcata neoangiogenesi, ovvero dalla formazione di numerosi vasi sanguigni di nuova sintesi, seppur strutturalmente anomali e disfunzionali. Questo processo viene attivamente stimolato dal tumore al fine di garantire l'apporto di ossigeno e nutrienti necessario a sostenerne la rapida crescita (Chen & Hambardzumyan, 2018).

Un'altra caratteristica importante di questa neoplasia è la sua capacità di infiltrarsi nel tessuto cerebrale circostante. Le cellule tumorali, infatti, non si limitano alla massa principale, ma sono in

grado di diffondersi anche nelle aree vicine del cervello, il che rende molto difficile rimuovere completamente il tumore mediante la chirurgia, anche quando viene asportata la maggior parte della massa tumorale visibile (Louis et al., 2021; Yalamarty et al., 2023).

Il GBM è inoltre caratterizzato da una marcata eterogeneità, sia tra pazienti diversi sia all'interno dello stesso tumore, dove possono coesistere popolazioni cellulari con diverse caratteristiche genetiche e funzionali: alcune cellule possono proliferare più rapidamente, altre possono essere maggiormente invasive, altre ancora sono più resistenti ai trattamenti. Questa variabilità è funzionale per il tumore perché gli permette di adattarsi alle condizioni dell'ambiente circostante e contribuisce alla comparsa di resistenza alle terapie (Neftel et al., 2019).

L'analisi delle cellule del GBM ha evidenziato una marcata eterogeneità, identificando diversi fenotipi cellulari riconducibili a progenitori neurali, progenitori degli oligodendrociti, astrociti o elementi di tipo mesenchimale. Tali profili non costituiscono entità rigide o nettamente distinte; al contrario, l'elevata plasticità delle cellule tumorali consente loro di passare da una condizione all'altra in risposta ad alterazioni genetiche, segnali del microambiente o pressioni selettive esercitate dai trattamenti (Neftel et al., 2019).

### **1.2.2 Prognosi e limiti terapeutici**

Nonostante i recenti progressi diagnostici e terapeutici, le prospettive di sopravvivenza per pazienti affetti da GBM rimangono sfavorevoli. Il trattamento standard prevede, quando possibile, la rimozione chirurgica massimale, cercando di preservare le aree cerebrali sane circostanti, seguita da radioterapia e chemioterapia concomitante e adiuvante con temozolomide, un farmaco che agisce provocando danni al DNA delle cellule tumorali ostacolando così la proliferazione tumorale (Wu et al., 2024). Tuttavia, l'efficacia della temozolomide è limitata dall'attività della proteina MGMT, un enzima deputato alla riparazione delle alterazioni del DNA indotte dal farmaco stesso. Infatti, il silenziamento epigenetico tramite metilazione del promotore del gene *MGMT* ne riduce l'espressione, rendendo le cellule tumorali maggiormente sensibili al trattamento. Per questo motivo i pazienti con promotore di MGMT metilato mostrano una risposta terapeutica e un vantaggio di sopravvivenza significativamente superiori (Hegi et al., 2005).

Uno dei principali limiti della terapia è legato alla capacità del GBM di infiltrarsi nel tessuto cerebrale, in particolare nella zona subventricolare. Questo comporta un rischio elevato di recidive, perché

anche dopo la rimozione chirurgica del tumore visibile, possono rimanere cellule tumorali capaci di proliferare. Infatti, analizzando campioni prelevati da zone diverse dello stesso tumore, è stato osservato che alcuni cloni infiltranti sono già presenti nelle prime fasi della crescita tumorale e possono contribuire successivamente alla comparsa di recidive (Spiteri et al., 2019).

Un ulteriore ostacolo è rappresentato dalla barriera ematoencefalica, una struttura che controlla il passaggio delle sostanze dal sangue al tessuto cerebrale e che nel GBM risulta spesso compromessa. Nelle aree centrali del tumore, infatti, la barriera può essere alterata, mentre nelle zone periferiche infiltrate dalle cellule tumorali può rimanere ancora funzionante. Di conseguenza, alcuni farmaci non riescono a raggiungere in concentrazioni sufficienti tutte le aree tumorali (Sarkaria et al., 2018).

Nel complesso i limiti sopra citati spiegano la necessità di individuare nuove molecole capaci di agire su più meccanismi cellulari e di promuovere la morte delle cellule tumorali soprattutto quando queste risultano poco sensibili alle terapie convenzionali (Marin et al., 2021; Neftel et al., 2019; Spiteri et al., 2019).

### **1.2.3 La linea cellulare U251 come modello sperimentale**

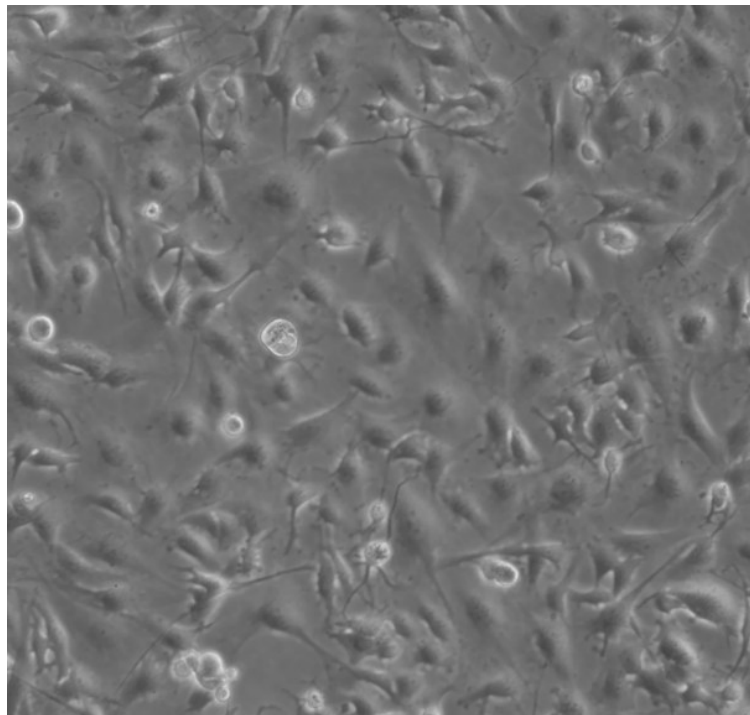
La linea cellulare U251 è una linea umana ottenuta da un tumore gliale maligno, sviluppata presso l'Università di Uppsala negli anni Sessanta e impiegata per analizzare la proliferazione cellulare, la risposta a potenziali trattamenti antitumorali e i meccanismi molecolari alla base del GBM (Pontén & Macintyre, 1968; Torsvik et al., 2014).

Le U251 possono essere mantenute in coltura in condizioni controllate, in modo da crescere in adesione e formare un monostrato (Figura 1). Questo consente di stabilire con precisione il numero iniziale di cellule, la concentrazione della sostanza somministrata e la durata del trattamento, facilitando quindi il confronto tra le diverse condizioni sperimentali (Wei et al., 2021). Le linee cellulari rappresentano, quindi, uno strumento utile per l'analisi di nuovi composti e per lo studio dei meccanismi attraverso cui questi modificano la sopravvivenza delle cellule tumorali (Sharma et al., 2010), motivo per cui questa linea cellulare è stata utilizzata nel presente lavoro di tesi per valutare l'effetto degli estratti di legno di potatura di *Vitis vinifera* sul comportamento biologico delle cellule tumorali.

L'impiego delle U251 presenta tuttavia i limiti caratteristici delle linee cellulari *in vitro*. Da un lato, il mantenimento prolungato in coltura può causare drift genetico e pressione selettiva nei passaggi

sequenziali, determinando variazioni genetiche, morfologiche e funzionali tra differenti sottolinee (Torsvik et al., 2014). Dall'altro, la crescita bidimensionale non riproduce l'architettura 3D del microambiente tumorale *in vivo*, privando il modello dei gradienti fisiologici di ossigeno e nutrienti e delle interazioni cellulari stromatiche (Fontana et al., 2021).

Nonostante queste limitazioni intrinseche, le U251 rappresentano tuttora un modello ideale per uno screening preliminare dell'attività biologica di estratti e per l'indagine di pathway molecolari specifici. Tuttavia, proprio in virtù della semplificazione del sistema *in vitro*, le evidenze raccolte richiedono di essere validate attraverso ulteriori approfondimenti traslazionali.



**Figura 1:** Cellule di glioblastoma umano U251 osservate in microscopia a contrasto di fase, con morfologia aderente, fusiforme e caratteristiche prolungazioni cellulari. Fonte: (Cellule U-251 MG)

### 1.3 Carcinoma mammario triplo negativo -TNBC

#### 1.3.1 Epidemiologia e caratteristiche biologiche

Il carcinoma mammario triplo negativo è una forma di tumore alla mammella caratterizzata dall'assenza dei recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PR) e dalla mancata sovraespressione o amplificazione del recettore 2 del fattore di crescita epidermico umano HER2 (Boyle, 2012).

A livello globale il TNBC rappresenta circa il 10-15% di tutti i casi di carcinoma mammario (Karim et al., 2023), con una frequenza che può variare in base alle caratteristiche della popolazione: secondo i dati del programma statunitense SEER, ad esempio, questo sottotipo è più frequente tra le donne giovani e le donne nere non ispaniche (Howlander et al., 2014). Tra i fattori di rischio più importanti rientrano le mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2. Infatti, è stato osservato che circa il 70% dei tumori della mammella che insorgono nelle persone portatrici di queste mutazioni è di tipo triplo negativo, con una maggiore associazione alle mutazioni di BRCA1 rispetto a BRCA2 (Kim & Choi, 2013).

Dal punto di vista clinico, il TNBC presenta generalmente un comportamento più aggressivo rispetto ad altri tipi di carcinoma mammario. Infatti, le pazienti affette presentano un rischio più elevato di sviluppare recidive e una maggiore probabilità di morte, soprattutto nei primi cinque anni dalla diagnosi. Inoltre, il rischio di sviluppare recidive raggiunge il valore massimo intorno al terzo anno per poi diminuire progressivamente, mostrando un andamento diverso rispetto a quello osservato nei tumori non triplo negativi (Dent et al., 2007).

Il TNBC è inoltre caratterizzato da una marcata eterogeneità biologica e molecolare, che si traduce nell'attivazione di specifiche vie cellulari e a una differente sensibilità ai trattamenti (Lehmann et al., 2011). Nello specifico, l'analisi del profilo di espressione genica ha permesso di identificare sei distinti sottotipi molecolari di TNBC: due forme *basal-like*, un sottotipo immunomodulatorio, uno mesenchimale, uno *mesenchimale stem-like* e uno caratterizzato dalla presenza del recettore degli androgeni (Lehmann et al., 2011). Questa complessità spiega perché il termine TNBC non sia perfettamente sovrapponibile alla definizione di sottotipo *basal-like*, sebbene i due concetti vengano spesso usati come sinonimi. Il TNBC viene infatti identificato sulla base dell'assenza di ER, PR e HER2, mentre il sottotipo *basal-like* si basa sull'analisi dell'espressione di un insieme più ampio di geni. Di conseguenza, sebbene la maggior parte dei tumori *basal-like* mostri un fenotipo triplo negativo, una quota di TNBC ricade in differenti sottotipi molecolari (Koboldt et al., 2012).

Nel complesso, questa elevata eterogeneità rende difficile lo sviluppo di trattamenti efficaci per tutte le forme di TNBC (Koboldt et al., 2012; Lehmann et al., 2011).

### **1.3.2 Prognosi e limiti delle terapie disponibili**

Poiché il TNBC è privo dell'espressione di ER, PR e HER2, non può essere trattato né con le terapie endocrine né con farmaci diretti specificatamente contro HER2. Per questo motivo, la chemioterapia rappresenta il principale approccio terapeutico per questo tipo di tumore, anche se il rischio di recidive rimane presente (Dent et al., 2007; Schmid et al., 2022). Negli ultimi anni però sono state sviluppate nuove strategie terapeutiche con l'obiettivo di ampliare le opzioni di trattamento per le pazienti affette. Tra queste, il pembrolizumab, un anticorpo monoclonale diretto contro PD-1, blocca l'interazione del recettore con i suoi ligandi, favorendo l'attivazione della risposta immunitaria mediata dai linfociti T nei confronti delle cellule tumorali e migliorando l'esito della chemioterapia adiuvante (Schmid et al., 2022). Un'altra importante opzione terapeutica è rappresentata da olaparib, un inibitore di PARP utilizzato nelle pazienti con mutazioni germinali dei geni BRCA1 o BRCA2, nelle quali il difetto della ricombinazione omologa rende le cellule tumorali maggiormente dipendenti da sistemi alternativi di riparazione del DNA mediati da PARP (Robson et al., 2017). Infine, il sacituzumab govitecan, un anticorpo coniugato a un farmaco citotossico diretto contro la proteina Trop-2, espressa sulla superficie di molte cellule tumorali, consente il rilascio selettivo di un agente citotossico nelle cellule bersaglio ed è indicato per il trattamento delle forme metastatiche di TNBC in pazienti già sottoposte a precedenti terapie (Bardia et al., 2021).

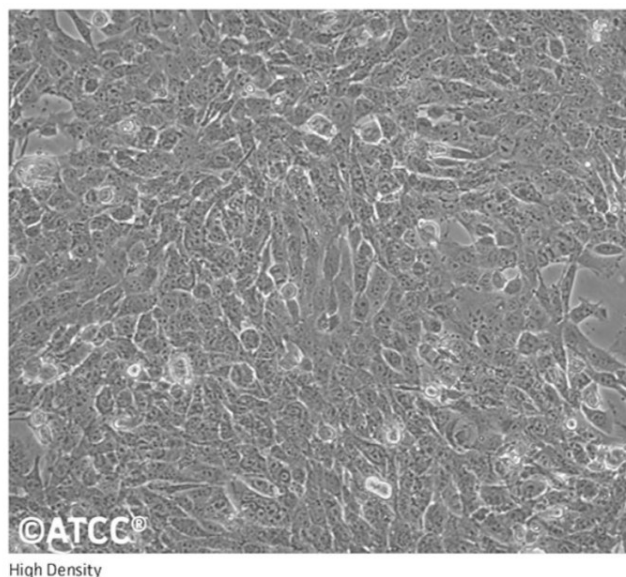
Nonostante questi progressi, le nuove terapie presentano ancora alcuni limiti. La loro efficacia dipende, infatti, dalla presenza di specifici biomarcatori, come l'espressione di PD-L1 o le mutazioni di BRCA1 e BRCA2. Inoltre, l'eterogeneità del TNBC fa sì che tumori apparentemente simili possano attivare vie molecolari differenti e rispondere in modo diverso allo stesso trattamento. Per questo motivo rimane fondamentale identificare nuove sostanze capaci di agire su processi fondamentali per la sopravvivenza delle cellule tumorali, come la proliferazione, la capacità clonogenica e la regolazione dell'apoptosi (Cortes et al., 2022; Lehmann et al., 2011; Robson et al., 2017).

### 1.3.3 La linea cellulare 4T1 come modello sperimentale

La linea 4T1 deriva da un tumore mammario spontaneo sviluppatosi in un topo BALB/c femmina ed è caratterizzato da una forte aggressività e da un'elevata capacità invasiva e metastatica (Figura 2) (Aslakson & Miller, 1992). Questa linea cellulare viene frequentemente utilizzata anche nei modelli *in vivo*, poiché le cellule 4T1 possono essere impiantate in topi BALB/c immunocompetenti, permettendo così di studiare la crescita tumorale e la diffusione metastatica in presenza di un sistema immunitario funzionante (Pulaski & Ostrand-Rosenberg, 2000).

Dal punto di vista molecolare, le cellule 4T1 presentano caratteristiche comuni al TNBC umano, tra cui la bassa espressione degli omologhi murini dei recettori ER, PR e HER2 (Esr1, Pgr e Erbb2 rispettivamente), oltre all'alterazione dei geni coinvolti nella progressione tumorale, come Trp53 e Pik3g (Schrörs et al., 2020).

Il modello 4T1 comporta tuttavia alcune limitazioni metodologiche e biologiche. Da un lato, l'origine murina non riproduce fedelmente l'eterogeneità genetica e molecolare del TNBC umano, richiedendo un riscontro su modelli umani di maggior complessità (Schrörs et al., 2020). Dall'altro, la crescita in *monolayer* (2D) non riflette la fisiopatologia tridimensionale, la quale condiziona in modo significativo la proliferazione e la farmacoresistenza cellulare (Mahmoudzadeh et al., 2016). Pur a fronte di tali limiti, la linea 4T1 si conferma un modello idoneo per uno *screening* iniziale dell'attività citotossica, pro-apoptotica e antiproliferativa di estratti, nonostante la necessità di ulteriori approfondimenti su modelli maggiormente rappresentativi del contesto clinico (Mahmoudzadeh et al., 2016; Schrörs et al., 2020).



**Figura 2:** Cellule di carcinoma mammario murino 4T1, osservate in microscopia a contrasto di fase, con morfologia aderente ed epitelioide. Fonte: (4T1 - CRL-2539 | ATCC)

## 1.4 Sottoprodotti di *Vitis vinifera* come fonte di composti bioattivi

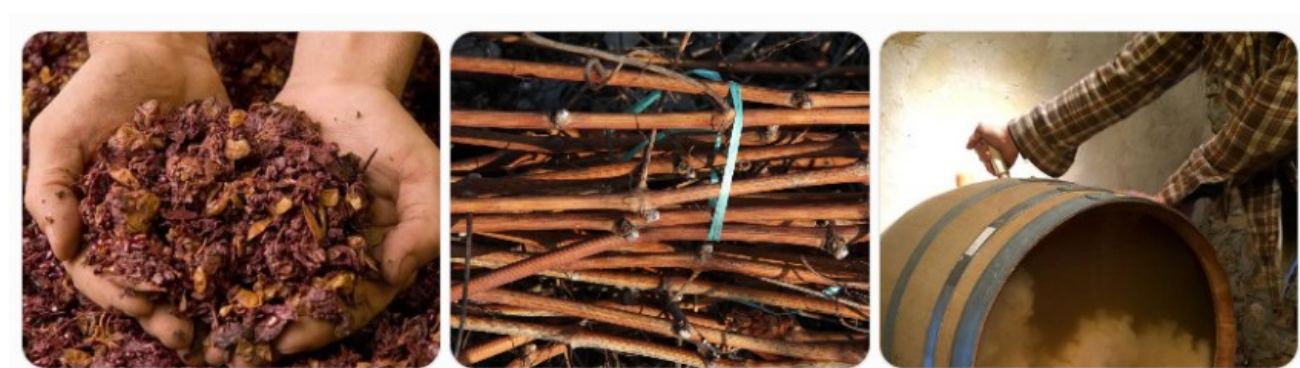
### 1.4.1 *Vitis vinifera* e i sottoprodotti della filiera vitivinicola

La coltivazione di *Vitis vinifera* e la produzione del vino generano ogni anno una quantità rilevante di materiale vegetale che non entra nel prodotto finale, derivante sia dalle attività svolte nel vigneto sia dalle diverse fasi della vinificazione. Nel primo caso rientrano tralci rimossi durante la potatura, mentre in cantina vengono prodotti vinacce e fecce. Questi materiali, un tempo considerati semplici scarti, oggi sono definiti sottoprodotti in quanto possono essere impiegati in ambito alimentare, cosmetico e farmaceutico (Jara-Palacios et al., 2014; Spinelli et al., 2012).

Questi sottoprodotti si differenziano in base all'origine e alla loro composizione, ma condividono la presenza di molecole biologicamente attive, appartenenti soprattutto alle classi dei flavanoli, dei flavonoli e degli acidi fenolici (Jara-Palacios et al., 2014). I tralci di potatura (vine shoots) sono i rami lignificati della vite eliminati durante la potatura (Jara-Palacios et al., 2014; Noviello et al., 2022; Peixoto et al., 2018; Reis et al., 2016). I raspi (grape stems), generalmente separati dagli acini durante la diraspatura, costituiscono la parte legnosa del grappolo e possono contenere catechina, acidi fenolici, derivati della quercetina e alcuni stilbeni (Figura 3). Le vinacce, invece, sono formate da

bucce e vinaccioli rimasti dopo la pressatura e possono contenere anche una parte dei raspi. In particolare, i vinaccioli sono ricchi di catechina, epicatechina e proantocianidine, mentre le bucce contengono flavonoli e, nel caso delle uve rosse, antociani (Figura 3). Le fecce, a differenza delle vinacce, si formano come deposito sul fondo dei recipienti durante e dopo la fermentazione, e sono costituite da lieviti, residui cellulari e sostanze provenienti dall'uva (Figura 3). Differenze importanti sono state osservate anche tra vinacce e fecce ottenute dalla stessa varietà: nella cultivar Pinot Noir, ad esempio, i flavonoidi rappresentano la principale classe fenolica delle vinacce, con la catechina come composto più abbondante, mentre nelle fecce prevalevano i flavonoidi, in particolare la quercetina.

Il recupero di tutti questi sottoprodotti si inserisce nel concetto di economia circolare, secondo il quale un materiale residuo di una filiera può diventare la materia prima di un nuovo processo produttivo. Nel settore vitivinicolo questo approccio può contribuire a ridurre la quantità di biomassa da smaltire e, allo stesso tempo, permettere l'ottenimento di estratti, fibre, oli, pigmenti e molecole bioattive ad alto valore aggiunto, purché si sviluppino procedure di estrazione riproducibili (Peixoto et al., 2018; Spinelli et al., 2012).



**Figura 3:** Principali sottoprodotti della filiera vitinicola: vinacce (sinistra), raspi (centro) e fecce (destra), potenziali fonti di composti fenolici bioattivi. Fonte: (Grape leaves and vine shoots | Feedipedia; The Story of an All-Italian Masterpiece, 2023; Wine 101: Barrel Fermentation | Wollersheim Winery, Distillery & Bistro)

### 1.4.2 Valorizzazione del legno di potatura

Tra i sottoprodotti del vigneto, il legno di potatura rappresenta una delle fonti di biomassa più abbondanti: in uno studio condotto su 17 vigneti dell'Italia settentrionale e centrale la quantità di residuo effettivamente recuperabile era pari, in media, a circa una tonnellata di sostanza secca per ettaro (Spinelli et al., 2012).

La potatura viene eseguita periodicamente per rimuovere i tralci lignificati dell'anno precedente al fine di controllare la crescita della vite e mantenere un equilibrio tra sviluppo vegetativo e produzione dell'uva (Spinelli et al., 2012). Successivamente, i tralci possono essere lasciati nel vigneto, triturati e incorporati nel terreno oppure raccolti e utilizzati come biomassa energetica. In alcuni casi vengono anche bruciati, una pratica che, oltre ad avere un impatto ambientale negativo, non sfrutta le molecole a maggiore valore aggiunto presenti nel tessuto vegetale (Noviello et al., 2022; Spinelli et al., 2012).

Diversi studi hanno, infatti, evidenziato che il legno di potatura non è costituito solo da cellulosa, emicellulosa e lignina, ma anche da una frazione di metaboliti secondari come composti fenolici e, soprattutto, stilbeni. Rispetto alle vinacce e ai raspi, i tralci lignificati possono contenere concentrazioni elevate di (E)-resveratrolo e dei suoi derivati oligomerici, rendendo quindi il legno di potatura una possibile materia prima per ottenere estratti con attività antiossidante, antimicrobica e antiproliferativa (Noviello et al., 2022; Squillaci et al., 2022).

È importante notare che la quantità e la qualità dei composti bioattivi ottenibili dal legno di potatura dipendono da numerosi fattori, che vanno dalle caratteristiche intrinseche della pianta fino alle condizioni sperimentali adottate durante la preparazione del materiale e l'estrazione (Cebrián et al., 2017; Jiménez-Moreno et al., 2019; Kosović et al., 2020; Noviello et al., 2022).

In particolare, è stato osservato che il tempo che intercorre tra la potatura e l'estrazione può modificare la composizione finale dell'estratto: in uno studio condotto sui tralci delle cultivar Airén e Cencibel, il contenuto di diversi composti fenolici e volatili è stato valutato dopo uno, tre e sei mesi di conservazione, risultando complessivamente più elevato dopo sei mesi rispetto ai tempi più brevi, anche se l'andamento variava tra le due cultivar e tra le singole molecole (Cebrián et al., 2017).

Oltre a questo, anche le condizioni di essiccazione, esposizione alla luce, temperatura e conservazione possono modificare la stabilità delle molecole bioattive, come ad esempio (E)-resveratrolo e viniferine. In particolare, le temperature elevate possono facilitare il rilascio di alcuni stilbeni dalla matrice vegetale, ma se l'esposizione si prolunga rischiano di danneggiarli o degradarli; la luce,

invece, può causare fenomeni di isomerizzazione, cioè il passaggio dalla forma trans alla forma cis, modificando il profilo dell'estratto (Kosović et al., 2020).

Anche la modalità di estrazione ha un ruolo determinante, poiché i diversi metaboliti presenti nel legno hanno polarità e solubilità differenti e non possono essere recuperati tutti nello stesso modo. Per questo motivo, fattori come la natura del solvente, la percentuale di acqua, la temperatura, il rapporto tra matrice e solvente e la durata del contatto influenzano non solo la quantità totale di composti estratti ma anche il rapporto tra le diverse molecole (Jiménez-Moreno et al., 2019).

Nel complesso, la valorizzazione del legno di potatura richiede di prestare attenzione a tutto il processo, controllando raccolta, conservazione, essiccazione, macinazione, estrazione e caratterizzazione chimica, perché ognuna di queste fasi può modificare il prodotto finale.

### **1.4.3 Principali metaboliti bioattivi: polifenoli e stilbeni**

I polifenoli sono metaboliti secondari prodotti dalle piante e comprendono un gruppo molto ampio di molecole accomunate dalla presenza di uno o più anelli aromatici legati a gruppi ossidrilici. Tra le principali classi presenti nei sottoprodotti vitivinicoli sono presenti gli acidi fenolici, i flavanoli, i flavonoli, gli antociani, le proantocianidine e gli stilbeni, molecole che nella vite svolgono diverse funzioni, tra cui la protezione dai raggi ultravioletti, la difesa dai patogeni, la risposta agli stress, e la regolazione di alcuni processi di sviluppo (Jara-Palacios et al., 2014; Noviello et al., 2022). In particolare, tra i flavanoli si trovano la catechina ed epicatechina, che possono essere presenti come molecole singole oppure unirsi tra loro per formare proantocianidine e tannini condensati. Tra i flavonoli sono frequenti la quercetina e i suoi derivati glicosilati, mentre tra gli acidi fenolici sono stati identificati acido gallico, acido caftarico, acido caffeico e acido ferulico. Gli antociani, infine, sono i pigmenti responsabili della colorazione rossa e violacea dell'uva e si trovano prevalentemente nelle bucce di qualità di vite dal chicco rosso (Jara-Palacios et al., 2014; Peixoto et al., 2018).

L'interesse verso i polifenoli deriva dalla loro capacità di interagire con le specie reattive e di limitare alcuni processi ossidativi, un'attività che viene di norma valutata mediante saggi DPPH e FRAP, oppure misurando direttamente i livelli di ROS nelle cellule trattate (Jiménez-Moreno et al., 2019). Accanto alle proprietà antiossidanti, i polifenoli hanno dimostrato di influenzare anche processi chiave coinvolti nella sopravvivenza delle cellule tumorali, come la proliferazione e l'apoptosi. In particolare, una frazione ricca di polifenoli ottenuta dal legno di potatura della cultivar Greco, composta principalmente da procianidine e stilbenoidi, ha evidenziato un effetto citotossico su due

linee di carcinoma squamoso della testa e del collo (Squillaci et al., 2022). Il trattamento ha causato l'arresto del ciclo cellulare e ha attivato la via apoptotica, come indicato dall'aumento del rapporto Bax/Bcl-2, dall'attivazione delle caspasi e dalla degradazione di PARP-1 (Squillaci et al., 2022).

Tra i polifenoli rientra anche una famiglia più ristretta, quella degli stilbeni, definiti fitoalessine perché sono molecole che vengono prodotte soprattutto in risposta a condizioni di stress, come infezioni da patogeni, esposizione ai raggi ultravioletti o danni meccanici (Chang et al., 2011). La loro produzione rappresenta quindi un importante meccanismo di difesa, che viene attivato e modulato in funzione delle condizioni ambientali (Dercks & Creasy, 1989). Il principale composto di questa famiglia è l'(E)-resveratrolo, che costituisce il precursore di molti derivati, tra cui forme metilate, glicosilate oppure dimeri e oligomeri più complessi (Chang et al., 2011).

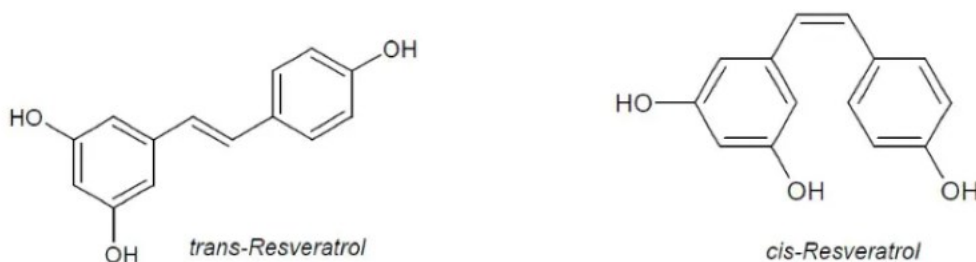
#### 1.4.4 (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina

Tra gli stilbeni identificati nel legno di potatura, l'(E)-resveratrolo e la  $\epsilon$ -viniferina rappresentano i composti più abbondanti (Noviello et al., 2022), motivo per cui la loro struttura e la loro attività biologica vengono approfondite di seguito.

L'(E)-resveratrolo, noto anche come *trans*-resveratrolo, è uno stilbene monomero costituito da due anelli aromatici collegati da un doppio legame (Figura 4). La lettera E indica la disposizione dei gruppi ai lati del doppio legame e corrisponde alla configurazione *trans* della molecola, la forma predominante nei tralci di vite, anche se l'(E)-resveratrolo può essere presente anche nella configurazione *cis*. Inoltre, l'(E)-resveratrolo può essere glicosilato dando origine al piceide oppure andare incontro a reazioni di ossidazione e accoppiamento tra più unità che portano alla formazione di strutture più complesse, come dimeri e oligomeri (Kosović et al., 2020; Noviello et al., 2022).

Gli effetti dell'(E)-resveratrolo sono stati studiati in numerosi modelli cellulari tumorali per verificarne la capacità di interferire con la proliferazione cellulare. In uno studio condotto su diverse linee tumorali umane, tra cui A431 (carcinoma epidermoide), MCF-7 (carcinoma mammario), SW480 (carcinoma del colon), U-87MG (GBM), HL-60 (leucemia promielocitica acuta), è stato osservato che la funzione dell'(E)-resveratrolo variava in funzione delle diverse linee cellulari: ad esempio, le linee HL-60 e A431 risultavano particolarmente sensibili all'induzione dell'apoptosi, mentre nelle linee cellulari MCF-7, SW480 e U-87MG prevalevano l'inibizione della proliferazione e l'arresto del ciclo cellulare in fase S, con un'induzione meno marcata dell'apoptosi. Oltre a questo, è stato anche

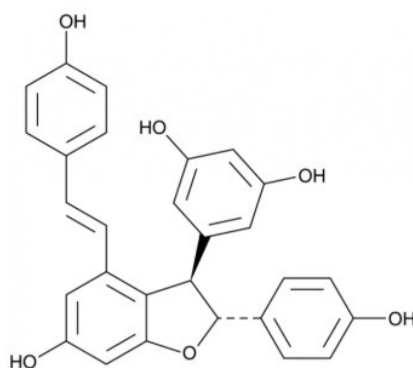
osservato che per ottenere questi effetti sono necessari concentrazioni relativamente diverse di (E)-resveratrolo nelle diverse linee (Joe et al., 2002).



**Figura 4:** Struttura chimica planare del *trans*-resveratrolo e *cis*- resveratrolo. Fonte: (Berretta et al., 2020).

La (E)- $\epsilon$ -viniferina è una molecola formata dall'unione di due unità di (E)-resveratrolo, attraverso un processo di dimerizzazione che ne modifica la struttura tridimensionale e le proprietà chimiche rispetto al composto di partenza (Figura 5) (Fuloria et al., 2022). Questa modifica strutturale si riflette anche a livello biologico: in uno studio condotto su due linee di melanoma umano, l' $\epsilon$ -viniferina ha presentato valori di IC<sub>50</sub> inferiori rispetto al (E)- resveratrolo, risultando quindi più efficace nel ridurre la vitalità cellulare nelle condizioni sperimentali (Nivelle et al., 2017).

Inoltre, oltre a (E)- resveratrolo e  $\epsilon$ -viniferina, negli estratti ottenuti da tralci di vite sono stati identificati anche altri oligomeri del (E)- resveratrolo, con diverso grado di polimerizzazione, come r2-viniferina, hopeafenolo, pallidolo e miyabenolo C, alcuni dei quali hanno mostrato attività antiproliferativa quando isolati e analizzati separatamente (Macke et al., 2012).



**Figura 5:** struttura chimica planare della (E)- $\epsilon$ -viniferina. Fonte: (trans-epsilon-Viniferin | CAS 62218-08-0 | Cayman Chemical | Biomol.com)

### 1.4.5 Fitocomplesso e possibili interazioni tra i metaboliti

A differenza dei farmaci di sintesi, un estratto vegetale è caratterizzato dal fitocomplesso: una miscela naturale, complessa e articolata di molteplici sostanze chimiche presenti in concentrazioni differenti. Questa natura multicomponente garantisce che l'attività biologica dell'estratto non sia riconducibile a un singolo principio attivo, bensì all'azione coordinata e sinergica di tutte le sue componenti (Wagner, 2011). Nel caso del legno di potatura, il fitocomplesso può comprendere (E)-resveratrolo, viniferine, altri oligostilbeni, flavonoidi, acidi fenolici e numerosi metaboliti presenti in quantità minori (Goufo et al., 2020). In questo caso, la presenza contemporanea di numerose molecole bioattive suggerisce che la risposta biologica osservata possa derivare dall'azione combinata di queste molecole piuttosto che dall'attività di un singolo metabolita. Inoltre, la composizione del fitocomplesso può variare in funzione della cultivar, delle condizioni ambientali e del metodo di estrazione, fattori che influenzano il profilo dei metaboliti presenti e, quindi, le proprietà biologiche dell'estratto (Williamson, 2001).

In particolare, le interazioni che si instaurano tra i metaboliti possono essere additive, quando l'effetto finale corrisponde alla somma degli effetti individuali, sinergiche, quando l'associazione produce un effetto superiore a quello atteso, oppure antagoniste, quando un composto riduce l'attività dell'altro (Williamson, 2001).

Sulla base di queste osservazioni, per comprendere il contributo dei diversi componenti del fitocomplesso è necessario confrontare l'estratto completo con i singoli composti isolati e/o con frazioni dalle quali alcune molecole sono state rimosse. Questo approccio permette di capire se l'attività dipende soprattutto da qualche metabolita maggioritario oppure se viene mantenuta anche in sua assenza grazie agli altri componenti. È proprio su questo principio che si basa il confronto svolto nel presente lavoro tra l'estratto 3A, l'(E)-resveratrolo, la (E)- $\epsilon$ -viniferina e la frazione 3B (ovvero l'estratto 3A privato dei due stilbeni principali, cioè (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina). Tale confronto permette di valutare il contributo delle molecole senza perdere di vista il possibile ruolo dell'intero fitocomplesso.

### 1.5 Meccanismi molecolari coinvolti nelle attività biologiche degli estratti di *Vitis vinifera*

I meccanismi molecolari attraverso cui gli estratti di *Vitis vinifera* esercitano le loro attività biologiche sono stati studiati da diversi lavori, alcuni dei quali sopracitati, che ne hanno mostrato sia l'effetto antitumorale che quello antiossidante. Per quanto riguarda l'attività antitumorale, l'attenzione si è

concentrata principalmente sulla capacità di indurre apoptosi attraverso la via intrinseca, processo il cui esito dipende dall'equilibrio tra proteine pro- e anti-apoptotiche, e si conclude con l'attivazione della caspasi-3. Oltre a questo meccanismo, gli estratti di *Vitis vinifera* sono stati descritti anche per la loro capacità di contrastare lo stress ossidativo, contribuendo così a proteggere le cellule sane. Nei paragrafi seguenti vengono quindi approfonditi questi meccanismi, uno per uno, per fornire una base utile a interpretare i risultati sperimentali ottenuti in questo lavoro di tesi (Jiménez-Moreno et al., 2019; Joe et al., 2002; Montané et al., 2020; Squillaci et al., 2022)

### **1.5.1 Apoptosi: la via intrinseca**

L'apoptosi è un processo di morte cellulare programmata finemente regolata dall'espressione di geni specifici, con lo scopo di eliminare cellule danneggiate, superflue o potenzialmente pericolose senza causare una risposta infiammatoria nei tessuti circostanti (Wimmer et al., 2020). Oltre alla via estrinseca, attivata in seguito all'interazione tra ligandi della famiglia TNF (tumor necrosis factor) e rispettivi recettori di morte (Elmore, 2007), l'apoptosi può essere attivata anche dalla via intrinseca che riveste un ruolo centrale nella risposta delle cellule tumorali a numerosi stimoli citotossici, inclusi quelli derivanti da composti di origine naturale. Questa via viene attivata normalmente quando la cellula è sottoposta a condizioni di stress intracellulari, come il danno al DNA, lo stress ossidativo o la privazione di fattori di crescita. Questi stimoli causano la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna e il successivo rilascio di citocromo c nel citosol, dove assume la funzione di segnale pro-apoptotico (McIlwain et al., 2013). Una volta rilasciato, il citocromo c si lega al fattore Apaf-1 e alla pro-caspasi-9, dando origine all'apoptosoma, un complesso multiproteico che, mediante taglio proteolitico, innesca l'attivazione a cascata delle caspasi effettrici, responsabili dell'attivazione del programma apoptotico (McIlwain et al., 2013; Steiner & Lang, 2017).

### **1.5.2 Il ruolo del rapporto Bax/Bcl-2**

La permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna dipende principalmente dall'equilibrio tra le proteine pro-apoptotiche e anti-apoptotiche appartenenti alla famiglia delle proteine Bcl-2 e rappresenta un evento chiave della via intrinseca. Bax è il principale effettore pro-apoptotico e agisce stimolando la formazione di pori nella membrana mitocondriale, mentre Bcl-2 ha un'azione anti-apoptotica per cui agisce contrastando l'attività di Bax al fine di preservare l'integrità della membrana

(Pawlowski & Kraft, 2000). Siccome il risultato di questo bilanciamento dipende dal rapporto relativo tra le due proteine più che dalla loro espressione assoluta, il rapporto Bax/Bcl-2 viene comunemente utilizzato come indicatore per valutare lo stato apoptotico della cellula. L'aumento di questo rapporto riflette uno spostamento dell'equilibrio verso la permeabilizzazione della membrana mitocondriale e la conseguente attivazione delle caspasi a valle, mentre valori più bassi indicando una tendenza della cellula a resistere all'apoptosi (Gao & Wang, 2009; Putri & Z, 2025; Qian et al., 2022). Un aumento del rapporto Bax/Bcl-2 in risposta al relativo trattamento antitumorale e pro-apoptotico è stato descritto in numerosi contesti sperimentali, tra cui modelli di glioma trattati con composti di origine naturale (Du et al., 2014), linee di melanoma (Raisova et al., 2001) e modelli murini di patologia autoimmune (Salakou et al., 2007), a conferma della sua validità come marcatore trasversale dell'attivazione della via intrinseca.

### **1.5.3 Attivazione della caspasi-3 come evento terminale dell'apoptosi**

L'attivazione delle caspasi effettrici, tra cui la caspasi-3, considerata il principale effettore della fase esecutiva del processo, rappresenta l'evento conclusivo della via apoptotica intrinseca (McIlwain et al., 2013). Infatti, la pro-caspasi-9, attivata mediante taglio proteolitico in seguito alla formazione dell'apoptosoma, agisce a sua volta trasformando la pro-caspasi-3 nella sua forma clivata e cataliticamente attiva. La caspasi-3 clivata, a sua volta, esercita la propria attività proteolitica su un ampio numero di substrati intracellulari, tra cui PARP-1, la cui degradazione compromette i meccanismi di riparazione del DNA, oltre a diverse proteine strutturali e nucleari, portando alla frammentazione del DNA, alla condensazione della cromatina e infine alla formazione dei corpi apoptotici, tipici di questo tipo di morte cellulare (McIlwain et al., 2013; Wimmer et al., 2020). Per questo motivo, l'espressione della caspasi-3 clivata è considerata un marcatore attendibile per confermare l'attivazione dell'apoptosi indotta da trattamento, come descritto anche per estratti polifenolici derivati da sottoprodotti vitivinicoli, nei quali l'aumento dell'attività delle caspasi è accompagnato alla degradazione di PARP-1 (Squillaci et al., 2022).

#### 1.5.4 Attività antiossidante

Oltre all'attività antitumorale, gli estratti di *Vitis vinifera* sono ampiamente descritti in letteratura per la loro capacità di modulare lo stress ossidativo. Questa condizione è causata da uno squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le difese antiossidanti cellulari, che può causare danni a lipidi, proteine e DNA e, se non viene contrastata, contribuire all'insorgenza e alla progressione di numerose patologie, incluse quelle neoplastiche (Jiménez-Moreno et al., 2019). L'attività antiossidante dei composti fenolici è dovuta principalmente alla loro struttura chimica, caratterizzata dalla presenza di gruppi ossidrilici capaci di donare elettroni o atomi di idrogeno alle specie reattive al fine di neutralizzarle (Jara-Palacios et al., 2014).

L'attività antiossidante è stata dimostrata da diversi studi condotti su estratti ottenuti da sottoprodotti della filiera vitivinicola: gli estratti derivati dai raspi della vite, ad esempio, hanno mostrato una buona capacità di neutralizzare i radicali liberi in test di laboratorio, legata alla quantità di composti fenolici presenti (Jiménez-Moreno et al., 2019; Quero et al., 2021). Anche l'(E)-resveratrolo è stato ampiamente descritto per le sue proprietà antiossidanti, che ne hanno favorito l'impiego in ambiti diversi, dove contribuisce a contrastare il danno ossidativo cutaneo indotto dai raggi ultravioletti e dall'inquinamento (Ratz-Lyko & Arct, 2019).

È interessante notare che la risposta allo stress ossidativo, indotta dai polifenoli di *Vitis vinifera*, può variare in funzione del tipo cellulare: nelle cellule non tumorali contrastano l'accumulo di ROS e preservano la vitalità, mentre in alcuni modelli di cellule tumorali hanno un effetto opposto, in quanto causano un aumento dei livelli di ROS che contribuisce all'attivazione di meccanismi di morte cellulare (Farman et al., 2026; Jia et al., 2021). Questa duplice natura, antiossidante nelle cellule sane e pro-ossidante in specifici contesti tumorali, rende l'analisi dell'attività antiossidante uno strumento utile non solo per valutare il potenziale protettivo degli estratti nei confronti delle cellule non tumorali, ma anche per approfondire i meccanismi alla base della loro selettività d'azione.

## 2. SCOPO DEL LAVORO

La ricerca oncologica è oggi orientata verso l'identificazione di nuove molecole in grado di esercitare un'attività antitumorale selettiva, limitando al contempo gli effetti citotossici nei confronti delle cellule sane. In questo contesto, i prodotti naturali rappresentano una delle principali fonti di composti bioattivi, grazie alla loro elevata diversità strutturale e alla capacità di modulare simultaneamente molteplici bersagli molecolari coinvolti nella progressione tumorale. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, l'attività biologica degli estratti vegetali viene attribuita esclusivamente ai metaboliti maggioritari, mentre il possibile contributo dei composti minoritari e delle loro interazioni all'interno del fitocomplesso rimane ancora poco definito.

Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito delle attività di ricerca del progetto NODES (Nord Ovest Digitale E Sostenibile), con particolare riferimento allo Spoke 6 (Azienda Primaria e Sostenibilità). Lo Spoke 6 promuove lo sviluppo di processi sostenibili e l'adozione di modelli di economia circolare nelle filiere agroalimentari del territorio. In tale quadro, la valorizzazione dei sottoprodotti della filiera vitivinicola costituisce un'opportunità di grande interesse, combinando la riduzione dell'impatto ambientale legato allo smaltimento degli scarti agricoli con l'identificazione di biomolecole ad alto valore terapeutico.

Partendo da queste premesse, il presente lavoro di tesi ha avuto lo scopo di approfondire il potenziale biologico degli estratti ottenuti dal legno di potatura di *Vitis vinifera*, un sottoprodotto della filiera vitivinicola attualmente scarsamente valorizzato ma caratterizzato dalla presenza di numerosi metaboliti bioattivi. In particolare, lo studio è iniziato selezionando quale tra i vari estratti ottenuti da parte del MedChemLab del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Pavia avesse la maggiore attività antitumorale ed è proseguito indagando se la sua attività antitumorale fosse riconducibile esclusivamente ai due principali stilbeni contenuti, (E)-resveratrolo ed (E)- $\epsilon$ -viniferina, oppure se dipendesse anche da altri metaboliti secondari.

A tale scopo è stata valutata l'attività citotossica di diversi estratti in modelli cellulari di glioblastoma (U251) e carcinoma mammario triplo negativo (4T1), confrontandola con quella osservata in linee cellulari non tumorali (WI38 e HaCaT), al fine di definirne la selettività d'azione nei confronti dei modelli tumorali. Successivamente, mediante il confronto tra l'estratto 3A e la sua frazione 3B, privata dei due principali stilbeni, è stato analizzato il contributo di tali composti all'attività biologica complessiva. Infine, sono stati approfonditi i principali meccanismi coinvolti nell'effetto antitumorale, valutando la capacità degli estratti di interferire con la proliferazione a lungo termine,

di indurre apoptosi attraverso la modulazione del rapporto Bax/Bcl-2 e dell'attivazione della caspasi-3, nonché di proteggere le cellule non tumorali dallo stress ossidativo.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 Materiale vegetale**

Il materiale vegetale utilizzato per ottenere gli estratti in questo lavoro di tesi è rappresentato da tralci lignificati di *Vitis vinifera* cv Pinot. I campioni sono stati prelevati da viti di 16 anni presso il vigneto DISAFA dell'Università degli Studi di Torino a Grugliasco. La tipologia di coltivazione adottata per la crescita delle viti è la controspalliera con potatura Guyot in terreno dalla composizione sabbiosa, il quale favorisce il drenaggio rapido dell'acqua in eccesso e risulta determinante per preservare lo stato fitosanitario e la salute generale del vigneto (Leeuwen et al., 2018).

Dopo la raccolta, il materiale vegetale è stato inizialmente pulito, poi tagliato in piccole porzioni e infine essiccato in stufa ventilata a 35°C fino al raggiungimento di un peso costante. Il materiale vegetale essiccato è stato quindi macinato per ottenere una polvere fine che è stata conservata in ambiente controllato, al riparo dalla luce e dall'umidità.

#### **3.2 Procedura di estrazione**

Il legno di potatura di *Vitis vinifera* cv Pinot Noir è stato estratto grazie a un processo di macerazione dinamica, effettuato dal MedChemLab del Dipartimento di Scienze del Farmaco presso l'Università degli Studi di Pavia. In particolare, il processo estrattivo è stato condotto in modalità sequenziale, mantenendo il materiale vegetale e il solvente in continua agitazione al fine di massimizzare il contatto tra matrice e solvente e velocizzando l'estrazione dei composti solubili. Al fine di isolare selettivamente classi di composti con differenti proprietà chimico-fisiche, sono stati utilizzati solventi organici a polarità crescente (Pereira et al., 2018). Tali solventi sono: n-esano (solvente 1), diclorometano (solvente 2), acetato di etile (solvente 3) e una miscela idroalcolica di acqua ed etanolo in rapporto 50:50 (v/v, solvente 4).

In particolare, per ogni fase estrattiva, 40 g di matrice legnosa, precedentemente sottoposta a macinazione fine, sono stati sospesi in 400 ml di solvente, mantenendo un rapporto matrice/solvente costante di 1:10 (w/v). La miscela è stata posta in agitazione dinamica per due ore a temperatura ambiente. Per ogni solvente sono stati eseguiti tre cicli di macerazione, reimpiegando in ogni step la matrice solida residua derivante dal ciclo precedente.

Al termine di ciascun processo estrattivo è stata ottenuta una fase liquida costituita dal solvente e dai soluti in esso solubilizzati. Per procedere all'isolamento dell'estratto grezzo, è stato necessario raccogliere le fasi liquide ottenute dai tre cicli trattati con il medesimo solvente e sottoporle ad evaporazione per eliminare il solvente. Tale procedura di concentrazione è stata replicata sistematicamente per tutte le frazioni di solvente impiegate nel piano sperimentale.

### 3.3 Linee cellulari

Le linee cellulari utilizzate per questo lavoro di tesi sono state:

- U251, cellule di GBM umano acquistate da Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- 4T1, cellule di TNBC acquistate da American Type Culture Collection (ATCC);
- WI-38, fibroblasti polmonari umani acquistati da ATCC;
- HaCat, cheratinociti umani immortalizzati della cute acquistati da ATCC.

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state cresciute in adesione su superfici plastiche e coltivate in flask da 75 cm<sup>2</sup> in terreni opportunamente formulati per rispondere al meglio alle diverse esigenze metaboliche delle cellule. Le colture sono state utilizzate in condizioni sterili a 37°C e mantenute in atmosfera umidificata contenente il 95% di aria e il 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura è stato sostituito almeno due volte alla settimana al fine di garantire condizioni ottimali per il mantenimento e la crescita cellulare. Al raggiungimento di una confluenza pari a circa l'80%, le cellule sono state sottoposte a passaggio (subcoltura).

In particolare, le cellule U251 sono state coltivate in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), arricchito con il 10% di siero fetale bovino (FBS), l'1% di L-glutamina, l'1% di aminoacidi non essenziali (NEAA), l'1% di piruvato di sodio e l'1% di penicillina/streptomicina. Le cellule 4T1 sono state mantenute in RPMI 1640, integrato con il 10% di FBS, l'1% di L-glutamina e l'1% di penicillina/streptomicina. Per le cellule WI-38 è stato impiegato il Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), arricchito con il 10% di FBS, l'1% di L-glutamina, l'1% di NEAA e l'1% di penicillina/streptomicina. Le cellule HaCaT, invece, sono state coltivate in DMEM con il 10% di FBS e l'1% di penicillina/streptomicina.

Tutti i reagenti utilizzati per la coltura cellulare sono stati acquistati da Gibco Life Technologies (Europe BV, Bleiswijk, Paesi Bassi), Sigma-Aldrich (Milano, Italia) ed Euroclone S.p.A. (Pero, Milano, Italia).

### 3.4 Determinazione della citotossicità mediante saggi MTT e Trypan Blue

#### 3.4.1 Saggio MTT

Il saggio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide) è un saggio colorimetrico utilizzato per misurare la vitalità cellulare. L'analisi si basa sull'utilizzo di MTT, un sale di tetrazolio dal colore giallo, che può essere ridotto a formazano, una sostanza insolubile e dal colore viola. Questa reazione avviene nei mitocondri di cellule metabolicamente attive, dove la presenza di enzimi ossidoreduttasi NAD(P)H-dipendenti media la riduzione dell'MTT a formazano (Stockert et al., 2018).

Per il saggio MTT le cellule sono state seminate ad una densità di 10.000 cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti. Le piastre sono state successivamente incubate a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore, al fine di consentire l'adesione delle cellule e il loro assestamento prima del trattamento.

Il giorno successivo il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco contenente estratti, disciolti in DMSO (madre 100 mg/ml), a 7 diverse concentrazioni: 0, 5, 25, 50, 75, 100 e 125 µg/ml. A 24, 48 e 72 ore dall'esposizione agli estratti, a ogni pozzetto è stato aggiunto il reagente MTT (20 µl di una soluzione 5 mg/ml) al riparo dalla luce.

Si è quindi proceduto con l'incubazione delle piastre per 3 ore a 37°C in atmosfera umidificata (5% CO<sub>2</sub>), per consentire il completamento della reazione enzimatica. Successivamente il terreno contenente l'MTT è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 µl di DMSO a ogni pozzetto al fine di solubilizzare i cristalli di formazano.

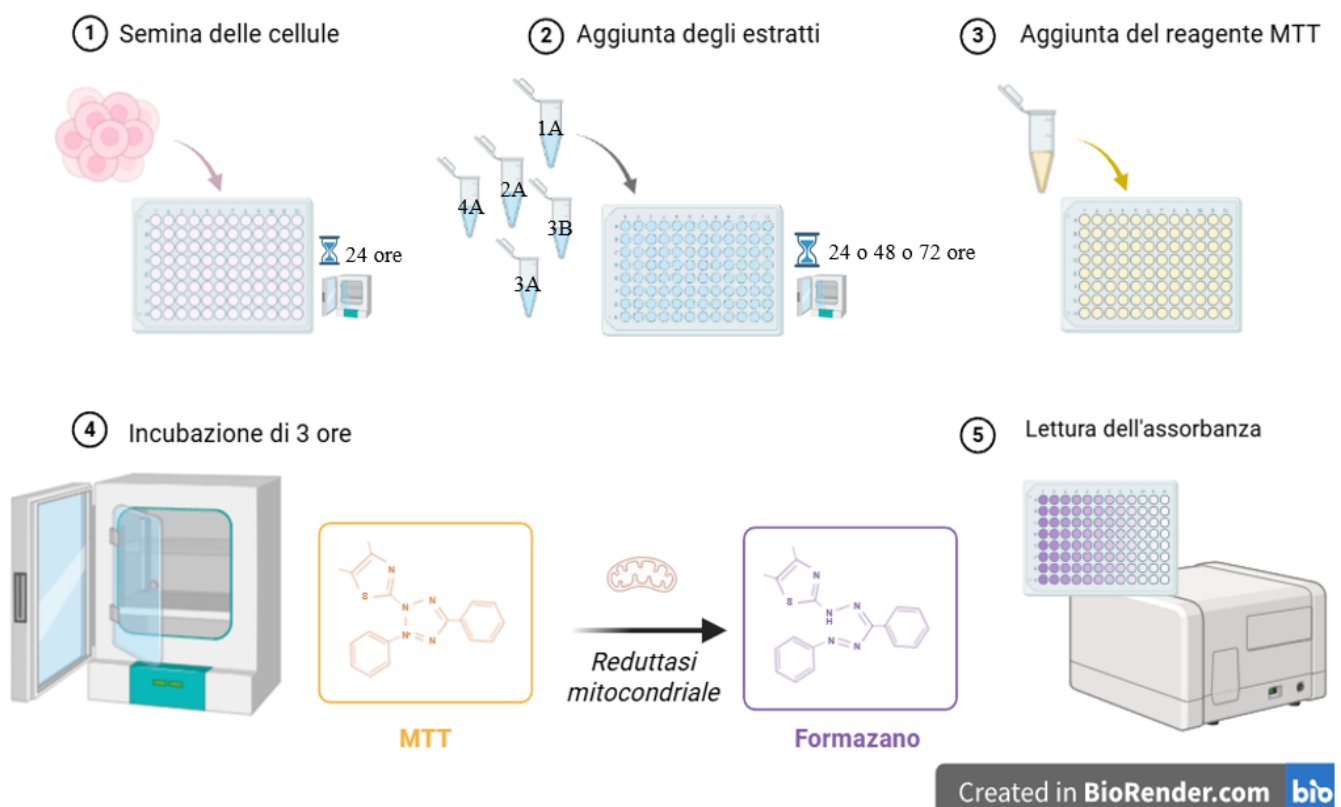
Infine, l'intensità colorimetrica della soluzione è stata quantificata mediante la lettura dell'assorbanza a 550 nm, utilizzando un lettore di micropiastre BioTek ELx808™. Infatti, il numero di cellule metabolicamente attive è direttamente proporzionale all'intensità del colore viola della soluzione.

L'esecuzione del saggio MTT è riportata schematicamente nella Figura 6.

Dai valori ottenuti dal test MTT, è stato possibile successivamente calcolare due parametri necessari per definire la citotossicità degli estratti:

- IC<sub>25</sub>, che rappresenta la concentrazione di estratto che riduce la vitalità cellulare del 25% rispetto al controllo (pozzetto con 0 µg/ml di estratti);
- IC<sub>50</sub>, concentrazione di estratto che riduce la vitalità cellulare del 50% rispetto al controllo.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato per garantire la riproducibilità e l'affidabilità statistica dei risultati ottenuti. Inoltre, per verificare che l'azione citotossica fosse attribuibile agli estratti e non al solvente utilizzato per la loro dissoluzione, è stata allestita una condizione contenente cellule e DMSO a una concentrazione pari a quella contenuta nelle cellule trattate con la maggiore concentrazione dell'estratto (125 µg/ml). Il confronto tra controllo e DMSO non ha evidenziato differenze statisticamente significative per quanto riguarda la vitalità cellulare, dimostrando che gli effetti citotossici sono attribuibili solo all'azione degli estratti testati.



**Figura 6:** Schema sperimentale del saggio MTT. (1) Le cellule vengono seminate in una piastra da 96 pozzetti (10,000 cell/pozzetto) e incubate per 24 ore. (2) Vengono aggiunti gli estratti e la piastra viene incubata per 24 o 48 o 72 ore. (3) Viene aggiunto l'MTT. (4) La piastra viene incubata per 3 ore al fine di favorire la riduzione dell'MTT a cristalli di formazano. (5) Viene misurata l'assorbanza a 550 nm mediante il lettore di micropiastre ELx808TM. Figura creata con BioRender.com

### 3.4.2 Saggio Trypan Blue

Il saggio Trypan Blue è un metodo basato sull'esclusione tintoriale, utilizzato per distinguere le cellule vitali da quelle non vitali basandosi sulla permeabilità della loro membrana plasmatica. Le cellule vive sono caratterizzate da una membrana cellulare integra che non permette l'ingresso del colorante all'interno della cellula, e quindi risulteranno incolori. Al contrario, le cellule morte risulteranno colorate di blu, perché presentano una membrana plasmatica danneggiata che permette il passaggio del colorante trypan blue. Questo fenomeno di colorazione differenziale permette così il conteggio e la quantificazione delle due popolazioni cellulari tramite microscopia. Successivamente, per calcolare la vitalità cellulare si utilizza la seguente formula:

$$\text{Vitalità cellulare (\%)} = \frac{\text{Numero di cellule vive}}{\text{Numero totale di cellule}} \times 100$$

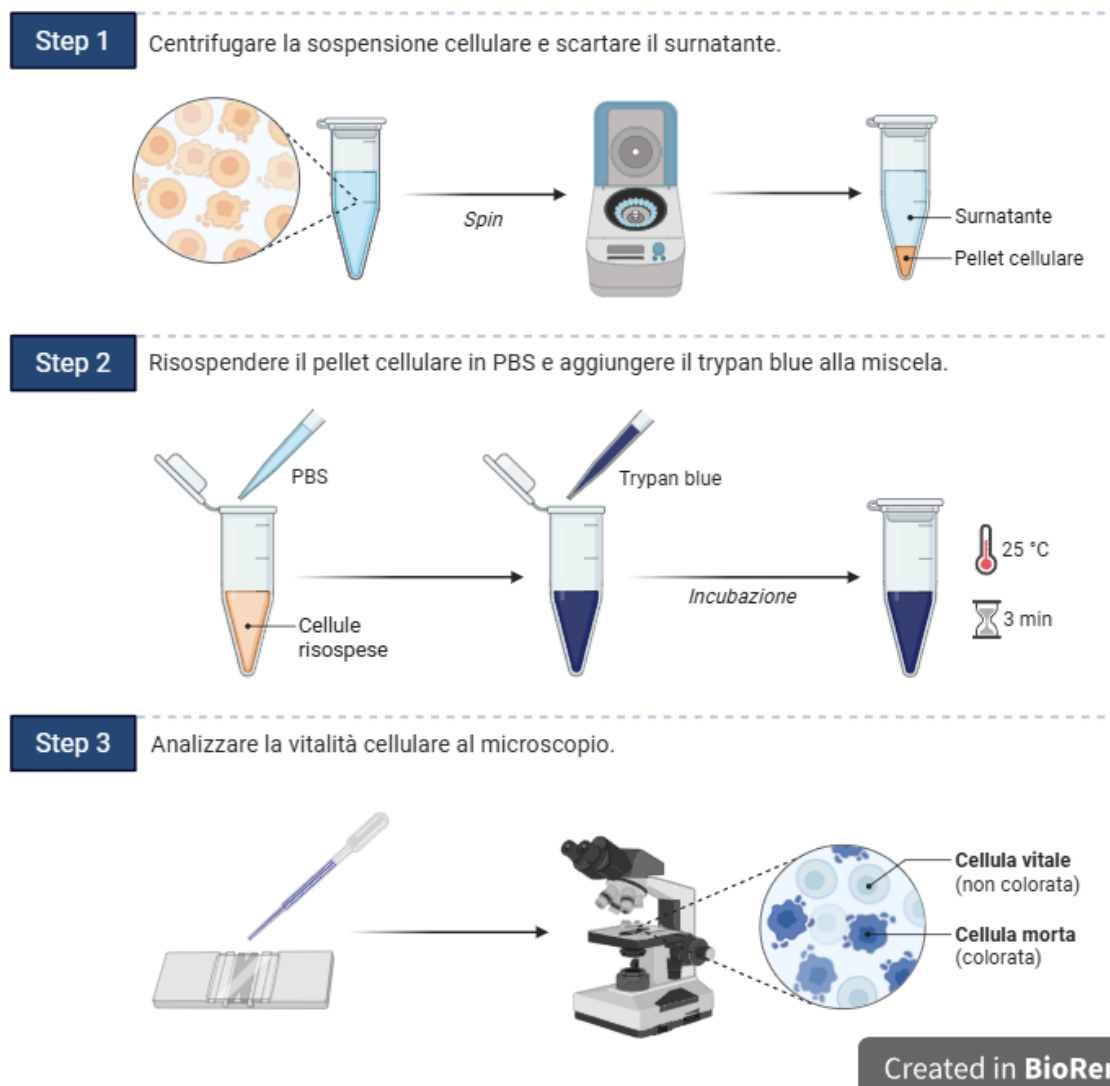
(Strober, 2015)

Lo schema sperimentale del saggio in analisi è rappresentato nella Figura 7.

Per il saggio trypan blue, le cellule sono state seminate su una piastra da 6 pozzetti alla densità di 250.000 cellule per pozzetto e lasciate stabilizzare per 24 ore prima del trattamento. Gli estratti sono stati somministrati alle concentrazioni di IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub> precedentemente calcolate grazie al saggio MTT. Le concentrazioni sono state calcolate per ogni linea cellulare, tempo di esposizione ed estratto, poiché la risposta citotossica può variare in modo significativo a diversi tempi e tra diverse linee cellulari. Successivamente, sfruttando la capacità del trypan blue di attraversare le membrane cellulari danneggiate, è stata valutata la vitalità cellulare dopo 24, 48, 72 ore di trattamento.

In particolare, le cellule sono state prima staccate dalla superficie della piastra mediante trattamento con tripsina per 5 minuti e successivamente centrifugate a 1000-1900 rpm per 5-9 minuti. Le cellule contenute nel pellet sono state risospese in 1 ml di PBS (soluzione salina tampone fosfato) e 10 µl della sospensione cellulare sono stati mescolati con 10 µl di trypan blue. La soluzione ottenuta è stata caricata nella camera di Burker e si è proceduto al conteggio cellulare utilizzando il contatore automatizzato Countess<sup>TM</sup> 3 (Invitrogen).

Tutti gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplicato e il veicolo DMSO, testato alla concentrazione massima impiegata negli esperimenti (125 µg/ml), non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa rispetto alla condizione non trattata, escludendo qualsiasi contributo del solvente agli effetti citotossici osservati.



**Figura 7:** Schema sperimentale del saggio Trypan blue. (1) La sospensione cellulare viene centrifugata per isolare il pellet. (2) Il pellet viene risospeso in PBS e si aggiunge il Trypan blue. (3) Osservazione al microscopio delle cellule vitali (non colorate) e delle cellule non vitali (colorazione blu). Figura creata con BioRender.com

### 3.5 Saggio clonogenico

Il saggio clonogenico, noto anche come saggio di sopravvivenza cellulare (cell survival assay), valuta la capacità della singola cellula di sopravvivere, proliferare e originare una colonia di cellule figlie geneticamente identiche. Contrariamente ai saggi di vitalità cellulare come l'MTT e il Trypan blue, che misurano la sopravvivenza cellulare in un determinato momento, il saggio clonogenico valuta la vitalità cellulare su un arco temporale più ampio, rappresentando uno strumento più informativo per

definire l'efficacia di agenti antitumorali. Questa maggiore sensibilità deriva dalla capacità del saggio di distinguere le cellule vitali che mantengono una piena capacità proliferativa da quelle che, pur risultando vive al momento della misurazione, hanno subito danni talmente gravi da aver perso in maniera irreversibile la capacità di proliferare (Franken et al., 2006).

Per il saggio clonogenico, le cellule U251 e 4T1, precedentemente staccate mediante tripsinizzazione, sono state seminate in piastre da 6 pozzetti con una densità di 200 cellule per pozzetto in 2 ml di terreno completo. Le cellule sono state incubate per 24 ore al fine di consentire l'adesione cellulare alla superficie del pozzetto. Al termine delle 24 ore il terreno è stato sostituito con terreno fresco arricchito con gli estratti a diverse concentrazioni: 0, 5, 25, 50, 75, 100 e 125 µg/ml. Trascorse 72 ore di esposizione, le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS 1x (soluzione salina tamponata con fosfato), dopodiché è stato aggiunto terreno completo fresco (e privo di estratti) e le cellule sono state incubate per una settimana al fine di consentire alle cellule sopravvissute di proliferare e formare colonie. Successivamente, il terreno è stato rimosso e le cellule sono state:

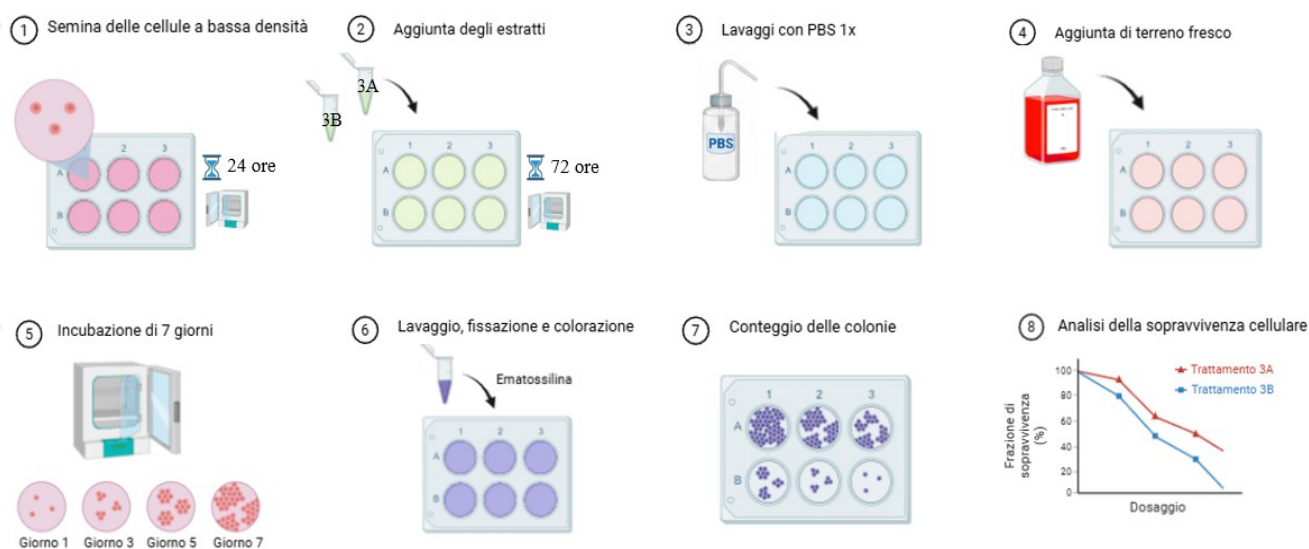
- lavate per tre volte con PBS 1x per eliminare i residui di terreno;
- fissate con etanolo al 70% per 7 minuti a temperatura ambiente per preservare la morfologia cellulare;
- e colorate mediante ematossilina.

Successivamente sono state contate esclusivamente le colonie composte da un minimo di 50 cellule (Figura 8). Tale criterio di selezione è stato applicato per escludere dall'analisi i piccoli aggregati cellulari; questi ultimi sono infatti originati da cellule che, pur avendo subito danni letali in seguito al trattamento, conservano la capacità residua di compiere solo un numero limitato di divisioni prima di andare incontro ad arresto replicativo o morte (Rafehi et al., 2011).

Infine, è stata calcolata la *frazione di sopravvivenza* (SF) con la seguente formula:

$$SF = \frac{\text{Number of colonies formed after exposure}}{\text{Number of untreated control colonies cells seeded}} \times 100$$

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e il controllo con DMSO non ha mostrato differenze significative rispetto alle condizioni di controllo.



Created in BioRender.com

**Figura 8:** Schema sperimentale del saggio clonogenico. (1) Le cellule vengono seminate in una piastra da 6 pozzetti (200 cell/pozzetto) e incubate per 24 ore. (2) Vengono aggiunti gli estratti e la piastra viene incubata per 72 ore. (3) Le cellule sono sottoposte a tre lavaggi con PBS 1x. (4) Aggiunta di terreno di coltura fresco. (5) Incubazione della piastra per 7 giorni. (6) Le cellule vengono lavate tre volte con PBS 1x, fissate con etanolo al 70% per 7 minuti e colorate con ematossilina. (7) Conteggio delle colonie composte da un minimo di 50 cellule. (8) Analisi della frazione di sopravvivenza cellulare. Figura creata con BioRender.com

### 3.6 Valutazioni di immunofluorescenza

Per l'analisi immunocitochimica, le cellule U251 e 4T1 sono state piastrate con una densità di 250.000 cellule per vetrino (con una dimensione di 22 x 22 mm), e incubate per 24 ore. Successivamente, il terreno è stato rinnovato e le cellule sono state esposte per 72 ore agli estratti del legno di potatura alla concentrazione di IC<sub>25</sub> oppure mantenute in condizioni di controllo senza somministrazione degli estratti. Al termine del trattamento, le cellule sono state prima fissate in formalina al 4% per 20 minuti, allo scopo di bloccare le cellule nel loro stato fisiologico e quindi preservare l'integrità degli epitopi proteici, e poi conservate in etanolo al 70% a una temperatura di -20°C fino al momento della colorazione.

Le cellule sono state quindi reidratate utilizzando PBS 1x e incubate per 1 ora con una soluzione contenente PBS 1x e albumina sierica bovina (BSA) all'1%, al fine di bloccare i siti aspecifici. La BSA, infatti, è un agente bloccante capace di saturare i siti di legame aspecifici presenti sulle cellule.

In seguito, le cellule sono state incubate con anticorpi primari selezionati (Tabella 1), precedentemente diluiti in PBS 1x contenente BSA all'1%, in una camera umidificata per 2 ore a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. Le cellule sono state quindi lavate per tre volte con PBS 1x al fine di rimuovere l'eccesso di anticorpo primario non legato e incubate per 1 ora con anticorpi secondari coniugati con fluorofori (Tabella 1), anch'essi opportunamente diluiti in PBS 1x e BSA all'1%. In seguito a tre ulteriori lavaggi con PBS 1x, le cellule sono state incubate per 5 minuti con il colorante fluorescente Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) a una concentrazione di 0.1 µg/ml per 5 minuti, al fine di colorare il DNA nucleare. Al termine della procedura, le cellule sono state lavate 3 volte con PBS 1x e i vetrini sono stati montati utilizzando Mowiol (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), un mezzo di montaggio capace di polimerizzare e preservare il segnale di fluorescenza nel tempo.

La visualizzazione dell'immunofluorescenza è stata eseguita tramite un microscopio Leica DM6B WF (Leica Microsystems, Buccinasco, Milano, Italia), dotato di una fotocamera digitale CMOS ORCA-Flash 4.0 V3 C13440-20CU (Hamamatsu Photonics, Arese, Milano, Italia) necessaria per acquisire le immagini, le quali sono state registrate mediante il software Leica Application Suite X (LAS X) (Versione 5.1.0). La quantificazione dell'intensità di fluorescenza è stata effettuata con il software Image J (Versione 1.51).

Per verificare la specificità dell'anticorpo secondario, sono stati eseguiti esperimenti di controllo negativo; in tali condizioni non è stato rilevato alcun segnale di fluorescenza. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e il controllo con DMSO non ha mostrato differenze significative rispetto alle condizioni non trattate.

| <i>Anticorpi (Ab)</i> |                                                                                                            | <i>Diluizione</i> |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Primario              | Bax P-19<br>Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Rabbit polyclonal IgG, Cat n. sc-526           | 1:250             |
| Primario              | Bcl-2 C-2<br>Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Mouse polyclonal IgG, Cat n. sc-7382          | 1:250             |
| Primario              | Caspase-3 31A1067<br>Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Mouse monoclonal IgG, Cat n. sc-56053 | 1:250             |
| Secondario            | Alexa 488-conjugated anti-mouse antibody<br>(Molecular Probes, Invitrogen)                                 | 1:200             |
| Secondario            | Alexa 594-conjugated anti-rabbit antibody<br>(Molecular Probes, Invitrogen)                                | 1:200             |

**Tabella 1:** Anticorpi primari e secondari utilizzati nell'analisi di immunocitochimica.

### 3.7 Saggio di valutazione dell'attività antiossidante cellulare

L'attività antiossidante degli estratti di legno di potatura nelle cellule in esame è stata valutata mediante il saggio DCFH-DA. In particolare, in tale saggio viene utilizzato un colorante fluorogenico, chimicamente noto come 2,7- Diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), che, grazie alla sua natura lipofila, è capace di diffondere facilmente attraverso le membrane plasmatiche. Una volta all'interno delle cellule viene idrolizzato in DCFH non fluorescente ad opera di esterasi citoplasmatiche che rimuovono i due gruppi acetato. In presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) il DCFH viene ossidato a DCF (2,7-Diclorofluorescina), una molecola fluorescente di colore verde la cui intensità di emissione è direttamente proporzionale alla concentrazione intracellulare di ROS (Kalyanaraman et al., 2012) (Figura 9).

Per l'esecuzione del saggio, le cellule, precedentemente seminate in vetrini riposti in piastre multiwell da 6 pozzetti con una densità di 250.000 cellule per pozzetto, sono state esposte per 72 ore agli estratti del legno di potatura alla concentrazione di IC<sub>25</sub>.

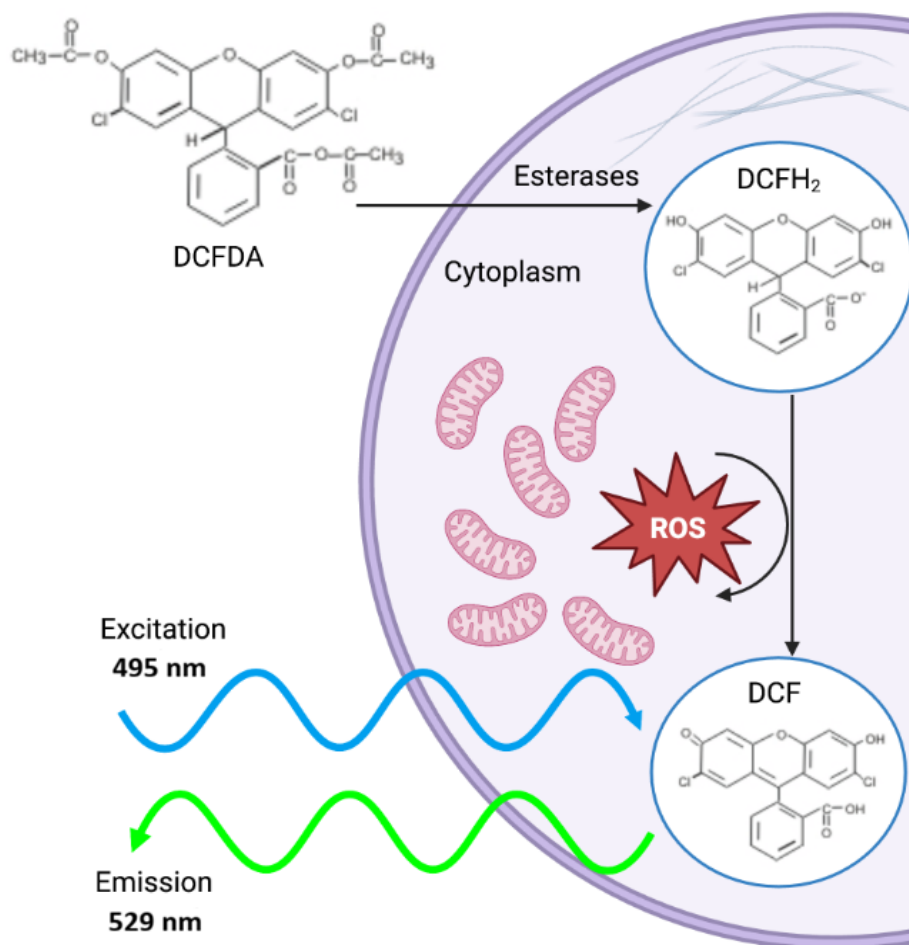
Al termine di tale incubazione sono state allestite due condizioni sperimentali:

- una condizione basale, in cui le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C, al riparo dalla luce, con una soluzione contenente 10 µM di DCFH-DA preparata nel terreno di coltura appropriato;
- una condizione di stress ossidativo indotto, in cui dopo il pretrattamento con gli estratti, le cellule sono state esposte a 500 µM di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) per 30 minuti. Successivamente, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco arricchito con 10 µM di DCFH-DA e le cellule sono incubate per 30 minuti.

Al termine dell'incubazione con DCFH-DA, le cellule sono state sottoposte a tre lavaggi con PBS 1x al fine di rimuovere il DCFH-DA non internalizzato.

L'osservazione dell'intensità di fluorescenza è stata eseguita mediante il microscopio a fluorescenza Leica DM6B WF (Leica Microsystems, Buccinasco, Milano, Italia), dotato di una fotocamera digitale CMOS ORCA-Flash 4.0 V3 C13440-20CU (Hamamatsu Photonics, Arese, Milano, Italia) necessaria per acquisire le immagini, le quali sono state registrate mediante il software Leica Application Suite X (LAS X) (Versione 5.1.0). La sonda fluorescente è stata eccitata con una lunghezza d'onda di 495 nm e la fluorescenza emessa è stata rilevata a 529 nm. L'intensità di fluorescenza, proporzionale alla concentrazione intracellulare di ROS, è stata misurata utilizzando il software Image J.

Anche in questo caso tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato e la condizione trattata con DMSO non ha mostrato differenze significative rispetto alle condizioni di controllo.



**Figura 9:** Schema del meccanismo d'azione del DCFH-DA. Il DCFH-DA attraversa passivamente la membrana plasmatica e viene convertito in 2'-7'-Diclorodihydrofluoresceina (DCFH<sub>2</sub>) ad opera di esterasi citoplasmatiche. In presenza di ROS, il DCFH<sub>2</sub> viene ossidato in 2'-7'-Diclofluoresceina (DCF), il quale emette fluorescenza nel verde ( $\lambda = 529$  nm) se eccitato con una lunghezza d'onda di 495 nm. Figura creata con BioRender.com.

### 3.8 Analisi statistica

I dati sono riportati come valori medi  $\pm$  errore standard della media (SEM). Per verificare la distribuzione normale dei dati sono stati usati il test Shapiro-Wilk e il test Barlett. Per l'analisi delle differenze statistiche è stata utilizzato il test ANOVA a una via, seguito dal test *post-hoc* di Bonferroni

per i confronti multipli. Per l'analisi statistica è stato utilizzato GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

La significatività statistica delle differenze osservate è stata determinata dai seguenti valori p:

$P < 0.05$  equivale a \*

$P < 0.01$  equivale a \*\*

$P < 0.001$  equivale a \*\*\*

## 4. RISULTATI

### 4.1 Valutazione dell'attività citotossica degli estratti di legno di potatura di *Vitis vinifera*

Gli estratti purificati impiegati in questo lavoro di tesi (1A, 2A, 3A, 4A e la frazione 3B) sono stati forniti dal gruppo di ricerca del Dipartimento di Scienze del Farmaco (MedChemLab) dell'Università di Pavia, che ha eseguito le procedure di estrazione sequenziale, purificazione e caratterizzazione chimica. Successivamente, gli estratti sono stati impiegati per la valutazione della loro attività biologica attraverso una serie di saggi *in vitro*, con l'obiettivo di definirne il potenziale citotossico nei confronti di cellule tumorali.

#### 4.1.1 Valutazione della citotossicità dose- e tempo- dipendente degli estratti di legno di potatura di *Vitis vinifera* in cellule di GBM

Inizialmente, per valutare l'attività citotossica degli estratti purificati 1A, 2A, 3A, 4A, è stato utilizzato il modello cellulare di glioblastoma umano U251. La vitalità cellulare è stata determinata mediante saggio MTT dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. A tutti i tempi di esposizione, l'estratto 3A ha mostrato il più marcato effetto citotossico, determinando una riduzione della vitalità cellulare significativamente maggiore rispetto agli estratti 1A, 2A, 4A e risultando, nell'intervallo di concentrazioni testato, l'unico capace di raggiungere un tasso di mortalità superiore al 50 % (Figura 10, Pannello A, B e C).

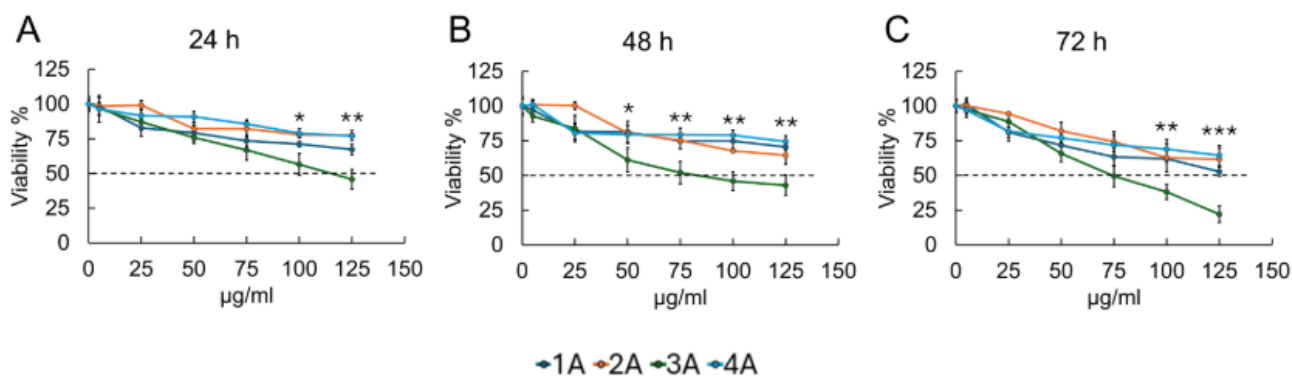
Come mostrato nel Pannello A della Figura 10, dopo 24 ore di trattamento, la vitalità cellulare diminuisce progressivamente all'aumentare della concentrazione di tutti gli estratti. Tuttavia, a differenza degli estratti 1A, 2A e 4A, l'estratto 3A ha evidenziato un effetto dose-dipendente più marcato sulla vitalità cellulare, riducendo la vitalità cellulare al 45,78% alla concentrazione massima testata (125 µg/ml). Questa riduzione è risultata statisticamente significativa rispetto agli estratti 1A, 2A e 4A alle concentrazioni di 100 e 125 µg/ml.

Dopo 48 ore di trattamento, Pannello B della Figura 10, si conferma che l'estratto 3A è quello con un maggior effetto citotossico, causando una riduzione della vitalità cellulare fino al 42,91% alla concentrazione di 125 µg/ml. In questo caso, le differenze rispetto agli altri estratti risultano

statisticamente significative già a partire dalla concentrazione di 50 µg/ml e diventano più evidenti alle concentrazioni superiori.

L'effetto massimo si osserva dopo 72 ore di trattamento, Pannello C della Figura 10, quando l'estratto 3A determina la più marcata riduzione della vitalità cellulare, che raggiunge circa il 22,08% alla concentrazione massima testata, corrispondente a una mortalità superiore al 75%. Gli estratti 1A, 2A e 4A mostrano invece un'attività citotossica inferiore, mantenendo una vitalità cellulare superiore al 55 - 60% anche alla concentrazione massima.

Sulla base di questi risultati, l'estratto 3A, che ha mostrato un'attività citotossica dose- e tempo-dipendente significativamente maggiore rispetto agli altri nella linea U251, è stato selezionato per le successive analisi.



**Figura 10:** Vitalità cellulare (% , misurata mediante saggio MTT) di cellule di GBM umano U251 trattate con l'estratto 1A (colore blu), 2A (colore arancione), 3A (colore verde) e 4A (colore azzurro) a 24 (Pannello A), a 48 (Pannello B) e 72 (Pannello C) ore, in funzione della concentrazione del trattamento (µg/ml). Il saggio ha evidenziato una maggiore attività citotossica dell'estratto 3A rispetto agli altri estratti esaminati. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a una via seguita dal test post hoc di Bonferroni, e indica le differenze statistiche dell'estratto 3A rispetto agli estratti 1A, 2A e 4A. I livelli di significatività statistica sono indicati come segue:  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*;  $p < 0.001$  \*\*\*.

#### 4.1.2 Contributo di (E)-resveratrolo ed (E)- $\epsilon$ -viniferina all'attività citotossica

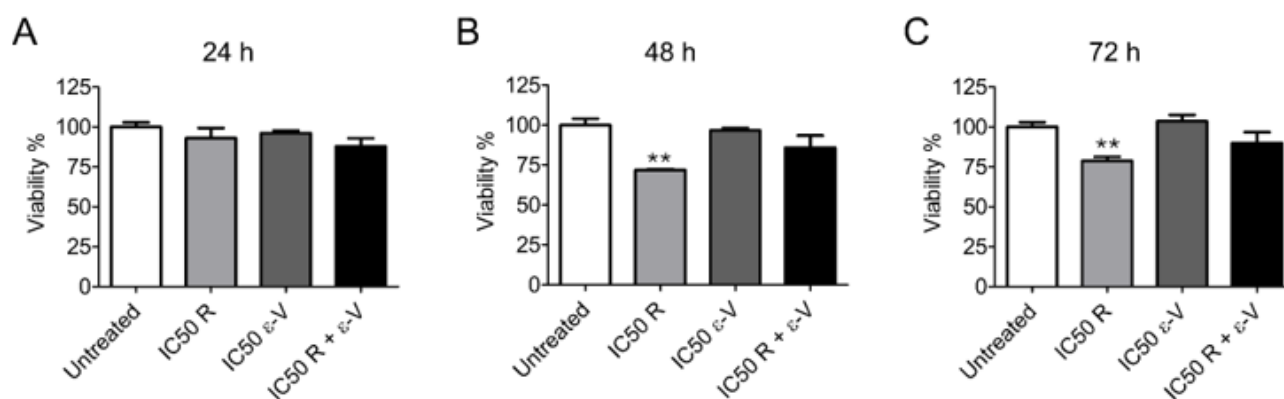
Poiché l'estratto 3A ha mostrato una più marcata attività citotossica sulle cellule U251, e considerando che le analisi svolte dal MedChemLab hanno identificato come sue due principali molecole l'(E)-resveratrolo e la (E)- $\epsilon$ -viniferina, già ampiamente noti in letteratura come agenti antitumorali, abbiamo investigato il loro specifico contributo all'interno del fitocomplesso (Quero et al., 2021). Pertanto, è stato valutato mediante saggio MTT l'effetto dei due composti isolati o in combinazione, con lo scopo di verificare se l'azione citotossica dell'estratto fosse interamente riconducibile a essi o se derivasse anche da altri componenti minoritari. In particolare, le cellule U251 sono state trattate con (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina, somministrati singolarmente o in combinazione, utilizzando le concentrazioni che questi composti presentano all'interno dell'estratto 3A alla sua IC<sub>50</sub>. Poiché l'IC<sub>50</sub> dell'estratto 3A varia in funzione del tempo di esposizione, le concentrazioni dei singoli composti sono state modificate di conseguenza: dopo 24 ore di trattamento sono state utilizzate concentrazioni di circa 26  $\mu$ M per l'(E)-resveratrolo e 22  $\mu$ M per la (E)- $\epsilon$ -viniferina, mentre dopo 48 e 72 ore di trattamento le concentrazioni sono state rispettivamente di circa 16  $\mu$ M e 14  $\mu$ M.

Dopo 24 ore di trattamento, Pannello A Figura 11, né l'(E)-resveratrolo né la (E)- $\epsilon$ -viniferina, somministrati singolarmente o in combinazione, hanno mostrato una riduzione significativa della vitalità cellulare rispetto al controllo non trattato.

Dopo 48 ore di trattamento, Pannello B della Figura 11, solo il trattamento con (E)-resveratrolo ha mostrato una riduzione significativa ( $p < 0.01$ ) della vitalità cellulare, che comunque rimane intorno al 70%, mentre la (E)- $\epsilon$ -viniferina e la combinazione dei due composti non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo non trattato.

Dopo 72 ore, Pannello C della Figura 11, è stato osservato un andamento analogo a quello riscontrato nel pannello B della medesima Figura.

I dati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento con i singoli composti o con la loro combinazione non ha raggiunto una riduzione della vitalità cellulare del 50%, contrariamente a quanto osservato nell'estratto 3A. Ciò suggerisce che l'attività citotossica dell'estratto 3A sulle cellule U251, non sia esclusivamente attribuibile alla presenza dell'(E)-resveratrolo e della (E)- $\epsilon$ -viniferina, ma alla presenza o alla sinergia di ulteriori composti bioattivi presenti nell'estratto.



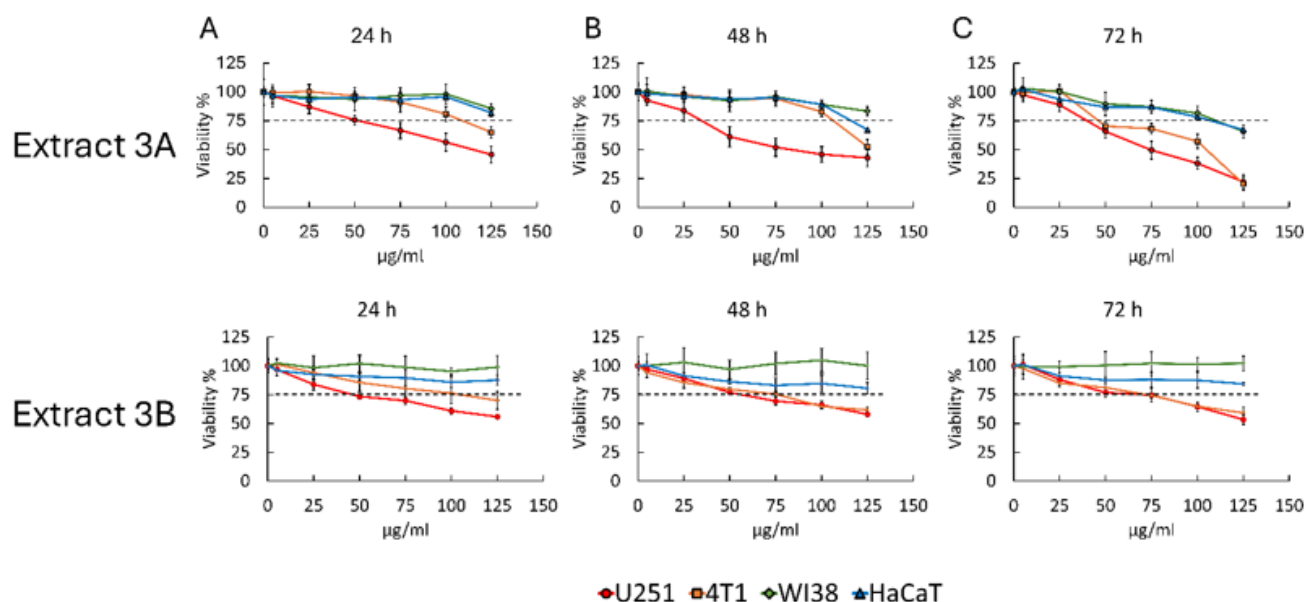
**Figura 11:** Effetto sulla vitalità cellulare (% , misurata mediante MTT) di cellule di GBM umano U251 di (E)-resveratrolo e (E)-ε-viniferina, somministrati singolarmente (IC<sub>50</sub> R e IC<sub>50</sub> ε-V) o in combinazione (IC<sub>50</sub> R + ε-V), presenti nell'estratto 3A alla concentrazione corrispondente alla IC<sub>50</sub>, a 24 (Pannello **A**), 48 (Pannello **B**) e 72 (Pannello **C**) ore. Il saggio ha evidenziato che la citotossicità indotta dall' estratto 3A nelle cellule U251 non è interamente attribuibile alla presenza di (E)-resveratrolo e (E)-ε-viniferina. L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a una via seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni.  $p < 0.01$  \*\*.

#### 4.1.3 Attività citotossica dei campioni 3A e 3B nelle linee cellulari tumorali e non tumorali.

Dal momento che i risultati precedenti hanno evidenziato che l'attività citotossica dell'estratto 3A non può essere ricondotta esclusivamente alla presenza dell'(E)-resveratrolo e della (E)-ε-viniferina, è stata valutata la frazione 3B, ottenuta mediante rimozione di questi due stilbeni dall'estratto 3A originale. L'obiettivo era verificare se la frazione mantenesse l'attività antitumorale dell'estratto originario e valutarne la selettività nei confronti di cellule tumorali e non tumorali. A tale scopo, la citotossicità di 3A e 3B è stata analizzata mediante saggio MTT nelle linee tumorali U251 e 4T1 e nelle linee cellulari non tumorali WI38 e HaCaT dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento (Figura 12, Pannello A, B e C).

Come mostrato in Figura 12, sia l'estratto 3A che la frazione 3B hanno determinato una riduzione della vitalità cellulare dose- e tempo-dipendente nelle linee cellulari tumorali U251 e 4T1. Già dopo 24 ore di trattamento (Pannello A della Figura 12) è possibile osservare una diminuzione della vitalità cellulare all'aumentare della concentrazione, effetto che diventa progressivamente più evidente dopo 48 (Pannello B della Figura 12) e soprattutto dopo 72 ore di trattamento (Pannello C della Figura 12).

In entrambe le condizioni sperimentali, le cellule U251 hanno mostrato una maggiore sensibilità rispetto alle cellule 4T1, mentre le linee cellulari non tumorali WI38 e HaCaT hanno mantenuto valori di vitalità significativamente più elevati durante tutto il periodo di trattamento, indicando una ridotta suscettibilità agli estratti.



**Figura 12:** Effetto dell'estratto 3A e della sua frazione 3B sulla vitalità cellulare delle linee tumorali U251 e 4T1 e delle linee non tumorali WI38 e HaCaT dopo 24 (Pannello A), 48 (Pannello B) e 72 (Pannello C) ore di trattamento, valutato mediante saggio MTT. La vitalità cellulare (%) è riportata in funzione della concentrazione del trattamento (µg/ml). L'estratto 3A (Pannelli superiori) e la frazione 3B (Pannelli inferiori) mostrano un'attività citotossica selettiva nei confronti delle linee cellulari tumorali, in particolare delle cellule U251, mentre le linee cellulari non tumorali mantengono elevati livelli di vitalità durante tutto il periodo sperimentale.

I valori di  $IC_{25}$ , ovvero le concentrazioni di estratto necessarie per ridurre la vitalità cellulare del 25%, sono riportati nella Tabella 2. Nelle cellule U251, sia l'estratto 3A che la frazione 3B raggiungono l' $IC_{25}$  a concentrazioni inferiori rispetto alle altre linee cellulari, indicando una maggiore suscettibilità di questa linea tumorale ai trattamenti. Le cellule 4T1 mostrano invece valori di  $IC_{25}$  generalmente più elevati, mentre nelle linee WI38 e HaCaT l' $IC_{25}$  non viene raggiunta nella maggior parte delle condizioni sperimentali ( $IC_{25} > 125 \mu\text{g/ml}$ ), a conferma della ridotta citotossicità di entrambi i campioni nei confronti delle cellule non tumorali.

| Cellule | <i>Estratto 3A – IC<sub>25</sub> (µg/ml)</i> |               |               | <i>Frazione 3B – IC<sub>25</sub> (µg/ml)</i> |              |               |
|---------|----------------------------------------------|---------------|---------------|----------------------------------------------|--------------|---------------|
|         | <b>24 H</b>                                  | <b>48 H</b>   | <b>72 H</b>   | <b>24 H</b>                                  | <b>48 H</b>  | <b>72 H</b>   |
| U251    | 53,58 ± 5,34                                 | 36,89 ± 4,49  | 42,10 ± 4,19  | 41,95 ± 6,66                                 | 55,73 ± 6,86 | 45,76 ± 20,19 |
| 4T1     | 105,20 ± 5,54                                | 105,62 ± 2,53 | 46,50 ± 1,05  | 104,71 ± 17,56                               | 75,25 ± 6,01 | 80,32 ± 4,91  |
| WI38    | >125                                         | >125          | 104,22 ± 7,81 | >125                                         | >125         | >125          |
| HaCaT   | >125                                         | 116,24 ± 0,84 | 109,24 ± 1,81 | >125                                         | >125         | >125          |

**Tabella 2:** Valori di IC<sub>25</sub> (µg/ml) dell'estratto 3A e della frazione 3B ottenuti mediante saggio MTT nelle linee cellulari tumorali U251 e 4T1 e nelle linee cellulari non tumorali WI38 e HaCaT dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento. I valori sono espressi come media ± SEM. Il valore > 125 indica che la concentrazione necessaria a indurre una riduzione della vitalità cellulare del 25% non è stata raggiunta nell'intervallo di concentrazioni testato.

Al fine di verificare la selettività dell'effetto citotossico dei due campioni, è stata confrontata la risposta delle linee cellulari tumorali (U251 e 4T1) con quella delle linee cellulari non tumorali (WI38 e HaCaT), utilizzando i valori di IC<sub>25</sub> ottenuti mediante saggio MTT.

Dopo 72 ore di esposizione l'estratto 3A, ha mostrato una marcata selettività nei confronti delle cellule tumorali, determinando un incremento della mortalità del 41,20 ± 3,41% nelle cellule U251 e del 27,76 ± 4,48% nelle cellule 4T1 rispetto alle linee cellulari non tumorali. La frazione 3B non ha raggiunto una mortalità del 25% nelle cellule WI38 e HaCaT nell'intervallo di concentrazioni testato, ma ha indotto un incremento della mortalità pari al 38,75 ± 4,28% nelle cellule U251 e al 32,98 ± 4,87% nelle cellule 4T1.

Questi valori sono stati ottenuti confrontando la vitalità delle cellule tumorali con quella delle cellule non tumorali alla medesima concentrazione. Per l'estratto 3A è stata calcolata la concentrazione IC<sub>25</sub> media sulle cellule sane (WI38 e HaCaT), corrispondente a una vitalità residua del 75%. A questa stessa concentrazione è stata poi rilevata la vitalità delle cellule tumorali, e la differenza tra i due valori (75% meno la vitalità osservata nelle cellule tumorali) ha fornito l'incremento di mortalità selettivamente indotto nelle cellule tumorali.

Per la frazione 3B, non essendo stata raggiunta la concentrazione IC<sub>25</sub> nelle cellule sane nell'intervallo di concentrazione testato, è stata utilizzata come riferimento la concentrazione

massima testata (125  $\mu\text{g/ml}$ ), applicando lo stesso confronto tra la vitalità delle cellule sane e quella delle cellule tumorali a tale dose.

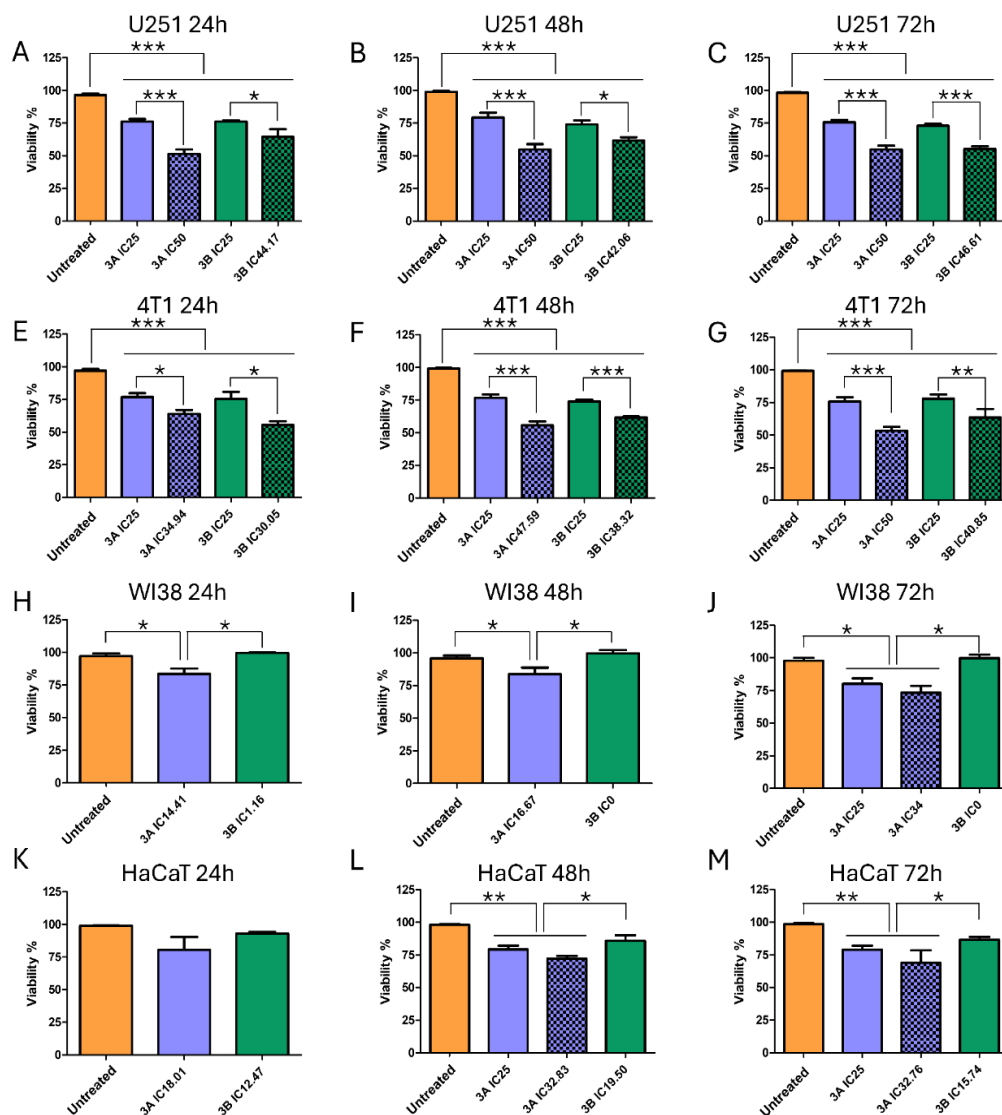
#### **4.1.4 Conferma dell'attività citotossica di 3A e 3B mediante saggio Trypan Blue**

Al fine di verificare i valori di vitalità cellulare ottenuti dall'analisi delle curve dose-risposta del saggio MTT, le linee cellulari U251, 4T1, WI38 e HaCaT sono state trattate con le concentrazioni corrispondenti ai valori di IC calcolati per l'estratto 3A e la frazione 3B ai diversi tempi di esposizione. La vitalità cellulare determinata mediante saggio MTT è stata quindi confermata mediante il saggio Trypan blue (Figura 13). Nello specifico, le cellule sono state trattate utilizzando le concentrazioni corrispondenti ai valori di  $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$  determinate precedentemente. Nel caso in cui il profilo di citotossicità del composto non abbia raggiunto il 25 o il 50% di mortalità (ossia il valore  $\text{IC}_{25}$  o  $\text{IC}_{50}$ ), è stata testata la massima concentrazione saggio utilizzata (125  $\mu\text{g/ml}$ ). In tali condizioni, l'effetto biologico è stato valutato e riportato in base al valore effettivo di inibizione percentuale raggiunto dal saggio MTT (ad esempio  $\text{IC}_{44,17}$  alle 24h di trattamento delle cellule U251 con la frazione 3B o  $\text{IC}_{30,05}$  alle 24h di trattamento delle cellule 4T1 con la frazione 3B), consentendo così una validazione diretta della citotossicità reale del trattamento.

Come mostrato nella Figura 13, i trattamenti con concentrazioni corrispondenti ai valori di IC hanno determinato livelli di vitalità cellulare in accordo con quelli calcolati dall'MTT. Nelle linee cellulari tumorali U251 e 4T1, le concentrazioni corrispondenti alla concentrazione  $\text{IC}_{25}$  hanno mantenuto la vitalità intorno al 75%, mentre quelle corrispondenti alla  $\text{IC}_{50}$  hanno ridotto la vitalità a circa il 50%. Analogamente, i valori intermedi di IC (ad esempio  $\text{IC}_{34,94}$  alle 24 ore di trattamento delle cellule 4T1 con l'estratto 3A o  $\text{IC}_{42,06}$  alle 48 ore di trattamento delle cellule U251 con la frazione 3B) hanno determinato livelli di vitalità coerenti con la percentuale di inibizione prevista.

Nelle linee cellulari non tumorali WI38 e HaCaT, la risposta agli estratti è risultata sensibilmente inferiore. In queste cellule, infatti, nella maggior parte delle condizioni sperimentali non è stato possibile determinare un valore di  $\text{IC}_{25}$ , poiché la vitalità cellulare è rimasta elevata anche alla concentrazione massima testata. Di conseguenza, sono stati calcolati esclusivamente valori di IC inferiori (ad esempio  $\text{IC}_{16,67}$  alle 48 ore di trattamento delle cellule WI38 con l'estratto 3A o  $\text{IC}_{15,74}$  alle 72 ore di trattamento delle cellule HaCaT con la frazione 3B), oppure non è stato possibile identificare alcun valore di inibizione misurabile ( $\text{IC}_0$ ), confermando la ridotta suscettibilità delle linee cellulari non tumorali ai trattamenti.

Nel complesso, questi risultati confermano la robustezza dell'analisi delle curve dose-risposta derivanti dal saggio MTT, dimostrando che i valori di IC ottenuti riflettono accuratamente la risposta biologica osservata e possono pertanto essere considerati affidabili per le successive valutazioni sperimentali.



**Figura 13:** Valutazione della vitalità cellulare mediante saggio di esclusione del Trypan Blue nelle linee cellulari tumorali U251 (Pannelli A, B e C) e 4T1 (Pannelli E, F e G) e nelle linee cellulari non tumorali WI38 (Pannelli H, I e J) e HaCaT (Pannelli K, L e M) dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con le concentrazioni selezionate tramite MTT dell'estratto 3A e della sua frazione 3B. Le condizioni sperimentali sono: non trattato (arancione), trattato con l'estratto 3A (blu) e trattato con la frazione 3B (verde). L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA a una via seguita dal test post-hoc di Bonferroni.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*.

## **4.2 Analisi dell'effetto di 3A e 3B sulla capacità clonogenica delle cellule U251 e 4T1**

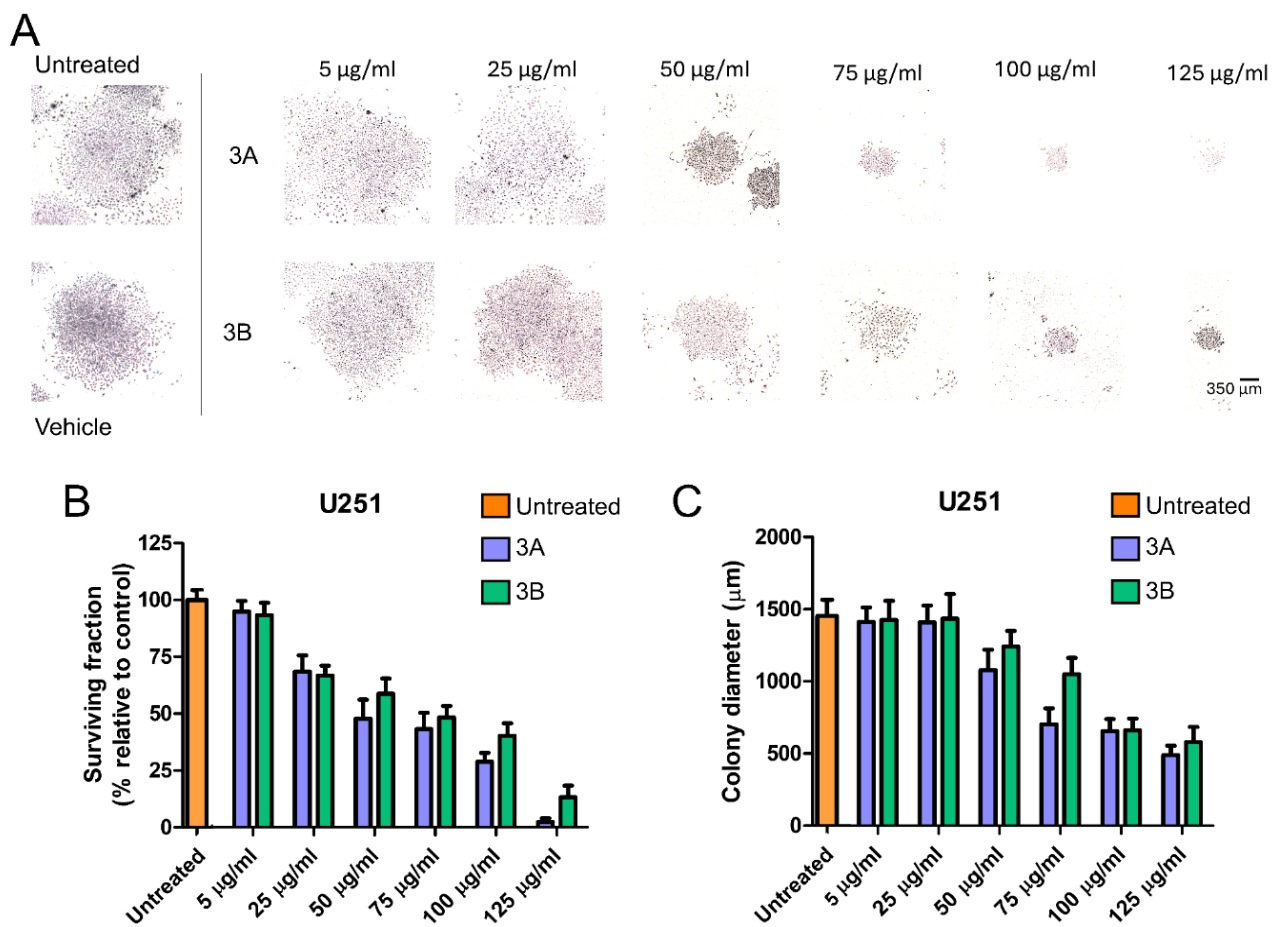
Per valutare gli effetti a lungo termine dell'estratto 3A e della frazione 3B sulla capacità proliferativa delle linee cellulari U251 e 4T1, è stato eseguito il saggio clonogenico dopo 72 ore di esposizione a concentrazioni crescenti dei due campioni (da 0 a 125 µg/ml).

Come evidenziato nelle Figure 14A e 15A, il trattamento con l'estratto 3A e con la frazione 3B determina una progressiva perdita della capacità clonogenica nelle linee U251 e 4T1. Le immagini rappresentative mostrano che, all'aumentare della concentrazione dei campioni, le colonie diventano progressivamente meno numerose e presentano dimensioni inferiori rispetto al controllo non trattato. Tale effetto risulta particolarmente marcato alle concentrazioni più elevate, nelle quali la formazione di colonie è fortemente compromessa.

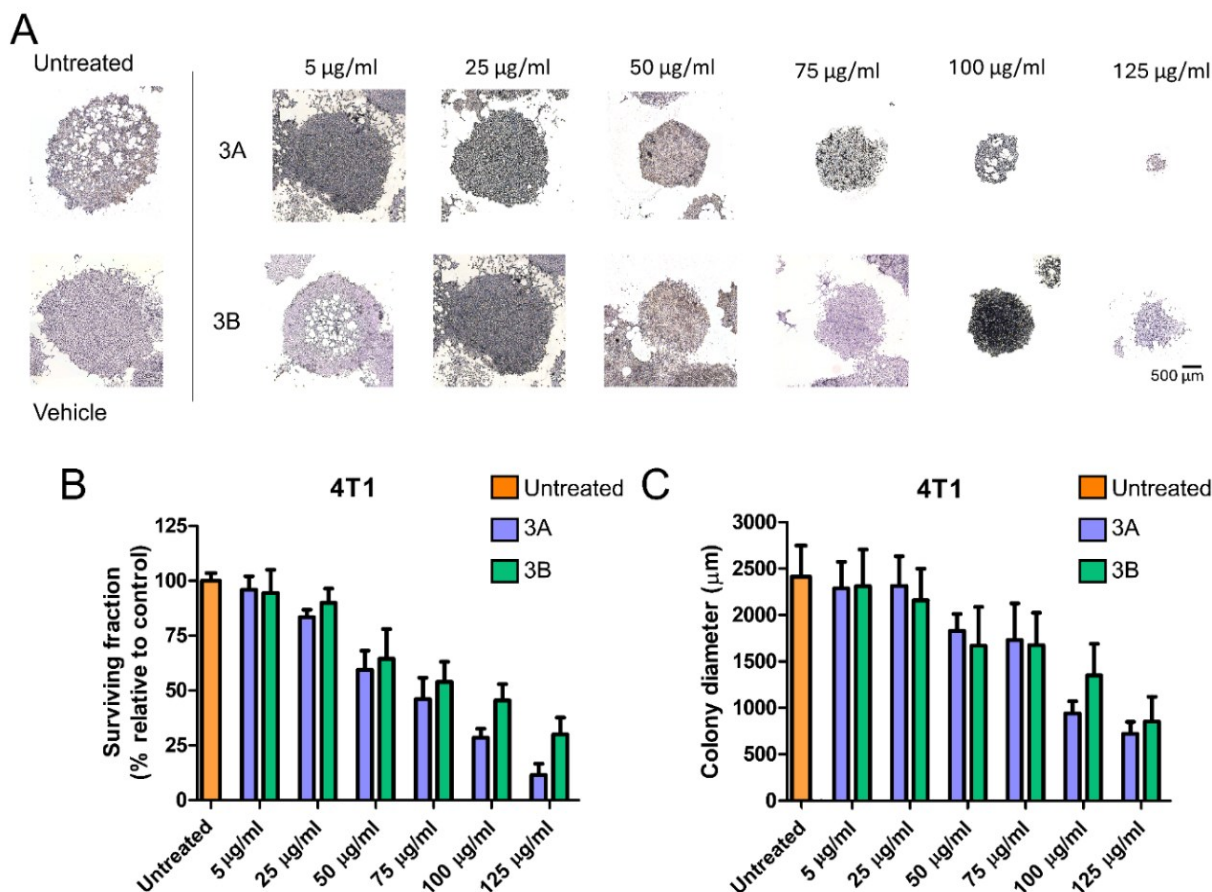
Queste osservazioni trovano conferma nell'analisi della frazione di sopravvivenza riportata nei Pannelli B delle Figure 14 e 15 e nelle Tabelle 3 e 4. In entrambe le linee cellulari, infatti, la percentuale di cellule in grado di originare colonie diminuisce progressivamente con l'aumentare della concentrazione di 3A e 3B, indicando una riduzione della sopravvivenza clonogenica. Le cellule U251 mostrano una maggiore sensibilità al trattamento, con una diminuzione significativa già alla concentrazione di 25 µg/ml (Tabella 3), mentre nelle cellule 4T1 lo stesso effetto diventa statisticamente significativo a partire da 75 µg/ml, suggerendo una minore suscettibilità di questa linea cellulare (Tabella 4).

Oltre alla riduzione del numero di colonie, il trattamento influisce anche sulla loro capacità di accrescimento. Come mostrato nei Pannelli C delle Figure 14 e 15 e dalle Tabelle 5 e 6, il diametro medio delle colonie diminuisce in maniera progressiva all'aumentare della concentrazione degli estratti. Nelle cellule U251 la riduzione raggiunge la significatività statistica a partire da 75 µg/ml per l'estratto 3A e da 100 µg/ml per la frazione 3B (Tabella 5), mentre nella linea 4T1 tale effetto si osserva rispettivamente a 100 µg/ml e 125 µg/ml (Tabella 6).

Nel complesso, la riduzione del numero e delle dimensioni delle colonie suggerisce che l'estratto 3A e la frazione 3B non si limitano ad esercitare un effetto citotossico sulle cellule tumorali, ma sono in grado di compromettere anche la capacità proliferativa delle cellule sopravvissute al trattamento.



**Figura 14:** Effetti dell'estratto 3A e della frazione 3B sulla capacità clonogenica delle cellule U251. **A:** Immagini rappresentative delle colonie formate dalle cellule U251 nelle diverse condizioni sperimentali (barra di scala: 350 µm). **B:** Istogramma della frazione di sopravvivenza nelle cellule U251 trattate con concentrazioni crescenti dell'estratto 3A (blu) e della frazione 3B (verde) rispetto alla condizione non trattata (arancione). La rispettiva statistica è riportata nella Tabella 3. **C:** Istogramma del diametro medio delle colonie nelle cellule U251 nelle diverse condizioni sperimentali. La rispettiva statistica è riportata nella Tabella 5. L'estratto 3A e la frazione 3B riducono il potenziale clonogenico delle cellule U251.



**Figura 15:** Effetti dell'estratto 3A e della frazione 3B sulla capacità clonogenica delle cellule 4T1. **A:** Immagini rappresentative delle colonie formate dalle cellule 4T1 nelle diverse condizioni sperimentali (barra di scala: 350 µm). **B:** Istogramma della frazione di sopravvivenza nelle cellule 4T1 trattate con concentrazioni crescenti dell'estratto 3A (blu) e della frazione 3B (verde) rispetto alla condizione non trattata (arancione). La rispettiva statistica è riportata nella Tabella 4. **C:** Istogramma del diametro medio delle colonie nelle cellule 4T1 nelle diverse condizioni sperimentali. La rispettiva statistica è riportata nella Tabella 6. L'estratto 3A e la frazione 3B riducono il potenziale clonogenico delle cellule 4T1.

| U251 - Surviving fraction |           |         |          |          |          |           |           |         |          |          |          |           |           |
|---------------------------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
|                           |           | 3A      |          |          |          |           |           | 3B      |          |          |          |           |           |
|                           |           | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml |
|                           | Untreated | NS      | *        | ***      | ***      | ***       | ***       | NS      | *        | ***      | ***      | ***       | ***       |
| 3A                        | 5 µg/ml   | -       | NS       | ***      | ***      | ***       | ***       | NS      | NS       | **       | ***      | ***       | ***       |
|                           | 25 µg/ml  | -       | -        | NS       | NS       | ***       | ***       | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | ***       |
|                           | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | NS       | NS        | ***       | ***     | NS       | NS       | NS       | NS        | **        |
|                           | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | NS        | ***       | ***     | NS       | NS       | NS       | NS        | *         |
|                           | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | NS        | ***     | **       | *        | NS       | NS        | NS        |
|                           | 125 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | ***     | ***      | ***      | ***      | **        | NS        |
| 3B                        | 5 µg/ml   | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | NS       | **       | ***      | ***       | ***       |
|                           | 25 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | NS       | NS       | NS        | ***       |
|                           | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | NS       | NS        | ***       |
|                           | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | NS        | **        |
|                           | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | -         | NS        |

**Tabella 3:** Significatività statistica della frazione di sopravvivenza ottenuta dal saggio clonogenico nelle cellule U251 (Pannello B della Figura 14). L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a una via, seguita dal test post-hoc di Bonferroni, confrontando tutte le condizioni sperimentali.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*. NS: differenza non significativa.

| 4T1 - Surviving fraction |           |         |          |          |          |           |           |         |          |          |          |           |           |
|--------------------------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
|                          |           | 3A      |          |          |          |           |           | 3B      |          |          |          |           |           |
|                          |           | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml |
|                          | Untreated | NS      | NS       | NS       | **       | ***       | ***       | NS      | NS       | NS       | *        | **        | ***       |
| 3A                       | 5 µg/ml   | -       | NS       | NS       | **       | ***       | ***       | NS      | NS       | NS       | *        | **        | ***       |
|                          | 25 µg/ml  | -       | -        | NS       | NS       | **        | ***       | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | **        |
|                          | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | NS       | NS        | **        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                          | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | NS        | NS        | **      | *        | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                          | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | NS        | ***     | ***      | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                          | 125 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | ***     | ***      | **       | *        | NS        | NS        |
| 3B                       | 5 µg/ml   | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | NS       | NS       | NS       | **        | ***       |
|                          | 25 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | NS       | NS       | *         | ***       |
|                          | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | NS       | NS        | NS        |
|                          | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | NS        | NS        |
|                          | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | -         | NS        |

**Tabella 4:** Significatività statistica della frazione di sopravvivenza ottenuta dal saggio clonogenico nelle cellule 4T1 (Pannello B della Figura 15). L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a una via, seguita dal test post-hoc di Bonferroni, confrontando tutte le condizioni sperimentali.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*. NS: differenza non significativa.

| U251 – Colony Diameter |           |         |          |          |          |           |           |         |          |          |          |           |           |
|------------------------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
|                        |           | 3A      |          |          |          |           |           | 3B      |          |          |          |           |           |
|                        |           | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml |
|                        | Untreated | NS      | NS       | NS       | **       | ***       | **        | NS      | NS       | NS       | NS       | **        | **        |
| 3A                     | 5 µg/ml   | -       | NS       | NS       | **       | **        | ***       | NS      | NS       | NS       | NS       | **        | **        |
|                        | 25 µg/ml  | -       | -        | NS       | **       | **        | ***       | NS      | NS       | NS       | NS       | **        | **        |
|                        | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | NS       | NS        | NS        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                        | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | NS        | NS        | **      | **       | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                        | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | NS        | **      | ***      | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                        | 125 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | ***     | ***      | *        | NS       | NS        | NS        |
| 3B                     | 5 µg/ml   | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | NS       | NS       | NS       | **        | **        |
|                        | 25 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | NS       | NS       | **        | **        |
|                        | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | NS       | NS        | NS        |
|                        | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | NS        | NS        |
|                        | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | -         | NS        |

**Tabella 5:** Significatività statistica del diametro medio delle colonie ottenuto dal saggio clonogenico nelle cellule U251 (Pannello C della Figura 14). L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a una via, seguita dal test post-hoc di Bonferroni, confrontando tutte le condizioni sperimentali.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*. NS: differenza non significativa.

| 4T1 – Colony Diameter |           |         |          |          |          |           |           |         |          |          |          |           |           |
|-----------------------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
|                       |           | 3A      |          |          |          |           |           | 3B      |          |          |          |           |           |
|                       |           | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml | 5 µg/ml | 25 µg/ml | 50 µg/ml | 75 µg/ml | 100 µg/ml | 125 µg/ml |
|                       | Untreated | NS      | NS       | NS       | NS       | *         | **        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | *         |
| 3A                    | 5 µg/ml   | -       | NS       | NS       | NS       | *         | **        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | *         |
|                       | 25 µg/ml  | -       | -        | NS       | NS       | NS        | NS        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                       | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | NS       | NS        | NS        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                       | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | NS        | NS        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                       | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | NS        | NS      | NS       | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                       | 125 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | *       | NS       | NS       | NS       | NS        | NS        |
| 3B                    | 5 µg/ml   | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | NS       | NS       | NS       | NS        | *         |
|                       | 25 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | NS       | NS       | NS        | NS        |
|                       | 50 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | NS       | NS        | NS        |
|                       | 75 µg/ml  | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | NS        | NS        |
|                       | 100 µg/ml | -       | -        | -        | -        | -         | -         | -       | -        | -        | -        | -         | NS        |

**Tabella 6:** Significatività statistica del diametro medio delle colonie ottenuto dal saggio clonogenico nelle cellule 4T1 (Pannello C della Figura 15). L'analisi statistica è stata eseguita mediante ANOVA a una via, seguita dal test post-hoc di Bonferroni, confrontando tutte le condizioni sperimentali.  $p < 0,05$  \*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*. NS: differenza non significativa.

### **4.3 Attivazione della via apoptotica nelle cellule tumorali trattate con i campioni 3A e 3B**

Per approfondire i meccanismi cellulari alla base dell'attività antitumorale osservata, è stata valutata l'attivazione della via apoptotica nelle linee cellulari U251 e 4T1. A tal fine, le cellule sono state trattate per 72 ore con i campioni 3A e 3B alle rispettive concentrazioni IC<sub>25</sub>, analizzando l'espressione delle proteine Bax e Bcl-2 e successivamente l'espressione della caspasi-3 clivata.

#### **4.3.1 Modulazione del rapporto Bax/Bcl-2**

L'attivazione della via apoptotica è stata inizialmente valutata mediante doppia immunofluorescenza per Bax, proteina ad attività pro-apoptotica, e Bcl-2, proteina anti-apoptotica. Le immagini di immunofluorescenza in Figura 16 (pannello A per le cellule U251 e pannello C per le cellule 4T1) evidenziano chiaramente come il trattamento sia con l'estratto 3A che con la frazione 3B induca un incremento dell'espressione di Bax (segnale rosso) e, contemporaneamente, una riduzione dell'espressione di Bcl-2 (segnale verde), rispetto alle cellule di controllo non trattate.

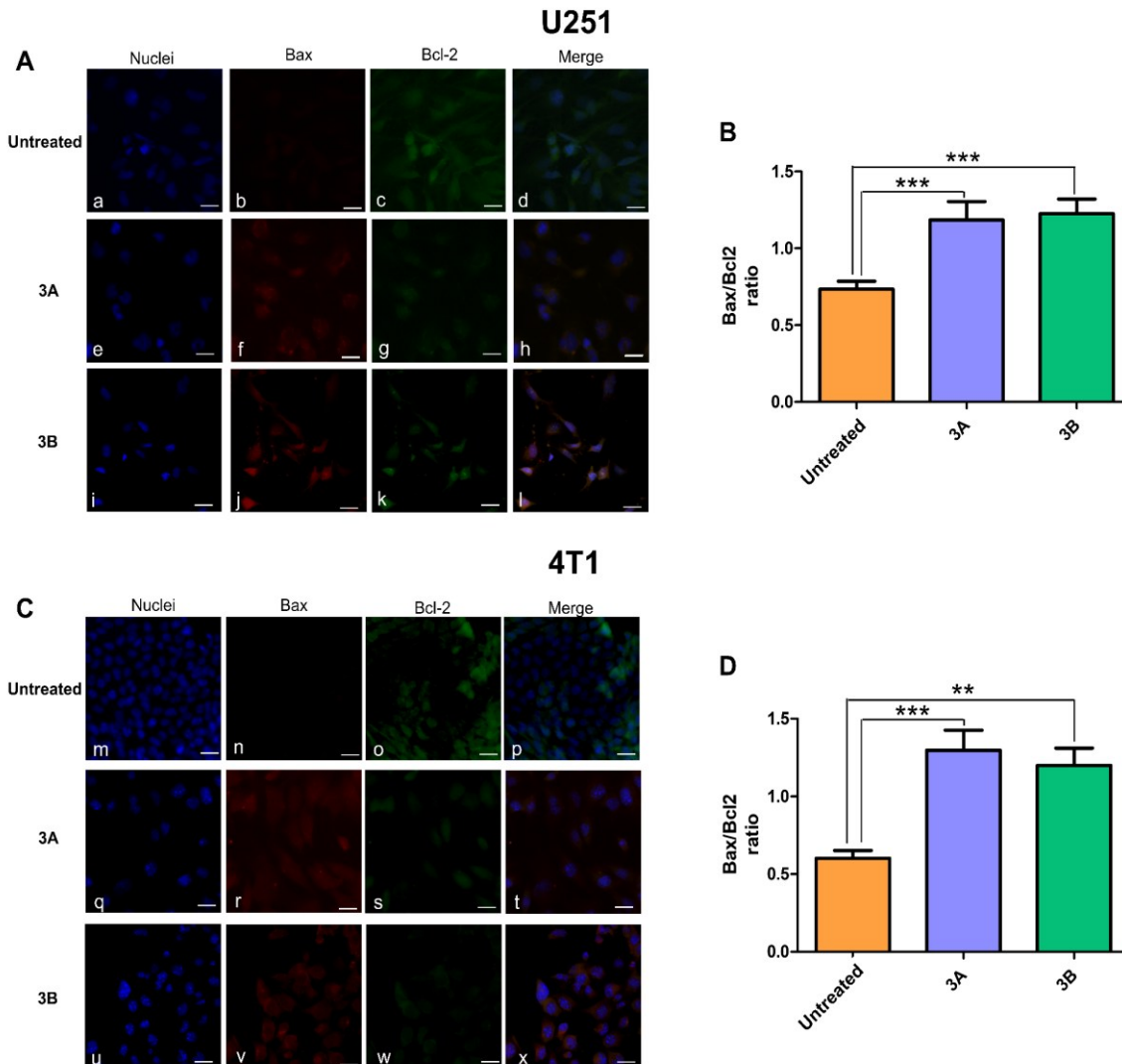
La quantificazione dell'intensità di fluorescenza ha confermato tali osservazioni. Nelle cellule U251, l'espressione di Bax aumenta in modo significativo da  $43,47 \pm 3,79$  (valore di densità ottica nelle cellule di controllo) a  $54,28 \pm 2,90$  e  $52,40 \pm 2,25$  dopo trattamento rispettivamente con l'estratto 3A e la frazione 3B. Parallelamente, l'espressione di Bcl-2 diminuisce da  $59,15 \pm 5,16$  (nelle cellule di controllo) a  $46,01 \pm 3,00$  (3A) e  $42,61 \pm 2,21$  (3B).

Analogamente, nelle cellule 4T1 il trattamento determina un incremento statisticamente significativo di Bax da  $66,11 \pm 7,70$  (nelle cellule di controllo) a  $81,20 \pm 4,48$  (dopo trattamento con l'estratto 3A) e  $77,03 \pm 4,81$  (dopo trattamento con la frazione 3B), mentre Bcl-2 si riduce da  $108,13 \pm 9,50$  (cellule di controllo) a  $62,53 \pm 4,11$  (3A) e  $64,23 \pm 4,22$  (3B).

La conseguente variazione del rapporto Bax/Bcl2 risulta statisticamente significativa in entrambe le linee cellulari (pannello B e D della Figura 16). Nelle cellule U251 il rapporto passa da  $0,73 \pm 0,09$  (nelle cellule di controllo) a  $1,18 \pm 0,12$  (dopo trattamento con l'estratto 3A) e  $1,23 \pm 0,09$  (dopo trattamento con la frazione 3B), mentre nelle cellule 4T1 aumenta da  $0,60 \pm 0,09$  (cellule non trattate) a  $1,30 \pm 0,13$  (3A) e  $1,20 \pm 0,11$  (3B).

Il fatto che nelle cellule non trattate il rapporto Bax/Bcl2 sia risultato inferiore al valore di 1 riflette una condizione basale di resistenza all'apoptosi. Il superamento di tale soglia critica a seguito del

trattamento con l'estratto 3A e della frazione 3B rappresenta un chiaro indicatore dell'attivazione della via apoptotica (Putri & Z, 2025). Inoltre, i due trattamenti hanno mostrato un'efficacia analoga nell'attivazione della via apoptotica, senza differenze statisticamente significative.



**Figura 16:** Espressione di Bax (proteina pro-apoptotica) e Bcl-2 (proteina anti-apoptotica) nelle linee cellulari tumorali U251 e 4T1 in seguito al trattamento con l'estratto 3A e la frazione 3B. **A, C:** mostrano immagini rappresentative della doppia immunofluorescenza per Bax (segnale rosso) e Bcl-2 (segnale verde) nelle cellule U251 (A) e 4T1(C) nelle diverse condizioni di trattamento. Barra di scala: 20  $\mu$ m. **B, D:** mostrano gli istogrammi del rapporto Bax/ Bcl-2, calcolato a partire dai valori di densità ottica dell'intensità di fluorescenza nelle cellule U251 (B) e 4T1 (D). L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA a una via seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni.  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*.

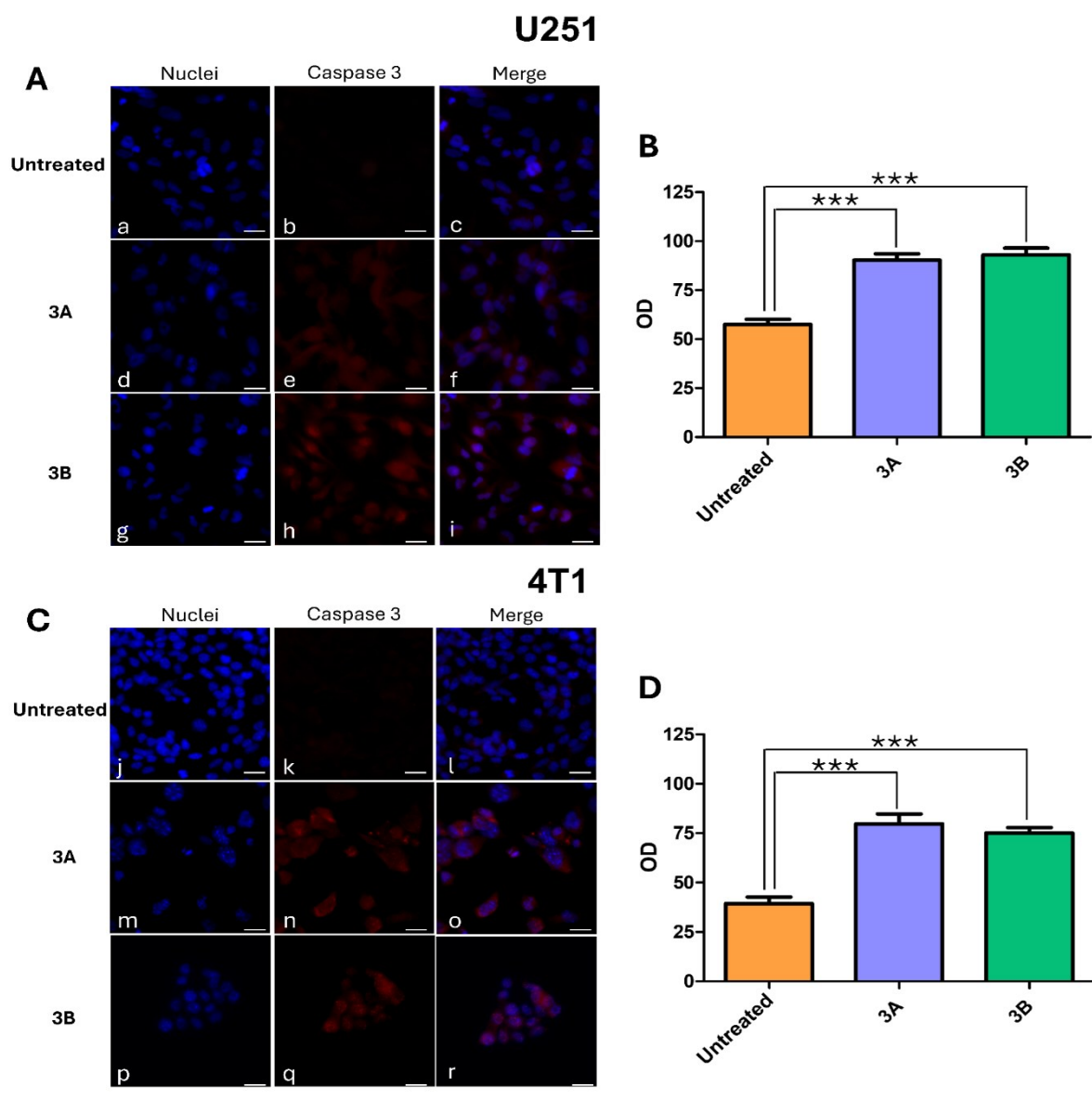
### 4.3.2 Attivazione della Caspasi-3 clivata

Per confermare l'attivazione del processo apoptotico indotto dai trattamenti, è stata valutata l'espressione della caspasi-3 clivata, principale effettore della fase esecutiva della cascata apoptotica. Come mostrato nelle immagini di immunofluorescenza riportate nei pannelli A e C della Figura 17, le cellule trattate con l'estratto 3A e la frazione 3B presentano un marcato aumento dell'espressione della Caspasi-3 clivata (segnale rosso) rispetto ai controlli, nei quali la fluorescenza risulta quasi assente.

Tali osservazioni sono confermate dalla quantificazione dell'intensità di fluorescenza. Nelle cellule U251, pannello B della Figura 17, il valore di densità ottica aumenta da  $57,57 \pm 2,55$  nelle cellule non trattate a  $90,36 \pm 3,25$  dopo trattamento con 3A e a  $93,05 \pm 3,51$  dopo trattamento con la frazione 3B. Nelle cellule 4T1, pannello D della Figura 17, il valore di densità ottica passa invece da  $39,30 \pm 3,38$  nelle cellule non trattate a  $79,73 \pm 5,04$  e  $75,06 \pm 2,83$  rispettivamente dopo trattamento con 3A e 3B. In entrambi i modelli cellulari l'aumento del valore di densità ottica risulta statisticamente significativo sia dopo trattamento con l'estratto 3A che con la frazione 3B ( $p < 0.001$ ).

Nel complesso, questi risultati dimostrano che sia l'estratto 3A sia la frazione 3B sono in grado di indurre apoptosi, come confermato dall'aumento dell'espressione della caspasi-3 clivata, principale effettore terminale della via apoptotica regolata dalle proteine Bax e Bcl-2. L'effetto sovrapponibile osservato per i due campioni suggerisce che l'attivazione del processo apoptotico non sia attribuibile prevalentemente alla presenza di (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina.

In particolare, in entrambe le linee cellulari non sono emerse differenze statisticamente significative tra gli effetti indotti da 3A e 3B. Tuttavia, è opportuno evidenziare che, mentre nelle cellule U251 i valori di  $IC_{25}$  dei due trattamenti risultano comparabili, nella linea 4T1 il valore di  $IC_{25}$  della frazione 3B è circa il doppio rispetto a quello dell'estratto 3A (Tabella 2), indicando una minore efficacia della frazione nel ridurre la vitalità cellulare.



**Figura 17:** Espressione della Caspasi-3 clivata nelle cellule U251 e 4T1 dopo trattamento con l'estratto 3A e la frazione 3B. **A, C:** mostrano immagini rappresentative di immunofluorescenza della caspasi-3 clivata (segnale rosso) nelle cellule U251 (**A**) e 4T1 (**C**) nelle diverse condizioni sperimentali. Barra di scala: 20  $\mu$ m. **B, D:** Istogrammi rappresentativi della quantificazione dell'intensità di fluorescenza della caspasi-3 clivata nelle cellule U251 (**B**) e 4T1 (**D**). L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA a una via seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni.  $p < 0.001$  \*\*\*.

#### 4.4 Valutazione dell'attività antiossidante dell'estratto 3A e della frazione 3B

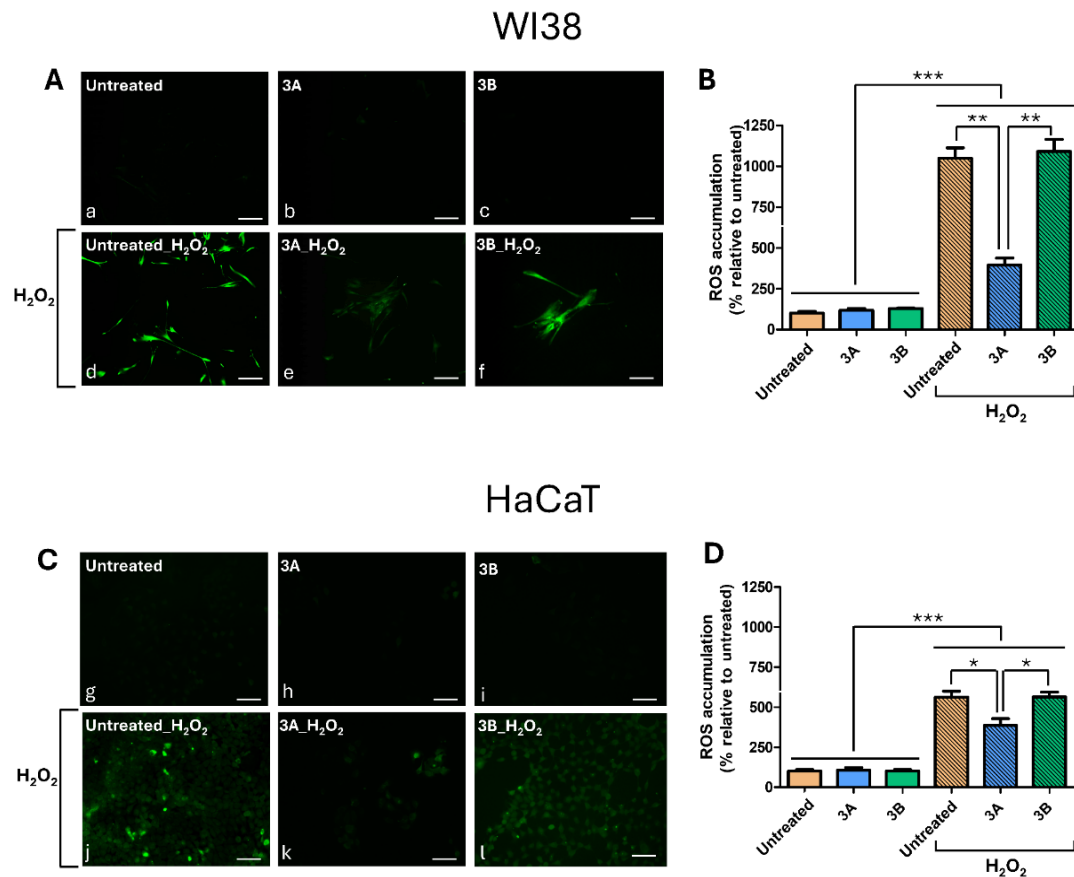
Per valutare la capacità antiossidante dell'estratto 3A e della frazione 3B, è stato analizzato l'accumulo intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mediante saggio DCFH-DA nelle linee cellulari non tumorali WI38 e HaCaT. L'analisi è stata condotta sia in condizioni basali sia dopo induzione di stress ossidativo mediante trattamento con  $H_2O_2$ .

Nelle cellule WI38, le immagini rappresentative riportate nel Pannello A della Figura 18 mostrano che, in condizioni basali, il segnale di fluorescenza verde risulta debole in tutte le condizioni sperimentali, indicando una produzione pressoché trascurabile di ROS. La quantificazione dell'intensità di fluorescenza (Pannello B, Figura 18) evidenzia che il trattamento per 72 ore con l'estratto 3A o con la frazione 3B, alle rispettive concentrazioni di  $IC_{25}$ , non modifica significativamente i livelli intracellulari di ROS rispetto al controllo non trattato. Questo risultato indica che, in assenza di uno stimolo ossidativo, nessuno dei due campioni altera l'omeostasi redox delle cellule sane.

L'esposizione a  $H_2O_2$  determina invece un significativo aumento della fluorescenza (Pannello A e B della Figura 18), che evidenzia un incremento della produzione di ROS di circa dieci volte rispetto alla condizione basale, raggiungendo un valore pari a  $1080,61 \pm 56,71$  % ( $p < 0,001$ ). Il pretrattamento con l'estratto 3A riduce significativamente l'accumulo di ROS indotto dal perossido di idrogeno ( $394,88 \pm 43,35$  %), corrispondente a una diminuzione dello stress ossidativo di circa il 60-70%. Al contrario, la frazione 3B non esercita alcun effetto protettivo: i livelli di ROS rimangono sovrapponibili a quelli osservati nelle cellule trattate con solo  $H_2O_2$  e risultano significativamente superiori rispetto a quelli ottenuti con l'estratto 3A.

Un andamento analogo è stato osservato nelle cellule HaCaT. Come mostrato nelle immagini rappresentative riportate nel Pannello C della Figura 19, anche in questo modello cellulare la fluorescenza risulta minima nelle condizioni basali, indipendentemente dal trattamento effettuato, mentre aumenta sensibilmente dopo l'esposizione a  $H_2O_2$ . L'analisi quantitativa (Pannello D della Figura 19) conferma che il trattamento con il perossido di idrogeno induce un incremento di circa sei volte della produzione di ROS rispetto alla condizione basale, raggiungendo un valore di  $562,35 \pm 37,31$  % ( $p < 0.001$ ). Anche in questo caso, il pretrattamento con l'estratto 3A attenua significativamente l'accumulo di ROS, riducendolo a  $385,90 \pm 41,67$  %, con una diminuzione dello stress ossidativo di circa il 30%. Diversamente, la frazione 3B non determina una riduzione significativa dei livelli di ROS rispetto alle cellule trattate con il solo  $H_2O_2$ , risultando inoltre significativamente meno efficace rispetto all'estratto 3A.

Nel complesso i risultati ottenuti dimostrano che l'estratto 3A è in grado di proteggere le cellule non tumorali dall'accumulo di ROS indotto dallo stress ossidativo. La perdita di questo effetto nella frazione 3B, ottenuta dopo rimozione di (E)-resveratrolo e (E)-ε-viniferina, suggerisce che tali stilbeni rappresentano i principali responsabili dell'attività antiossidante dell'estratto 3A.



**Figura 18:** Valutazione dell'attività antiossidante dell'estratto 3A e della frazione 3B nelle linee cellulari non tumorali WI38 e HaCaT mediante saggio DCFH-DA. **A, C:** immagini rappresentative dell'accumulo intracellulare di ROS nelle cellule WI38 (**A**) e HaCaT (**C**) in condizioni basali (Pannelli superiori) e dopo induzione di stress ossidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM (Pannelli inferiori). Barra di scala: 100 μM. **B, D:** quantificazione dell'accumulo intracellulare di ROS, espressa come percentuale rispetto al controllo non trattato, nelle cellule WI38 (**B**) e HaCaT (**D**). L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA a una via seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni.  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*;  $p < 0.001$  \*\*\*.

## 5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni la ricerca sui prodotti naturali ha assunto un ruolo sempre più rilevante nell'identificazione di nuovi agenti antitumorali, e in questo contesto gli estratti di *Vitis vinifera* hanno suscitato crescente interesse per la ricchezza di metaboliti secondari ad attività antiossidante, antinfiammatoria e antitumorale. Gli studi disponibili si sono concentrati soprattutto su semi, bucce e foglie, attribuendo gli effetti biologici principalmente ai composti polifenolici, come ad esempio flavanoli, proantocianidine, resveratrolo e viniferine (Nassiri-Asl et al., 2016). Tuttavia, un estratto vegetale costituisce in realtà un fitocomplesso, i cui componenti possono contribuire all'attività complessiva anche attraverso interazioni additive o sinergiche, oltre l'effetto dei singoli costituenti.

Il legno di potatura, tradizionalmente considerato uno scarto della gestione del vigneto, è emerso più di recente come fonte promettente di molecole bioattive ad attività antitumorale (Reguouat et al., 2025). Le conoscenze in merito restano tuttavia limitate: gli studi pubblicati riguardano un numero ristretto di modelli tumorali e attribuiscono l'attività osservata quasi esclusivamente a (E)-resveratrolo ed (E)- $\epsilon$ -viniferina, lasciando ancora poco esplorato il contributo degli altri metaboliti e le eventuali sinergie all'interno del fitocomplesso (Quero et al., 2021; Bràs et al., 2025).

Partendo da queste premesse, il presente lavoro di tesi si è posto l'obiettivo di approfondire il potenziale antitumorale di estratti di legno di potatura di *Vitis vinifera*, valutando il contributo di (E)-resveratrolo ed (E)- $\epsilon$ -viniferina all'attività biologica dell'estratto e i principali meccanismi molecolari alla base dell'effetto antitumorale. A tale scopo sono state impiegate le linee cellulari U251 e 4T1, modelli consolidati rispettivamente di glioblastoma (GBM) e carcinoma mammario triplo negativo (TNBC), neoplasie accomunate da elevata aggressività, rapida proliferazione, marcata invasività e scarsa risposta alle terapie convenzionali (Gupta et al., 2020; Yalamarty et al., 2023b). Parallelamente, per valutare la selettività dei trattamenti e disporre di un opportuno controllo, sono state utilizzate le linee cellulari non tumorali HaCaT e WI38.

In seguito all'estrazione sequenziale del legno di potatura con solventi a polarità crescente e alla successiva rimozione dei composti interferenti (procedure svolte dal MedChemLab del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Pavia), l'estratto 3A è risultato il campione a maggiore attività citotossica sulla linea U251. La sua caratterizzazione fitochimica (anch'essa svolta dal MedChemLab del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Pavia) ha permesso di quantificarne il contenuto in (E)-resveratrolo ed (E)- $\epsilon$ -viniferina e di definirne il profilo metabolico complessivo. Sebbene questi due stilbeni siano ampiamente riconosciuti per le loro proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e chemiopreventive, l'estratto non può essere considerato una

semplice somma dei suoi principali costituenti, ma un fitocomplesso in cui numerosi metaboliti secondari possono contribuire all'attività biologica attraverso interazioni additive, sinergiche o, in alcuni casi, antagoniste (Beaumont et al., 2022; Fuloria et al., 2022; Zhou et al., 2016; Ratz-Lyko & Arct, 2019).

L'effetto complessivo osservato potrebbe quindi non dipendere esclusivamente dai due stilbeni principali, ma anche dal contributo degli altri composti presenti e dalle loro reciproche interazioni.

Per chiarire il ruolo dei principali stilbeni nell'attività biologica dell'estratto 3A, l'(E)-resveratrolo e la (E)- $\epsilon$ -viniferina sono stati isolati in forma purificata, mentre la restante componente dell'estratto è stata raccolta nella frazione 3B, caratterizzata da un profilo metabolico sostanzialmente analogo a quello dell'estratto di partenza, ma priva dei due composti. Tale approccio ha permesso di discriminare il contributo dei due stilbeni maggioritari da quello dell'insieme degli altri metaboliti presenti nel fitocomplesso.

A questo scopo, nelle cellule U251 è stata confrontata l'attività citotossica dell'(E)-resveratrolo e della (E)- $\epsilon$ -viniferina, somministrati singolarmente o in associazione alle stesse concentrazioni presenti nell'estratto 3A alla rispettiva IC<sub>50</sub> (circa 16–26  $\mu$ M per l'(E)-resveratrolo e 14–22  $\mu$ M per la (E)- $\epsilon$ -viniferina). I risultati hanno mostrato che soltanto l'(E)-resveratrolo ha determinato una riduzione, seppur modesta, della vitalità cellulare, senza raggiungere un'inibizione del 50%. Analogamente, il trattamento combinato dei due stilbeni non ha riprodotto l'effetto citotossico osservato con l'estratto 3A. Queste evidenze indicano che l'attività dell'estratto non può essere ricondotta esclusivamente ai due principali stilbeni, ma è verosimilmente il risultato dell'azione combinata di ulteriori metaboliti presenti nel fitocomplesso. Tale interpretazione è supportata anche dai dati riportati in letteratura, secondo cui l'(E)-resveratrolo esercita un effetto citotossico sulle cellule U251 in maniera dose-dipendente, con valori di IC<sub>50</sub> generalmente compresi tra circa 50 e 300  $\mu$ M (Farman et al., 2026; Jia et al., 2021; Jiang et al., 2005, 2009, 2010; H. Li et al., 2013; J. Li et al., 2009; Nie et al., 2019; Sun et al., 2012; XIONG et al., 2016), concentrazioni significativamente maggiori rispetto a quelle presenti nell'estratto 3A alle dosi utilizzate in questo studio.

I risultati ottenuti, in accordo con quanto riportato in letteratura, indicano come la concentrazione di (E)-resveratrolo presente nell'estratto 3A in corrispondenza del valore di IC<sub>50</sub> risulti inferiore a quella generalmente richiesta per esercitare un effetto citotossico marcato sulle cellule U251. Tale dato sembra avvalorare l'ipotesi secondo cui l'attività biologica osservata sia riconducibile anche ad altri metaboliti presenti nell'estratto o ad un'interazione sinergica tra i diversi componenti dell'estratto, piuttosto che all'azione isolata del solo (E)-resveratrolo. Per quanto riguarda la (E)- $\epsilon$ -viniferina,

sebbene siano state descritte proprietà antiproliferative in diversi modelli tumorali (Xue et al., 2014), le informazioni relative al suo impiego nel GBM risultano ancora molto limitate.

Nel complesso, tali osservazioni indicano che l'attività antitumorale di 3A non è riconducibile ai soli due stilbeni principali, ma deriva verosimilmente o da altri metaboliti o dall'azione combinata dell'intero fitocomplesso. Per verificare questa ipotesi, l'attività biologica di 3A è stata confrontata con quella della sua frazione 3B, priva di (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina, sulle linee tumorali U251 e 4T1 e sulle linee non tumorali WI38 e HaCaT. Entrambi i campioni hanno mostrato una citotossicità significativa sulle cellule tumorali, evidente soprattutto dopo 72 ore, a conferma che l'assenza dei due stilbeni non compromette l'attività biologica dell'estratto.

Un dato interessante riguarda anche la selettività d'azione dei due campioni, entrambi caratterizzati da bassa tossicità sui fibroblasti polmonari WI38 e sui cheratinociti HaCaT: un profilo di sicurezza che li rende candidati promettenti per futuri studi su GBM e TNBC, a differenza dei chemioterapici convenzionali, generalmente più aggressivi verso le cellule sane (Chaveli-López, 2014).

È importante notare, tuttavia, che i saggi di citotossicità da soli non sono sufficienti a predire l'efficacia antitumorale di un trattamento nel lungo periodo. Per questo motivo è stato valutato l'effetto di 3A e 3B anche sulla capacità clonogenica delle cellule tumorali, parametro strettamente associato all'aggressività neoplastica e al rischio di recidiva (Fiebig et al., 2004). Il saggio ha mostrato che entrambi i campioni riducono in maniera dose-dipendente non solo la frazione di sopravvivenza, ma anche le dimensioni delle colonie formate dalle cellule U251 e 4T1, indicando una compromissione sia della capacità replicativa sia del potenziale proliferativo a lungo termine delle cellule tumorali. La riduzione del diametro delle colonie, in particolare, suggerisce che le cellule sopravvissute mantengano un potenziale proliferativo ridotto, piuttosto che subire un semplice rallentamento transitorio della crescita, un aspetto rilevante, dato che la sopravvivenza clonogenica è comunemente considerata un indicatore funzionale delle proprietà staminali e della capacità di inizio tumorale. L'inibizione della formazione di colonie osservata per entrambi i campioni indica dunque un'attività antiproliferativa che va oltre la citotossicità acuta, e conferma come anche la frazione 3B, priva di (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina, contenga composti in grado di esercitare un effetto inibitorio duraturo sulla crescita delle cellule tumorali.

Nel complesso, i profili di citotossicità e di inibizione clonogenica osservati dopo 72 ore indicano che gli estratti di legno di potatura di *Vitis vinifera* potrebbero agire attraverso meccanismi molteplici, tra cui l'induzione dell'apoptosi e la soppressione a lungo termine del potenziale clonogenico.

Per approfondire i meccanismi alla base di questo effetto, è stata analizzata la modulazione dell'asse apoptotico intrinseco, valutando nello specifico l'espressione di Bax, Bcl-2 e caspasi-3 clivata nelle cellule tumorali trattate.

I membri della famiglia di Bcl-2 regolano l'apoptosi attraverso l'equilibrio tra fattori pro-apoptotici (BAX) e anti-apoptotici (Bcl-2), un bilancio che riflette il rapporto tra segnali di morte cellulare e segnali di sopravvivenza: è per questo che il rapporto Bax/Bcl-2, più che l'espressione delle singole proteine, viene considerato un indicatore affidabile dell'impegno apoptotico (Gao & Wang, 2009; Pawlowski & Kraft, 2000; Qian et al., 2022; Salakou et al., 2007). Nelle cellule trattate con 3A e 3B, l'aumento di Bax e la riduzione di Bcl-2 hanno portato tale rapporto sopra il valore di 1 (contro un valore inferiore a 1 nei controlli), indicando la conseguente attivazione delle caspasi a valle (Du et al., 2014; Raisova et al., 2001). Coerentemente, entrambi i trattamenti hanno anche aumentato i livelli di caspasi-3 clivata, effettore terminale dell'apoptosi (McIlwain et al., 2013; Steiner & Lang, 2017; Wimmer et al., 2020). Questi dati, nel loro insieme, indicano che 3A e 3B non si limitano a rallentare la proliferazione, ma inducono la morte cellulare programmata.

Un aspetto che merita attenzione è il possibile risvolto clinico di questo dato: la resistenza dei tumori alla terapia è spesso legata proprio a uno squilibrio nell'asse Bax/Bcl-2, e il fatto che entrambi i campioni riescano a modularlo apre a scenari applicativi interessanti, sia come trattamento a sé stante, sia in associazione ad altri farmaci, per rendere le cellule tumorali sensibili all'apoptosi. Alla luce di tutti i risultati discussi, si può quindi concludere che la capacità degli estratti di legno di potatura di *Vitis vinifera* di agire sui marker dell'apoptosi rappresenta uno dei meccanismi chiave della loro attività antitumorale.

Oltre all'attività antitumorale, l'estratto 3A ha evidenziato anche una marcata attività antiossidante, riducendo significativamente i livelli intracellulari di ROS nelle cellule non tumorali. Questo risultato suggerisce un potenziale impiego dell'estratto non solo come agente antitumorale, ma anche come supporto alle terapie oncologiche, contribuendo a proteggere le cellule sane dal danno ossidativo. La frazione 3B, invece, non ha mostrato alcun effetto significativo sui livelli di ROS, indicando che (E)-resveratrolo ed (E)-ε-viniferina esercitano un'azione antiossidante specifica, indipendente dal contributo del resto del fitocomplesso all'attività citotossica.

## 6. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha permesso di approfondire il potenziale biologico degli estratti ottenuti dal legno di potatura di *Vitis vinifera*, evidenziandone le proprietà antitumorali e antiossidanti e chiarendo il contributo dei principali metaboliti presenti nel fitocomplesso.

Tra gli estratti analizzati, l'estratto 3A ha mostrato una significativa attività citotossica nei confronti delle linee cellulari tumorali U251 e 4T1, mantenendo una ridotta tossicità verso le cellule non tumorali WI38 e HaCaT. Il confronto con la sua frazione 3B, priva di (E)-resveratrolo e (E)- $\epsilon$ -viniferina, ha dimostrato che l'attività antitumorale dell'estratto non è attribuibile esclusivamente a questi due stilbeni, ma è verosimilmente il risultato dell'azione combinata degli altri metaboliti presenti nel fitocomplesso.

Oltre a ridurre la vitalità cellulare, entrambi i campioni (3A e 3B) hanno compromesso anche la capacità clonogenica delle cellule tumorali e promosso l'attivazione della via apoptotica intrinseca, come dimostrato dall'aumento del rapporto Bax/Bcl-2 e dell'espressione della caspasi-3 clivata. Questi risultati indicano che l'effetto antitumorale non si limita a una riduzione della proliferazione cellulare, ma coinvolge anche l'attivazione di specifici meccanismi di morte cellulare programmata.

Per quanto riguarda l'attività antiossidante, solo l'estratto 3A è risultato in grado di ridurre l'accumulo intracellulare di ROS indotto da stress ossidativo nelle cellule non tumorali, suggerendo che l'(E)-resveratrolo e la (E)- $\epsilon$ -viniferina siano i principali responsabili di questa proprietà, pur non rappresentando i principali mediatori dell'attività antitumorale.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano il valore degli estratti di *Vitis vinifera* come promettenti fonti di molecole bioattive per lo sviluppo di nuove strategie antitumorali. In particolare, il duplice profilo biologico dell'estratto 3A, caratterizzato da attività antitumorale e antiossidante, potrebbe rappresentare un vantaggio nell'ambito di approcci terapeutici o chemiopreventivi. Inoltre, questo studio contribuisce alla valorizzazione del legno di potatura della vite come sottoprodotto agroindustriale destinabile allo sviluppo di composti a potenziale interesse farmaceutico, in un'ottica di economia circolare. Saranno tuttavia necessari ulteriori studi per identificare il contributo dei singoli metaboliti presenti nel fitocomplesso e approfondire i meccanismi molecolari alla base dell'attività biologica osservata.

## BIBLIOGRAFIA

4T1—CRL-2539 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-2539>

Aslakson, C. J., & Miller, F. R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Research*, 52(6), 1399–1405.

Bardia, A., Hurvitz, S. A., Tolaney, S. M., Loirat, D., Punie, K., Oliveira, M., Brufsky, A., Sardesai, S. D., Kalinsky, K., Zelnak, A. B., Weaver, R., Traina, T., Dalenc, F., Aftimos, P., Lynce, F., Diab, S., Cortés, J., O'Shaughnessy, J., Diéras, V., ... ASCENT Clinical Trial Investigators. (2021). Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 384(16), 1529–1541. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028485>

Beaumont, P., Courtois, A., Atgié, C., Richard, T., & Krisa, S. (2022). In the shadow of resveratrol: Biological activities of epsilon-viniferin. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 78(2), 465–484. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00880-x>

Berretta, M., Bignucolo, A., Di Francia, R., Comello, F., Facchini, G., Ceccarelli, M., Iaffaioli, R. V., Quagliariello, V., & Maurea, N. (2020). Resveratrol in Cancer Patients: From Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2945. <https://doi.org/10.3390/ijms21082945>

Boyle, P. (2012). Triple-negative breast cancer: Epidemiological considerations and recommendations. *Annals of Oncology, Triple-negative breast cancer in focus: From biology to novel therapeutics*, 23, vi7–vi12. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds187>

Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>

Cebrián, C., Sánchez-Gómez, R., Salinas, M. R., Alonso, G. L., & Zalacain, A. (2017). Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds. *Industrial Crops and Products*, 109, 730–736. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.037>

Cellule U-251 MG. <https://www.cytion.com/it/Cellule-U-251-MG/300385>

Chang, X., Heene, E., Qiao, F., & Nick, P. (2011). The phytoalexin resveratrol regulates the initiation of hypersensitive cell death in Vitis cell. *PloS One*, 6(10), e26405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026405>

Chaveli-López, B. (2014). Oral toxicity produced by chemotherapy: A systematic review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 6(1), e81–e90. <https://doi.org/10.4317/jced.51337>

- Chen, Z., & Hambarzumyan, D. (2018). Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01004>
- Cortes, J., Rugo, H. S., Cescon, D. W., Im, S.-A., Yusof, M. M., Gallardo, C., Lipatov, O., Barrios, C. H., Perez-Garcia, J., Iwata, H., Masuda, N., Torregroza Otero, M., Gokmen, E., Loi, S., Guo, Z., Zhou, X., Karantza, V., Pan, W., & Schmid, P. (2022). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 387(3), 217–226. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2202809>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- Dercks, W., & Creasy, L. L. (1989). The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(3), 189–202. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(89\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0885-5765(89)90043-X)
- Du, L., Mei, H.-F., Yin, X., & Xing, Y.-Q. (2014). Delayed growth of glioma by a polysaccharide from *Aster tataricus* involve upregulation of Bax/Bcl-2 ratio, activation of caspase-3/8/9, and downregulation of the Akt. *Tumor Biology*, 35(3), 1819–1825. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1243-8>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Farman, A., Zheng, X., Wu, M., Hong, L., Qian, W., & Liu, J. (2026). Concurrent Ferroptosis and Apoptosis in Resveratrol-Treated Glioblastoma Cells: Relevance With NRF2 Downregulation and Oxidative Stress. *Cell Biology International*, 50(3), e70153. <https://doi.org/10.1002/cbin.70153>
- Fiebig, H. H., Maier, A., & Burger, A. M. (2004). Clonogenic assay with established human tumour xenografts: Correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *European Journal of Cancer*, 40(6), 802–820. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.01.009>
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Fuloria, S., Sekar, M., Khatulanuar, F. S., Gan, S. H., Rani, N. N. I. M., Ravi, S., Subramaniyan, V., Jeyabalan, S., Begum, M. Y., Chidambaram, K., Sathasivam, K. V., Safi, S. Z., Wu, Y. S.,

- Nordin, R., Maziz, M. N. H., Kumarasamy, V., Lum, P. T., & Fuloria, N. K. (2022a). Chemistry, Biosynthesis and Pharmacology of Viniferin: Potential Resveratrol-Derived Molecules for New Drug Discovery, Development and Therapy. *Molecules*, 27(16), 5072. <https://doi.org/10.3390/molecules27165072>
- Gao, C., & Wang, A.-Y. (2009). Significance of Increased Apoptosis and Bax Expression in Human Small Intestinal Adenocarcinoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(12), 1139–1148. <https://doi.org/10.1369/jhc.2009.954446>
- Goufo, P., Singh, R. K., & Cortez, I. (2020). A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. *Antioxidants*, 9(5), 398. <https://doi.org/10.3390/antiox9050398>
- Grape leaves and vine shoots | Feedipedia. <https://www.feedipedia.org/node/512>
- Gupta, M., Dey, S., Marbaniang, D., Pal, P., Ray, S., & Mazumder, B. (2020). Grape seed extract: Having a potential health benefits. *Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 1205–1215. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04113-w>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., Tribolet, N. de, Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J. E. C., Hau, P., Mirimanoff, R. O., Cairncross, J. G., Janzer, R. C., & Stupp, R. (2005). MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: An evolving paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, 13(10), 714–726. <https://doi.org/10.1038/nrc3599>
- Howlader, N., Altekruse, S. F., Li, C. I., Chen, V. W., Clarke, C. A., Ries, L. A. G., & Cronin, K. A. (2014). US Incidence of Breast Cancer Subtypes Defined by Joint Hormone Receptor and HER2 Status. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 106(5), dju055. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju055>
- Jara-Palacios, M. J., Hernanz, D., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Escudero-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Detailed phenolic composition of white grape by-products by RRLC/MS and measurement of the antioxidant activity. *Talanta*, 125, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.02.065>

- Jia, B., Zheng, X., Wu, M.-L., Tian, X.-T., Song, X., Liu, Y.-N., Li, P.-N., & Liu, J. (2021). Increased Reactive Oxygen Species and Distinct Oxidative Damage in Resveratrol-suppressed Glioblastoma Cells. *Journal of Cancer*, 12(1), 141–149. <https://doi.org/10.7150/jca.45489>
- Jiang, H., Shang, X., Wu, H., Gautam, S. C., Al-Holou, S., Li, C., Kuo, J., Zhang, L., & Chopp, M. (2009). Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *Journal of experimental therapeutics & oncology*, 8(1), 25–33.
- Jiang, H., Shang, X., Wu, H., Huang, G., Wang, Y., Al-Holou, S., Gautam, S. C., & Chopp, M. (2010). Combination Treatment with Resveratrol and Sulforaphane Induces Apoptosis in Human U251 Glioma Cells. *Neurochemical research*, 35(1), 152. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0040-7>
- Jiang, H., Zhang, L., Kuo, J., Kuo, K., Gautam, S. C., Groc, L., Rodriguez, A. I., Koubi, D., Jackson Hunter, T., Corcoran, G. B., Seidman, M. D., & Levine, R. A. (2005). Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(4), 554–561. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0056>
- Jiménez-Moreno, N., Volpe, F., Moler, J. A., Esparza, I., & Ancín-Azpilicueta, C. (2019). Impact of Extraction Conditions on the Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Grape Stem Extracts. *Antioxidants*, 8(12), 597. <https://doi.org/10.3390/antiox8120597>
- Joe, A. K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M. E., Xiao, D., & Weinstein, I. B. (2002). Resveratrol Induces Growth Inhibition, S-phase Arrest, Apoptosis, and Changes in Biomarker Expression in Several Human Cancer Cell Lines. *Clinical Cancer Research*, 8(3), 893–903.
- Kalyanaraman, B., Darley-USmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine, Highlight Paper: Measuring Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Fluorescence Probes: Challenges and Limitations*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
- Karim, A. M., Eun Kwon, J., Ali, T., Jang, J., Ullah, I., Lee, Y.-G., Park, D. W., Park, J., Jeang, J. W., & Kang, S. C. (2023). Triple-negative breast cancer: Epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. *Biochemical Pharmacology*, 212, 115545. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115545>
- Kim, H., & Choi, D. H. (2013). Distribution of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Asian Patients with Breast Cancer. *Journal of Breast Cancer*, 16(4), 357–365. <https://doi.org/10.4048/jbc.2013.16.4.357>

- Koboldt, D. C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., McMichael, J. F., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Ding, L., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ally, A., Balasundaram, M., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Carter, C., Chu, A., Chuah, E., Chun, H.-J. E., ... MD Anderson Cancer Center. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(7418), 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- Kosović, E., Topiař, M., Cuřínová, P., & Sajfrtová, M. (2020). Stability testing of resveratrol and viniferin obtained from *Vitis vinifera* L. by various extraction methods considering the industrial viewpoint. *Scientific Reports*, 10, 5564. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62603-w>
- Leeuwen, C. van, Roby, J.-P., & Rességuier, L. de. (2018). Soil-related terroir factors: A review. *OENO One*, 52(2), 173–188. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.2.2208>
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI45014>
- Li, H., Jia, Z., Li, A., Jenkins, G., Yang, X., Hu, J., & Guo, W. (2013). Resveratrol repressed viability of U251 cells by miR-21 inhibiting of NF- $\kappa$ B pathway. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 382(1), 137–143. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1728-1>
- Li, J., Qin, Z., & Liang, Z. (2009). The prosurvival role of autophagy in Resveratrol-induced cytotoxicity in human U251 glioma cells. *BMC Cancer*, 9, 215. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-215>
- Longley, D., & Johnston, P. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology*, 205(2), 275–292. <https://doi.org/10.1002/path.1706>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021a). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Macke, S., Jerz, G., Empl, M. T., Steinberg, P., & Winterhalter, P. (2012). Activity-Guided Isolation of Resveratrol Oligomers from a Grapevine-Shoot Extract Using Countercurrent Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 11919–11927. <https://doi.org/10.1021/jf3030584>
- Mahmoudzadeh, A., & Mohammadpour, H. (2016). Tumor cell culture on collagen–chitosan scaffolds as three-dimensional tumor model: A suitable model for tumor studies. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(3), 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.02.008>

- Marin, B.-M., Porath, K. A., Jain, S., Kim, M., Conage-Pough, J. E., Oh, J.-H., Miller, C. L., Talele, S., Kitange, G. J., Tian, S., Burgenske, D. M., Mladek, A. C., Gupta, S. K., Decker, P. A., McMinn, M. H., Stopka, S. A., Regan, M. S., He, L., Carlson, B. L., ... Sarkaria, J. N. (2021). Heterogeneous delivery across the blood-brain barrier limits the efficacy of an EGFR-targeting antibody drug conjugate in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 23(12), 2042–2053. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab133>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
- Montané, X., Kowalczyk, O., Reig-Vano, B., Bajek, A., Roszkowski, K., Tomczyk, R., Pawliszak, W., Giamberini, M., Mocek-Płóćiniak, A., & Tylkowski, B. (2020). Current Perspectives of the Applications of Polyphenols and Flavonoids in Cancer Therapy. *Molecules*, 25(15), 3342. <https://doi.org/10.3390/molecules25153342>
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D.-P., Li, S., Chen, Y.-M., & Li, H.-B. (2016). Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, 8(8), 515. <https://doi.org/10.3390/nu8080515>
- Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M. G., Hara, T., Shore, M. E., Rahme, G. J., Richman, A. R., Silverbush, D., Shaw, M. L., Hebert, C. M., Dewitt, J., Gritsch, S., Perez, E. M., Gonzalez Castro, L. N., Lan, X., Druck, N., Rodman, C., Dionne, D., Kaplan, A., ... Suvà, M. L. (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*, 178(4), 835-849.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.024>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Nie, J.-H., Li, H., Wu, M.-L., Lin, X.-M., Xiong, L., & Liu, J. (2019). Differential Exosomic Proteomic Patterns and Their Influence in Resveratrol Sensitivities of Glioblastoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 191. <https://doi.org/10.3390/ijms20010191>
- Nivelle, L., Hubert, J., Courot, E., Jeandet, P., Aziz, A., Nuzillard, J.-M., Renault, J.-H., Clément, C., Martiny, L., Delmas, D., & Tarpin, M. (2017). Anti-Cancer Activity of Resveratrol and Derivatives Produced by Grapevine Cell Suspensions in a 14 L Stirred Bioreactor. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22(3), 474. <https://doi.org/10.3390/molecules22030474>

- Noviello, M., Caputi, A. F., Squeo, G., Paradiso, V. M., Gambacorta, G., & Caponio, F. (2022). Vine Shoots as a Source of Trans-Resveratrol and  $\epsilon$ -Viniferin: A Study of 23 Italian Varieties. *Foods*, 11(4), 553. <https://doi.org/10.3390/foods11040553>
- Nurgali, K., Jagoe, R. T., & Abalo, R. (2018). Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Frontiers in Pharmacology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00245>
- Pawlowski, J., & Kraft, A. S. (2000). Bax-induced apoptotic cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 529–531. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.529>
- Peixoto, C. M., Dias, M. I., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Barros, L., Pinho, S. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>
- Pereira, S. V., Reis, R. A. S. P., Garbuio, D. C., & de Freitas, L. A. P. (2018). Dynamic maceration of *Matricaria chamomilla* inflorescences: Optimal conditions for flavonoids and antioxidant activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.11.006>
- Pontén, J., & Macintyre, E. H. (1968). Long Term Culture of Normal and Neoplastic Human Glia. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 74(4), 465–486. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1968.tb03502.x>
- Price, M., Ballard, C. A. P., Benedetti, J. R., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J. S., & Ostrom, Q. T. (2025). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2018-2022. *Neuro-Oncology*, 27(Supplement\_4), iv1–iv66. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noaf194>
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S. (2000). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, 39(1), 20.2.1-20.2.16. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>
- Putri, G. F. T., & Z, Z. N. (2025). Bax/Bcl-2 Ratio as the Golden Marker of Apoptosis: Molecular Mechanisms and Regulatory Pathways. *International Journal of Cell and Biomedical Science*, 4(10), 309–317. <https://doi.org/10.59278/cbs.v4i10.65>
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.985363>
- Quero, J., Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Osada, J., Cerrada, E., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2021). Grape Stem Extracts with Potential Anticancer and Antioxidant Properties. *Antioxidants*, 10(2), 243. <https://doi.org/10.3390/antiox10020243>

- Rafehi, H., Orlowski, C., Georgiadis, G. T., Ververis, K., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2011). Clonogenic Assay: Adherent Cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (49), 2573. <https://doi.org/10.3791/2573>
- Raisova, M., Hossini, A. M., Eberle, J., Riebeling, C., Orfanos, C. E., Geilen, C. C., Wieder, T., Sturm, I., & Daniel, P. T. (2001). The Bax/Bcl-2 Ratio Determines the Susceptibility of Human Melanoma Cells to CD95/Fas-Mediated Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 117(2), 333–340. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01409.x>
- Ratz-Łyko, A., & Arct, J. (2019). Resveratrol as an active ingredient for cosmetic and dermatological applications: A review. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy: Official Publication of the European Society for Laser Dermatology*, 21(2), 84–90. <https://doi.org/10.1080/14764172.2018.1469767>
- Reguouat, K., Boumaza Bourioune, S., Aouragh, K., Allali, S., Amalou, A., & Aouichat Bouguerra, S. (2025). Resveratrol-rich extract from *Vitis vinifera* canes exhibits enhanced anticancer activity in A549 cells and 3D lung cancer co-culture model. *Cytotechnology*, 77(5), 179. <https://doi.org/10.1007/s10616-025-00845-0>
- Reis, G. M., Faccin, H., Viana, C., Rosa, M. B. da, & de Carvalho, L. M. (2016). *Vitis vinifera* L. cv Pinot noir pomace and lees as potential sources of bioactive compounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(7), 789–796. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1204595>
- Nassiri-Asl, M., and Hosseinzadeh, H. (2016). Review of the Pharmacological Effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its Bioactive Constituents: An Update. *Phytother. Res.*, 30: 1392–1403. <https://doi.org/10.1002/ptr.5644>
- Robson, M., Im, S.-A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Tung, N., Armstrong, A., Wu, W., Goessl, C., Runswick, S., & Conte, P. (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *New England Journal of Medicine*, 377(6), 523–533. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706450>
- Salakou, S., Kardamakis, D., Tsamandas, A. C., Zolota, V., Apostolakis, E., Tzelepi, V., Papathanasopoulos, P., Bonikos, D. S., Papapetropoulos, T., Petsas, T., & Dougenis, D. (2007). Increased Bax/Bcl-2 Ratio Up-regulates Caspase-3 and Increases Apoptosis in the Thymus of Patients with Myasthenia Gravis. *In Vivo*, 21(1), 123–132.
- Sarkaria, J. N., Hu, L. S., Parney, I. F., Pafundi, D. H., Brinkmann, D. H., Laack, N. N., Giannini, C., Burns, T. C., Kizilbash, S. H., Laramy, J. K., Swanson, K. R., Kaufmann, T. J., Brown, P. D., Agar, N. Y. R., Galanis, E., Buckner, J. C., & Elmquist, W. F. (2018). Is the blood-brain barrier

- really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology*, 20(2), 184–191. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox175>
- Schmid, P., Cortes, J., Dent, R., Pusztai, L., McArthur, H., Kümmel, S., Bergh, J., Denkert, C., Park, Y. H., Hui, R., Harbeck, N., Takahashi, M., Untch, M., Fasching, P. A., Cardoso, F., Andersen, J., Patt, D., Danso, M., Ferreira, M., ... O'Shaughnessy, J. (2022). Event-free Survival with Pembrolizumab in Early Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 386(6), 556–567. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2112651>
- Schrörs, B., Boegel, S., Albrecht, C., Bukur, T., Bukur, V., Holtsträter, C., Ritzel, C., Manninen, K., Tadmor, A. D., Vormehr, M., Sahin, U., & Löwer, M. (2020). Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01195>
- Sharma, S. V., Haber, D. A., & Settleman, J. (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 241–253. <https://doi.org/10.1038/nrc2820>
- Spinelli, R., Nati, C., Pari, L., Mescalchin, E., & Magagnotti, N. (2012). Production and quality of biomass fuels from mechanized collection and processing of vineyard pruning residues. *Applied Energy, Special issue on Thermal Energy Management in the Process Industries*, 89(1), 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.07.049>
- Spiteri, I., Caravagna, G., Cresswell, G. D., Vatsiou, A., Nichol, D., Acar, A., Ermini, L., Chkhaidze, K., Werner, B., Mair, R., Brognaro, E., Verhaak, R. G. W., Sanguinetti, G., Piccirillo, S. G. M., Watts, C., & Sottoriva, A. (2019). Evolutionary dynamics of residual disease in human glioblastoma. *Annals of Oncology*, 30(3), 456–463. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy506>
- Squillaci, G., Vitiello, F., Mosca, L., La Cara, F., Cacciapuoti, G., Porcelli, M., & Morana, A. (2022). Polyphenol Extract from “Greco” Grape Canes: Characterization, Antioxidant Capacity, and Antitumor Effects on Cal-33 and JHU-SCC-011 Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Molecules*, 27(8), 2576. <https://doi.org/10.3390/molecules27082576>
- Steiner, J. L., & Lang, C. H. (2017). Etiology of alcoholic cardiomyopathy: Mitochondria, oxidative stress and apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 89, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.06.009>
- Brás, L. P., Luís, Â., Chatel, G., Socorro, S., & Duarte, A. P. (2025). Stilbenes from Vine Extracts: Therapeutic Potential and Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(17), 8269. <https://doi.org/10.3390/ijms26178269>
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling

perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159–167.  
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>

Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

Sun, Z., Li, H., Shu, X.-H., Shi, H., Chen, X.-Y., Kong, Q.-Y., Wu, M.-L., & Liu, J. (2012). Distinct sulfonation activities in resveratrol-sensitive and resveratrol-insensitive human glioblastoma cells. *The FEBS Journal*, 279(13), 2381–2392. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08617.x>

The story of an all-Italian masterpiece: Grappa. (2023). *Fine Taste*.

<https://www.finetaste.it/en/blogs/vini-e-bevande/la-storia-di-un-capolavoro-tutto-italiano-la-grappa>

Torsvik, A., Stieber, D., Enger, P. Ø., Golebiewska, A., Molven, A., Svendsen, A., Westermarck, B., Niclou, S. P., Olsen, T. K., Chekenya Enger, M., & Bjerkvig, R. (2014). U-251 revisited: Genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer Medicine*, 3(4), 812–824. <https://doi.org/10.1002/cam4.219>

Trans-epsilon-Viniferin | CAS 62218-08-0 | Cayman Chemical | Biomol.com  
<https://www.biomol.com/products/chemicals/biochemicals/trans-epsilon-viniferin-cay25737-500>

Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1730-1>

Wagner, H. (2011). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia, Papers from the 2010 DSHEA Symposium, Chicago, IL, USA*, 82(1), 34–37. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.11.016>

Wei, F., Wang, S., & Gou, X. (2021). A review for cell-based screening methods in drug discovery. *Biophysics Reports*, 7(6), 504–516. <https://doi.org/10.52601/bpr.2021.210042>

Williamson, E. M. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, 8(5), 401–409. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00060>

Wimmer, K., Sachet, M., & Oehler, R. (2020). Circulating biomarkers of cell death. *Clinica Chimica Acta*, 500, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.10.003>

Wine 101: Barrel Fermentation | Wollersheim Winery, Distillery & Bistro.  
<https://www.wollersheim.com/wine-101-barrel-fermentation/>

Wu, H., Gao, W., Chen, P., Wei, Y., Zhao, H., & Wang, F. (2024). Research progress of drug resistance mechanism of temozolomide in the treatment of glioblastoma. *Heliyon*, 10(21), e39984. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e39984>

- Xiong, W., Yin, A., Mao, X., Zhang, W., Huang, H., & Zhang, X. (2016). Resveratrol suppresses human glioblastoma cell migration and invasion via activation of RhoA/ROCK signaling pathway. *Oncology Letters*, 11(1), 484–490. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3888>
- Xue, Y. Q., Di, J. M., Luo, Y., Cheng, K. J., Wei, X., & Shi, Z. (2014). Resveratrol Oligomers for the Prevention and Treatment of Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 765832. <https://doi.org/10.1155/2014/765832>
- Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Li, X., Subhan, M. A., Parveen, F., Ataide, J. A., Rajmalani, B. A., & Torchilin, V. P. (2023a). Mechanisms of Resistance and Current Treatment Options for Glioblastoma Multiforme (GBM). *Cancers*, 15(7), 2116. <https://doi.org/10.3390/cancers15072116>
- Zafar, A., Khan, M. J., Abu, J., & Naeem, A. (2024). Revolutionizing cancer care strategies: Immunotherapy, gene therapy, and molecular targeted therapy. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 219. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09096-8>