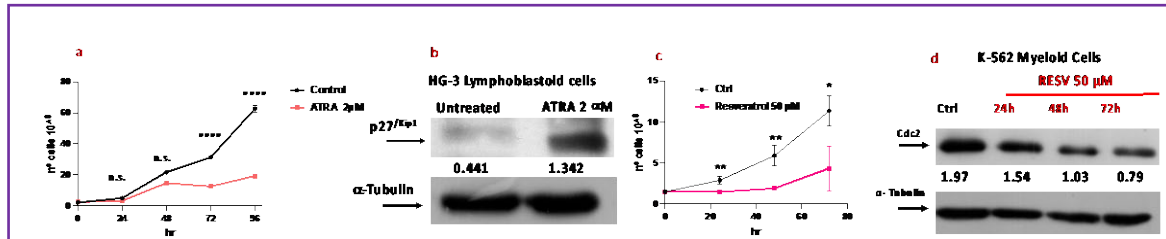


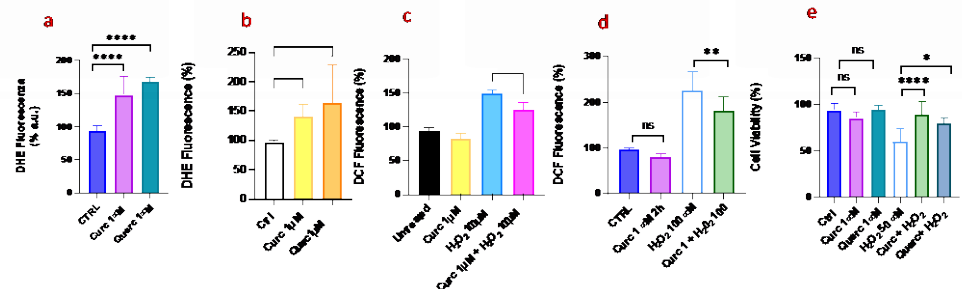


Annamaria Di Giacomo<sup>1</sup>, Federica Fiore<sup>1</sup>, Gian Luigi Russo<sup>1</sup>, Maria Russo<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Istituto di Scienze dell'Alimentazione (CNR) Avellino

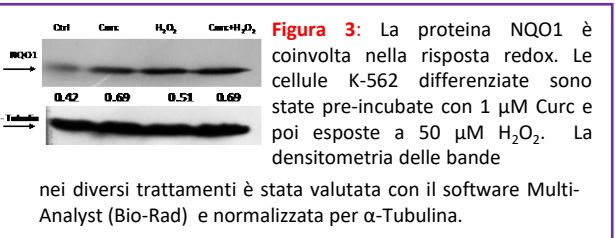
**Introduzione:** Il presente studio ha analizzato i meccanismi molecolari di polifenoli naturali a concentrazioni molto basse, in linea con la loro bassa biodisponibilità nei tessuti umani, dimostrando la loro capacità di proteggere cellule differenziate umane della linea linfoide e mieloide attivando la risposta antiossidante dipendente dal fattore di trascrizione Nrf2 e modulando l'autofagia. Come modelli sperimentali sono stati utilizzati due tipi di cellule immunitarie precedentemente caratterizzate derivate dalle linee HG-3 e K-562, differenziate con acido all-trans retinoico (ATRA, **Figura 1 a-b**) e il resveratrolo (**Figura 1 c-d**).



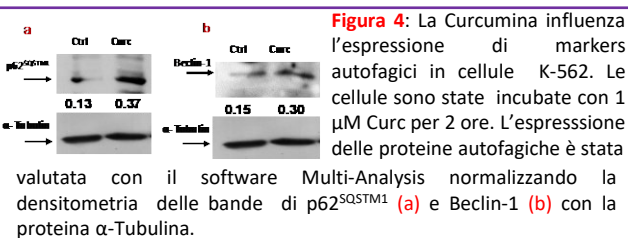
**Figura 1.** Caratterizzazione dei modelli cellulari. Le cellule HG-3 sono incubate con All-Trans Retinoico Acid (ATRA) 2 µM da 24 a 96 ore. L'effetto antiproliferativo è correlato all'aumentata espressione della proteina p27<sup>Kip1</sup> (a-b). Le cellule K-562 sono trattate con la fitoalexina Resveratrolo 50 µM fino a 72 ore, determinando una diminuzione dell'espressione della proteina correlata al ciclo cellulare Cdc-2 e a un effetto antiproliferativo (c-d).



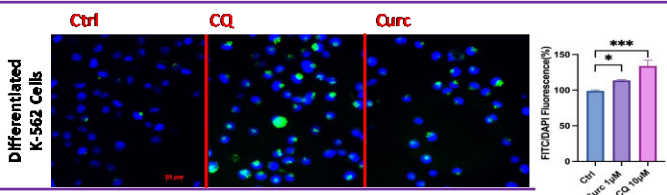
**Figura 2:** Curc and Querc alterano lo stato redox in cellule HG-3 e K-562 differenziate. Le cellule sono state incubate con Curc e Querc per 40 min. L'anione superossido è stato misurato con il metodo DHE. La significatività è stata calcolata con il T-Test \*\*\*\*= $p < 0.0001$  (K-562 a, HG-3 b). Le cellule pre-incubate con Curc sono state trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per 5 min. I perossidi intracellulari sono stati misurati con il fluorocromo DCF. (HG-3 c, K-562 d). Le K-562 sono state pre-incubate con Curc o Querc (1 µM) e poi trattate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µM) per 24 ore. La vitalità cellulare è stata valutata con il metodo CyQuant (e). La significatività è stata calcolata con ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$



**Figura 3:** La proteina NQO1 è coinvolta nella risposta redox. Le cellule K-562 differenziate sono state pre-incubate con 1 µM Curc e poi esposte a 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La densitometria delle bande nei diversi trattamenti è stata valutata con il software Multi-Analyst (Bio-Rad) e normalizzata per α-Tubulina.



**Figura 4:** La Curcumina influenza l'espressione di markers autofagici in cellule K-562. Le cellule sono state incubate con 1 µM Curc per 2 ore. L'espressione delle proteine autofagiche è stata valutata con il software Multi-Analysis normalizzando la densitometria delle bande di p62<sup>SQSTM1</sup> (a) e Beclin-1 (b) con la proteina α-Tubulina.



**Figura 5:** Effetti della Curcumina sul flusso autofagico nelle cellule K-562. Le cellule differenziate sono state trattate con Curc (1 µM) e Clorochina (CQ 20 µM). Dopo la colorazione con i fluorocromi CytoID (FITC) e Hoechst (DAPI), il rapporto della fluorescenza FITC/DAPI è stato espresso come percentuale rispetto alle cellule di controllo. I simboli indicano la significatività calcolata con T-Test with \*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ .

**Risultati:** La curcumina (Curc) e la quercetina (Querc) a concentrazione 1 µM possono modulare lo stato redox nelle cellule HG-3 e K-562 inducendo un moderato stress ossidativo dopo 40 minuti di incubazione (**Figura 2a-b**). Tale stress ossidativo, che non induce tossicità, stimola una risposta antiossidante in entrambi i modelli. Infatti, quando le cellule sono pre-incubate per 16 ore con Curc 1 µM, sono protette dallo stress ossidativo indotto da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> misurato con il fluorocromo specifico per i perossidi (DCF) (**Figura 2 c-d**). Curc e Querc, pre-incubate per 16 ore, proteggono le cellule K-562 stressate con una dose citotossica di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 2 e**). Da un punto di vista meccanicistico, Curc attiva la risposta antiossidante regolata dal fattore di trascrizione Nrf2 attraverso l'espressione di NQO1 (**Figura 3**) e modula il flusso autofagico nelle cellule K-562 valutato con i marcatori p62<sup>SQSTM1</sup> e Beclin-1 (**Figura 4 a-b**) e un fluorocromo specifico per gli autofagosomi (Cyto-ID, **Figura 5 a-b**).

**Discussione:** Il nostro studio ha rivelato che Querc e Curc, a basse dosi, possono proteggere le cellule immunitarie dalla citotossicità indotta dall'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Questa protezione si ottiene attraverso l'attivazione della risposta antiossidante dipendente da Nrf2 correlata all'aumento significativo dei livelli di NQO1. Anche a basse dosi, la Curc innesca una risposta autofagica, che contribuisce ulteriormente alla protezione cellulare contro il danno ossidativo. Questi risultati sono particolarmente significativi poiché queste molecole hanno una bassa biodisponibilità e i dati ottenuti possono arricchire le conoscenze scientifiche sulle effettive proprietà biochimiche dei composti bioattivi naturali.

**Conclusione/prospettive:** Considerato che alcuni gruppi di individui sono più sensibili a stress ambientali (es. anziani e popolazioni che vivono in aree inquinate) e quindi risultano esposti ad un maggior rischio di sviluppare malattie cronic-degenerative, questo studio suggerisce che alcuni agenti naturali assunti a dosi nutrizionali potrebbero esercitare un'azione chemioprotettiva che dovrà essere confermata in modelli pre-clinici e clinici.

Parole chiave: quercetina, curcumina, Nrf2, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p62, autofagia

