



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata
curriculum scienze della nutrizione**

**“Studio *in vitro* dell'attività anti-tumorale di un
estratto di fragola in una linea cellulare umana di
cancro all'ovaio”**

**“*In vitro* anti-tumor activity of strawberry extract on
human ovarian cancer cell”**

Tesi di Laurea Magistrale
di: Lucia Regolo

Relatore:
Chiar.mo Prof. Maurizio Battino

Primo Correlatore:
Prof. Stefano Bompadre

Secondo Correlatore:
Dott.ssa Francesca Giampieri

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Il cancro ovarico.....	1
1.1.1 Fattori di rischio.....	3
1.1.2 Prevenzione primaria e secondaria.....	10
1.2 La fragola.....	16
1.2.1 Nutrienti della fragola.....	18
1.2.2 I polifenoli.....	22
1.2.3 I polifenoli della fragola.....	23
1.2.3.1 Antocianine.....	24
1.2.3.2 Ellagitannini.....	25
1.2.3.3 Altre sostanze polifenoliche.....	25
1.2.4 Capacità antiossidante (TAC).....	26
1.2.5 Possibile ruolo della fragola nella prevenzione del cancro.....	27
1.3 Scopo dello studio.....	29
2. MATERIALI e METODI.....	30
2.1 Valutazione caratteristiche nutrizionali e fitochimiche Romina.....	30
2.1.1 Raccolta e trattamento dei campioni.....	30
2.1.2 Determinazione della capacità antiossidante totale.....	32
2.1.3 Determinazione del contenuto fenolico totale.....	34
2.1.4 Determinazione del contenuto dei flavonoidi totali.....	35

2.1.5	Determinazione del contenuto totale di antociani.....	36
2.1.6	Identificazione e quantificazione degli antociani.....	38
2.1.7	Determinazione del contenuto di Vitamina C.....	40
2.2	Studio <i>in vitro</i>	41
2.2.1	Vitalità cellulare.....	42
2.2.2	Tasso di apoptosi.....	44
2.2.3	Saggio di migrazione cellulare.....	45
2.2.4	Concentrazione intracellulare ROS.....	46
2.2.5	Analisi bioenergetiche.....	47
2.2.6	Analisi statistica.....	48
3.	RISULTATI.....	49
3.1	Caratterizzazione nutrizionale e fitochimica cultivar Romina.....	50
3.1.1	Capacità antiossidante totale.....	50
3.1.2	Contenuto polifenoli, flavonoidi e antociani.....	50
3.1.3	Identificazione e quantificazione degli antociani.....	50
3.1.4	Contenuto Vitamina C.....	52
3.2	Studio <i>in vitro</i>	52
3.2.1	Vitalità cellulare.....	52
3.2.2	Tasso di apoptosi.....	53
3.2.3	Saggio di migrazione cellulare.....	55

3.2.4 Concentrazione intracellulare ROS.....	56
3.2.5 Analisi bioenergetiche.....	57
3.2.5.1 OCR.....	58
3.2.5.2 ECAR.....	60
4. DISCUSSIONE.....	61
5. CONCLUSIONI.....	68
6. BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA.....	69

1. INTRODUZIONE

1.1 Il cancro ovarico

Il cancro ovarico è la principale causa di morte tra le varie neoplasie ginecologiche; a livello mondiale ogni anno viene diagnosticato a 240.000 donne e, con una sopravvivenza a cinque anni sotto il 45%, è responsabile di 150.000 decessi. Questi dati registrati negli anni lo rendono il 7 ° tumore più comune e l'8 ° causa più comune di morte per cancro nelle donne^[1]. Il cancro ovarico è una malattia eterogenea, più comune nei paesi industrializzati e in via di sviluppo dove l'occidentalizzazione dello stile di vita e i cambiamenti nel comportamento socio-demografico hanno portato ad un drastico aumento della sua incidenza. I tassi di incidenza standardizzati per l'età sono più elevati nell'Europa settentrionale e centrale/orientale, intermedi in Nord America, Australia e Europa occidentale e i più bassi sono in Asia e Africa^[2]. I tassi di incidenza variano anche in base all'etnia all'interno di uno stato: ad esempio negli Stati Uniti d'America le donne bianche non ispaniche hanno un tasso di incidenza maggiore del 30% rispetto alle donne afro-americane e asiatiche e maggiore del 12% rispetto alle donne ispaniche^[3]. Il cancro ovarico è raro nelle donne con età inferiore ai 40 anni e il principale tumore che è stato riscontrato in questo gruppo è quello relativo alle cellule germinali; oltre i 40 anni, più del 90% sono tumori epiteliali e il rischio

aumenta con il passare dell'età fino ad avere un picco attorno ai 70 anni. Il cancro ovarico epiteliale rappresenta circa il 90% del cancro ovarico e può derivare dalle cellule dell'epitelio dell'ovaio, del peritoneo e delle tube di Falloppio. La restante percentuale di tumori ovarici ha origine da cellule germinali e stromali gonadiche. La mutazione nel DNA dell'epitelio ovarico è responsabile del 10-15% dei casi di tumore all'epitelio ovarico^[4]. Il cancro ovarico epiteliale è classificato in cinque sottotipi istologici: sieroso di alto grado, sieroso di basso grado, a cellule chiare, endometriode e mucinoso. Attualmente si ritiene che le tube di Falloppio siano l'organo di origine del carcinoma sieroso di alto grado che è il sottotipo di malattia più comune. Gli altri due sottotipi prevalenti sono a cellule chiare e quello endometriode che derivano dall'endometrio^[5]. Il carcinoma ovarico precoce è una malattia asintomatica e nonostante lo sviluppo di efficaci metodiche di screening, di specifici interventi chirurgici e della terapia chemioterapica, rimane il cancro ginecologico più letale in tutto il mondo. Il tempo di sopravvivenza è influenzato positivamente dall'età al momento della diagnosi, dallo stadio iniziale del tumore e dall'istologia di basso grado e non sierosa^[6]. Poiché la maggior parte dei pazienti viene diagnosticata in stadio avanzato (stadi III e IV), il tasso di sopravvivenza risulta essere estremamente basso.

1.1.1 Fattori di rischio

I fattori di rischio sono delle specifiche condizioni che aumentano in modo statisticamente significativo la probabilità di sviluppare una certa patologia; la loro assenza non porta alla totale esclusione della comparsa della malattia, mentre la loro presenza o la compresenza di più fattori di rischio, aumenta notevolmente il rischio di malattia. Studi epidemiologici condotti negli ultimi anni hanno evidenziato i possibili fattori di rischio coinvolti nell'aumento dell'insorgenza del cancro all'ovaio e sono stati classificati in fattori di rischio non modificabili e modificabili. Tra quelli non modificabili vengono annoverate tutte quelle condizioni che non dipendono dalla volontà umana che non possono essere variate come l'età, il sesso, l'etnia e l'ereditarietà. Ad esempio è ben noto che le donne con una storia familiare di cancro ovarico hanno una più elevata probabilità di malattia; il rischio per le donne con un parente di primo grado affetto è circa tre volte superiore rispetto alle donne che non presentano parenti affetti^[7] e è ancor più elevato per quelle donne che hanno un parente sotto i 50 anni a cui è stato diagnosticato il tumore^[8]. Un'alta percentuale di tumori ereditari è dovuta a mutazioni nei geni BRCA e in particolare BRCA1 (breast cancer type 1 susceptibility protein) e BRCA2 (breast cancer type 2 susceptibility protein); appartengono alla famiglia dei geni oncosoppressori e il loro prodotto genico è coinvolto nella riparazione

dei tratti cromosomici danneggiati, con un ruolo importante nella riparazione degli errori e delle rotture nel doppio filamento di DNA. Se BRCA1 o BRCA2 sono mutati, viene perso il controllo del ciclo cellulare e la cellula potrà dare origine a cellule figlie con mutazioni del DNA, rendendole suscettibili alla formazione di neoplasie. Si è visto che le mutazioni BRCA sono comuni anche tra le donne con cancro ovarico che non hanno una storia familiare di cancro al seno o alle ovaie^[9]. I portatori della mutazione BRCA1 hanno una stima del rischio del 40-50% di sviluppare il cancro ovarico entro i 70 anni, rispetto al 10-20% dei portatori della mutazione BRCA2^[10]. La maggior parte dei tumori associati a queste mutazioni sono tumori sierosi di alto grado. Mutazioni su altri geni come BRIP1^[11] e RAD51^[12] conferiscono un moderato incremento del rischio di cancro ovarico e ad oggi sono stati identificati degli altri loci associati ad un basso rischio: CHEK2, WNT4, TERT e ABO. Un altro importante fattore di rischio non modificabile è l'età del menarca di cui però si hanno risultati contrastanti; una meta-analisi^[13] ha riportato una significativa riduzione del rischio nelle donne che hanno avuto la prima mestruazione in età tardiva, mentre un recente studio non ha confermato questo risultato^[14]. Ci sono risultati molto più chiari riguardo all'associazione tra il cancro ovarico e l'età di menopausa. Un'analisi pooled ha rilevato che ad ogni aumento di 5 anni dell'età di menopausa è associato un

aumento del 6% del rischio di cancro ovarico, con effetti negativi maggiori per i tumori endometrioidi e a cellule chiare (19% e 37% rispettivamente), ma nessuna associazione per i tumori mucinosi. Un altro fattore di rischio non modificabile è l'età, infatti le donne nel periodo post-menopausa sono maggiormente esposte a questa malattia. Quindi il rischio di sviluppo di cancro ovarico aumenta in modo proporzionale con l'avanzare dell'età e alla prima diagnosi della malattia le donne anziane tendono a trovarsi in uno stadio più avanzato rispetto alle donne più giovani.

I fattori di rischio modificabili, invece, sono collegati all'esposizione del soggetto a determinati agenti o a stili di vita che possono essere variati, come ad esempio il tabagismo, l'alimentazione, il consumo di alcol, l'assunzione di farmaci, le gravidanze, il BMI e uno stile di vita sedentario. Per quanto riguarda la gravidanza, molti studi hanno mostrato che le donne multipare hanno un rischio ridotto di cancro ovarico e ad ogni nuova nascita è associata un'ulteriore riduzione del rischio del 10-20%^[14,15]. Un recente studio di Hankinson e colleghi ha dimostrato che rispetto alla donna nullipare, le donne multipare hanno un rischio ridotto di cancro ovarico dopo la nascita del primo figlio e il rischio continua a diminuire dopo il secondo, terzo, quarto, quinto e sesto o più figli rispettivamente di circa il 7%, 32%, 47%, 56%, 59% e 65%^[16]. Da alcuni studi si è visto che una gravidanza gemellare riduce il

rischio più di una gravidanza singola^[17]; al contrario, la maggior parte degli studi indica che le gravidanze incomplete (aborti spontanei, aborti, gravidanze ectopiche) non riducono il rischio di cancro ovarico^[18], anzi più aborti spontanei sono stati associati ad un aumento del rischio^[19]. Un aumento del rischio è correlato anche all'infertilità e questo potrebbe dipendere dalla riduzione del numero di cicli di ovulazione nel corso della vita di una donna^[20]. L'allattamento al seno è un altro fattore associato alla comparsa di carcinoma ovarico, maggiore sarà il periodo di durata dell'allattamento minore sarà il rischio di malattia. L'allattamento per meno di 6 mesi riduce il rischio del 21%, tra i 6 e i 12 mesi si ha una riduzione del 28% e per una durata superiore ai 12 mesi del 33%^[21]. L'uso di ormoni esogeni, contraccettivi orali o terapia ormonale in menopausa (MHT) sono dei fattori di rischio modificabili e a riguardo sono stati effettuati molti studi; è chiaro che l'uso della pillola anticoncezionale combinata (OC) è inversamente associato al rischio di cancro ovarico. Un'analisi che ha riunito i dati di 45 studi di 21 paesi differenti ha mostrato che il rischio di cancro all'ovaio nelle donne che hanno usato contraccettivi orali era il 30% inferiore rispetto a chi non ne aveva mai fatto uso^[22]. Il rischio era ulteriormente ridotto con l'aumentare della durata di utilizzo (~ 20% ogni cinque anni) e sebbene l'effetto possa attenuarsi nel tempo, il beneficio sembra persistere per almeno

30 anni dopo la cessazione^[22]. L'uso di OC è stato anche associato ad una diminuzione del rischio tra i portatori della mutazione BRCA^[23]. Col passare del tempo, le tecniche di preparazione di OC sono cambiate notevolmente e tra gli anni '60/'80 la quantità di estrogeni è stata dimezzata; questo cambiamento potrebbe influenzare la relazione con il rischio di cancro ovarico. Invece dall'analisi di 52 differenti studi si è visto come l'uso della terapia ormonale in menopausa (MHT) aumenta il rischio di cancro ovarico di circa il 40% e che, anche dopo l'interruzione, il rischio rimane elevato per almeno cinque anni nelle donne che avevano utilizzato MHT per cinque o più anni^[24]; quindi il rischio aumenta all'aumentare del periodo di somministrazione di MHT. È probabile che il rischio associato all'utilizzo di MHT vari in base all'istotipo considerato; si ha un aumento del rischio di tumori sierosi ed endometrioidi, una significativa riduzione del 25% del rischio di tumori a cellule chiare e nessuna associazione con tumori mucinosi^[24]. Anche l'utilizzo di FANS (farmaci anti-infiammatori non steroidei) è stato correlato alla riduzione del rischio e più nello specifico un'analisi pooled^[25] ha mostrato che l'uso regolare di aspirina, in particolare a basse dosi^[26], era associato a una significativa riduzione del rischio di cancro ovarico del 20% con una riduzione simile, ma non significativa, per l'uso di altri farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS). Un altro fattore di

rischio è il BMI (body mass index); le donne con un BMI superiore a 30, che corrisponde ad una condizione di obesità, hanno un aumento di oltre due volte il rischio di cancro ovarico rispetto alle donne normopeso con BMI tra 18 e 25^[27,28]. Uno studio ha riportato un aumento del 10% del rischio di cancro ovarico per aumento di 5 kg/m² dell'indice di massa corporea^[29]. Al contrario, una recente revisione ha mostrato una relazione inferiore tra obesità e rischio di cancro ovarico^[30]. E' ben noto che l'obesità è associata a infiammazione, a resistenza all'insulina e ad aumento dei livelli di estrogeni (Fig. 1). Il persistente stato infiammatorio indotto dal TNF- α può incoraggiare il danneggiamento del DNA, l'angiogenesi, la metastasi e l'immunosoppressione nei siti di infiammazione^[31].

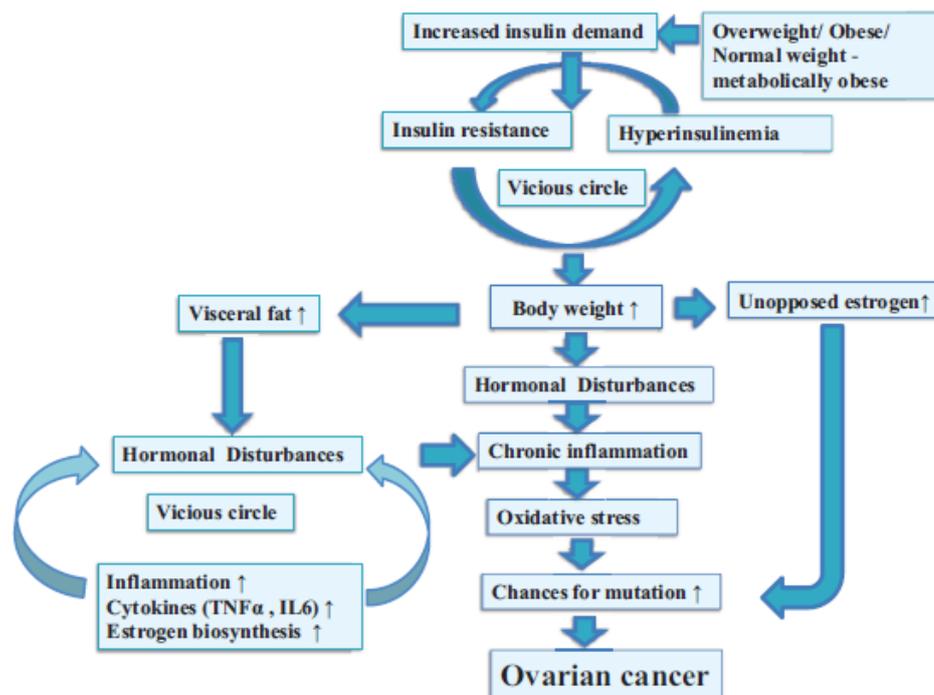


Figura 1. Meccanismo che descrive la relazione tra obesità e sviluppo di cancro ovarico. C'è un aumento della domanda di insulina nelle donne in sovrappeso, obese e normali ma metabolicamente obese. Il pancreas risponde aumentando la secrezione di insulina e, di conseguenza, il corpo depositerà più grasso e l'aumento del peso porterà ad un aumento della richiesta di insulina. L' aumento della secrezione di insulina in queste donne porterà principalmente all'insulino-resistenza e si instaurerà una condizione di iperinsulinemia. Il corpo entra in un circolo vizioso dove una maggiore insulino-resistenza costringe il pancreas a secernere più insulina. Di conseguenza, il corpo inizia a dirigere il grasso in eccesso nella cavità addominale per essere depositato come grasso viscerale. Ciò causerà disturbi ormonali, aumento delle citochine e infiammazione, oltre ad aumentare la secrezione di estrogeni dal tessuto adiposo. Si svilupperà un'infiammazione cronica che porta a stress ossidativo, che aumenta le possibilità di mutazione e in ultima analisi può portare ad aumentare il rischio di sviluppo del cancro ovarico (tratto da Aus Tariq Ali, 2018).

Precedenti studi hanno riportato una relazione significativa tra il cancro ovarico e i grassi alimentari, soprattutto quelli di origine animale^[32-34]. Il grasso alimentare aumenta la progressione del cancro e diminuisce il tasso di

sopravvivenza tra i pazienti con il cancro in generale. Pertanto, il differente consumo di grassi alimentari nei vari paesi del mondo può spiegare parzialmente la differente distribuzione dei diversi tipi di cancro, compreso il cancro alle ovaie.

1.1.2 Prevenzione primaria e secondaria

La prevenzione è un insieme di azioni ed interventi attuati con il fine di promuovere e conservare lo stato di salute di un individuo o della collettività ed evitare l'insorgenza di malattie. In relazione alle finalità perseguibili si distinguono diversi livelli di prevenzione, ad esempio quella primaria e secondaria. La prevenzione primaria ha il suo campo d'azione sul soggetto sano e si propone di mantenere le condizioni di benessere e di evitare la comparsa di malattie. In particolare mira al potenziamento dei fattori utili alla salute e all'allontanamento o alla correzione dei fattori causali delle malattie, portando al raggiungimento di uno stato di benessere fisico, psichico e sociale o quanto meno al limitare l'insorgenza di condizioni morbose. L'insieme di questi interventi è pertanto finalizzato a ridurre la probabilità che si verifichi un evento avverso non desiderato, principalmente tenendo sotto controllo i fattori di rischio modificabili. La prevenzione secondaria, invece, interviene su soggetti già ammalati, anche se in uno stadio iniziale. Rappresenta un intervento di secondo livello che mediante la diagnosi precoce di malattie, in

fase asintomatica (programmi di screening), mira ad ottenere la guarigione o comunque limitarne la progressione. Consente l'identificazione di una malattia o di una condizione di particolare rischio seguita da un immediato intervento terapeutico efficace, atto a interromperne o rallentarne il decorso. Lo strumento cardine di questo tipo di prevenzione è lo screening ovvero esami condotti su una fascia più o meno ampia della popolazione allo scopo di individuare una malattia o i suoi precursori (cioè quelle anomalie da cui la malattia si sviluppa) prima che si manifesti attraverso sintomi o segni. In particolare gli screening oncologici servono a individuare precocemente i tumori, o i loro precursori, quando non hanno ancora dato segno di sé. Nella prevenzione secondaria del cancro ovarico uno dei principali obiettivi dei ricercatori, già a partire dagli anni '80, è stato quello di mettere a punto un'efficace strategia di screening per poter ridurre la mortalità della malattia^[20]. Dati raccolti nel trial clinico "Barts Pilot" della metà degli anni '80 hanno suggerito un vantaggio di sopravvivenza nelle donne affette da cancro ovarico nel gruppo sottoposto a screening utilizzando la glicoproteina sierica CA 125 e l'ecografia nelle donne con elevati livelli^[20]. La CA 125 è una glicoproteina prodotta da alcuni carcinomi ovarici, che può essere riconosciuta grazie a un anticorpo monoclonale. Il solo aumento della CA 125 è ritenuto insufficientemente predittivo dello sviluppo o presenza di un

carcinoma ovarico in quanto possono essere riscontrati elevati livelli anche in altri disturbi come nel caso di endometriosi. Nei programmi di screening la CA 125 viene utilizzata in associazione all'ecografia pelvica, la quale consiste nella definizione e descrizione morfologica delle ovaie grazie all'utilizzo di apparecchiature a ultrasuoni. L'ecografia può essere eseguita per via transaddominale o per via transvaginale e quest'ultima offre una migliore definizione della morfologia ovarica e non richiede il riempimento della vescica. L'ausilio del color Doppler in associazione con l'esame ultrasonografico permette di identificare tracce di neoangiogenesi nonché di caratterizzarne il flusso ematico facilitando la distinzione tra masse ovariche benigne e maligne. Un'evidenza emergente riguarda la rilevazione nel sangue delle mutazioni di TP53^[35], fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare e ricopre la funzione di soppressore tumorale, e apre le possibilità di utilizzare il DNA del tumore come un più specifico test di screening per i tumori sierosi di alto grado. Cancer-SEEK è un test multi-analita che combina mutazioni del fattore TP53 e otto biomarcatori tra cui CA 125; recentemente è stato affermato che questo test ha un'elevata specificità e sensibilità nella rilevazione del cancro ovarico del 98%^[36]. Le raccomandazioni per lo screening delle donne ad alto rischio differiscono tra i vari Paesi: da nessuno screening a screening due volte l'anno, utilizzando CA 125 e l'ecografia

transvaginale^[20]. L'altra tipologia di prevenzione è quella primaria e include sia strategie chirurgiche che non chirurgiche. Un esempio di strategia chirurgica è la legatura delle tube di Falloppio, un metodo contraccettivo chirurgico che porta a sterilizzazione tendenzialmente permanente. Si ritiene che le tube di Falloppio siano l'origine del sottotipo più comune di cancro ovarico e che siano responsabili del trasporto di agenti cancerogeni alle ovaie, per queste motivazioni si ipotizza la riduzione del rischio di cancro ovarico in donne che si sottopongono a questa tecnica chirurgica^[37-41]. Ipotesi confermata da una meta-analisi composta da 13 casi di controllo dove è stata riportata una riduzione del 34% del rischio di cancro ovarico in seguito alla legatura delle tube^[40]. Questo effetto protettivo della chiusura delle tube varia molto in relazione all'istotipo di cancro ovarico che si sta analizzando. Gli approcci non chirurgici per prevenire il cancro ovarico includono: in primo luogo strategie riproduttive come l'utilizzo dei contraccettivi orali^[42-45], la parità^[46,47] e infine anche l'allattamento al seno^[48-51]. In secondo luogo si deve cercare di ridurre lo stato infiammatorio caratteristico delle neoplasie con l'utilizzo di farmaci (es: FANS)^[52-57], introducendo un'alimentazione sana^[58-61] e prediligendo una vita attiva^[62,63] ad uno stile di vita sedentario (Fig. 2).

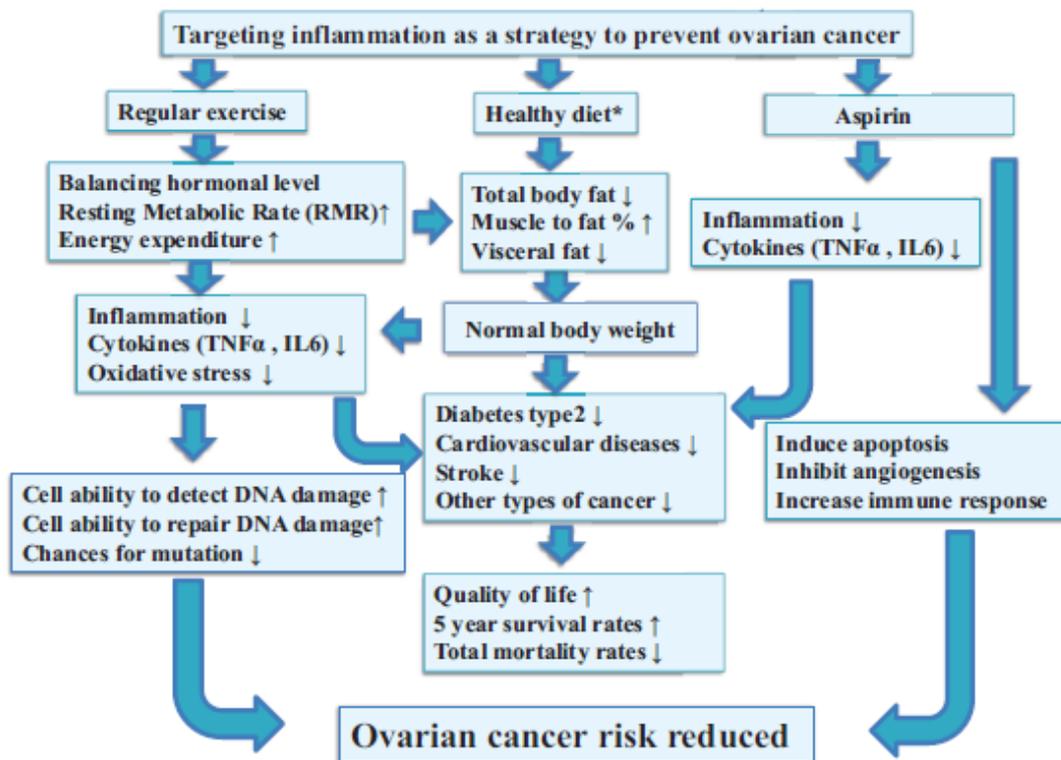


Figura 2. Meccanismo che descrive l’impatto dell’infiammazione sul rischio di cancro ovarico. La dieta sana è una dieta che contiene frutta, verdura, fibre per garantire l’esistenza di quantità adeguate di vitamine, flavonoidi e carotenoidi che hanno proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. Mirare all’infiammazione usando l’aspirina, il consumo regolare di una dieta sana e un quotidiano esercizio fisico possono causare una significativa riduzione del rischio di cancro ovarico. L’aspirina riduce le citochine, l’infiammazione e aumenta la risposta immunitaria, che sono degli eventi a favore della diminuzione del rischio di cancro ovarico, ma anche del diabete di tipo 2, dei CVD e dell’ ictus. A livello cellulare, l’aspirina inibisce l’angiogenesi e

incoraggia l'apoptosi nelle cellule tumorali. L'esercizio fisico regolare aiuta a bilanciare i livelli ormonali, aumenta il dispendio energetico e aumenta il tasso metabolico a riposo (RMR). Di conseguenza le citochine e l'infiammazione diminuiranno in modo significativo e con l'aiuto di una dieta sana si otterrà una diminuzione significativa del grasso corporeo, compreso quello viscerale. La combinazione di questi approcci non è solo associata a una maggiore riduzione del rischio, ma anche a un aumento della qualità della vita (tratto da Aus Tarip Ali, 2018).

Rivolgendo l'attenzione sullo stile di vita da adottare e le buone norme da seguire per prevenire il cancro ovarico, un primo aspetto da esaminare è quello relativo al drastico cambiamento dello stile di vita avvenuto nella società odierna. I paesi sviluppati hanno portato prosperità, ma con aumenti significativi dell'apporto calorico, del consumo di grassi nella dieta e di inattività fisica. Inoltre, le diete occidentalizzate hanno un basso contenuto di fibre con meno frutta e verdura rispetto alle diete nei paesi in via di sviluppo. Persone che includono frutta e verdura nella loro dieta sono meno inclini a sviluppare cancro rispetto alla popolazione generale^[64]. Come già detto precedentemente, è stato dimostrato che il consumo di grassi nella dieta aumenta il rischio di cancro ovarico^[65,66]. Infatti nello studio "Women's

Health Initiative”, è stata associata una riduzione dei grassi alimentari con una diminuzione del 40% del rischio di cancro ovarico^[67]. Al contrario, le popolazioni mediterranee sono meno soggette al cancro in generale rispetto alle popolazioni degli Stati Uniti d’America, nonostante il loro elevato apporto giornaliero di grassi (come l’olio di oliva), suggerendo un ruolo importante del tipo di acido grasso consumato (acido oleico nel caso dell’olio di oliva). La dieta mediterranea include frutta e verdura, olio d’oliva ed elevate quantità di acidi grassi essenziali (EFA), grassi monoinsaturi (MUFA), fibre, antiossidanti e vitamine che sono stati dimostrati essere associati ad un minor rischio di cancro ovarico^[68,69] e del cancro in generale^[69,70]. Inoltre, frutta e verdura contengono un’elevata quantità di micronutrienti, come le vitamine A, C e d E, i flavonoidi e i carotenoidi che hanno proprietà antitumorali^[71]. Tra i vari alimenti ricchi di questi micronutrienti ad azione anti-ossidante troviamo anche la fragola.

1.2 La fragola

Il consumo regolare di frutta e verdura ricche di antiossidanti e composti bioattivi ha dimostrato esercitare, oltre ai benefici per la salute, un ruolo centrale nella prevenzione di molte malattie come vari tipi di cancro (compreso il cancro ovarico), disturbi cardiovascolari, l’obesità e altre patologie degenerative. Recentemente, una grande attenzione è stata

focalizzata sui frutti che mostrano di per sé un elevato valore nutritivo. Ad esempio i piccoli frutti a bacca rossa (berries) della famiglia di Rosacee (Rubus e Fragaria) sono frutti ricchi sia di composti nutritivi come i minerali, le vitamine e le fibre alimentari sia di sostanze non nutritive ed in particolare di composti fitochimici come i polifenoli (acidi fenolici flavonoidi, tannini e lignani); rappresentano alimenti particolarmente ricchi di composti antiossidanti, come riportato in precedenza da numerosi studi^[72]. Inoltre, i piccoli frutti rossi potrebbero fornire un contributo importante per l'assunzione di frutta fresca per tutti quei paesi in cui, come dichiarato dall'OMS, vi è una limitata disponibilità di frutta e verdura, come accade per quelli situati alle latitudini settentrionali. Ad esempio, nella dieta norvegese i piccoli frutti rappresentano il 21.7% del totale di antiossidanti vegetali alimentari, con fragole, ribes e mirtillo fra i più importanti^[72]. La fragola (*Fragaria x ananassa*) è senza dubbio uno dei piccoli frutti più studiati dal punto di vista genomico, agronomico e nutrizionale, e sicuramente uno dei più diffusi sul mercato sia come prodotto fresco che trasformato (marmellate, succhi, gelatine). L'elevato valore nutrizionale della fragola è stato ampiamente dimostrato^[73] e correlato al considerevole contenuto di micronutrienti e di costituenti fitochimici, la maggior parte dei quali esprimono importanti proprietà antiossidanti.

1.2.1 Nutrienti della fragola

I composti nutrienti e fitochimici presenti nella fragola determinano il suo profilo nutrizionale (Tabella 1) conferendole diverse proprietà nutraceutiche; la quantità e la qualità di queste numerose sostanze influenzano la qualità nutrizionale (QN) del frutto e il suo effetto preventivo nei confronti di numerose patologie croniche^[74].

Tabella 1. Composizione nutrizionale delle fragole fresche (Giampieri et al., 2012c).

<i>Tipologia</i>	<i>Nutriente</i>	<i>Quantità per 100g frutto</i>
	Energia (kcal)	32
	Acqua (g)	90.95
	Ceneri (g)	0.4
<u>Macroelementi</u>	Proteine (g)	0.67
	Lipidi totali (g)	0.30
	Carboidrati (g)	7.68
	Fibre alimentari (g)	2.0
	Zuccheri (g)	4.89
	Saccarosio (g)	0.47
	Glucosio (g)	1.99
	Fruttosio (g)	2.44
<u>Minerali</u>	Calcio (mg)	16
	Ferro (mg)	0.41
	Magnesio (mg)	13
	Fosforo (mg)	24

	Potassio (mg)	153
	Sodio (mg)	1
	Zinco (mg)	0.14
	Rame (mg)	0.048
	Manganese (mg)	0.386
	Selenio (µg)	0.4
<u>Vitamine</u>	Vitamina C (mg)	58.8
	Tiamina (mg)	0.024
	Riboflavina (mg)	0.022
	Niacina (mg)	0.386
	Acido pantotenico (mg)	0.125
	Vitamina B6 (mg)	0.047
	Folato (µg)	24
	Colina (mg)	5.7
	Betaina (mg)	0.2
	Vitamina B12(µg)	0
	Vitamina A, RAE (µg)	1
	Luteina + zeaxantina (µg)	26
	Vitamina E, α-tocoferolo	0.29
	β-tocoferolo (mg)	0.01
	γ-tocoferolo (mg)	0.08
	δ-tocoferolo(mg)	0.01
	Vitamina K, fillochinone (µg)	2.2

Innanzitutto, il contenuto di fibre vegetali (2.4 g/100 g) esercita una serie di azioni positive sulla salute: il loro effetto saziante, oltre che contribuire alla riduzione dell'apporto calorico nella dieta, permette anche la regolazione dell'indice glicemico, rallentando la velocità di digestione. Questo effetto di

riduzione della glicemia è ulteriormente accentuato dall'elevata concentrazione di fruttosio (> del 50% degli zuccheri totali). In misura minore, le fragole sono una fonte naturale di acidi grassi essenziali, ed in particolare i semi sono ricchi di acidi grassi insaturi (dei quali oltre il 95% è rappresentato dai monoinsaturi o MUFA). L'elevato contenuto di vitamina C rende la fragola una delle principali fonti alimentari di questo composto e la rendono particolarmente rilevante dal punto di vista nutrizionale (Fig.3).

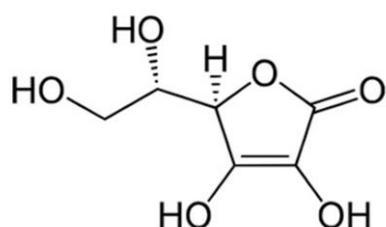


Figura 3. Struttura chimica della vitamina C

La presenza di vitamina C è un fattore determinante nella valutazione della QN del frutto, date le sue molteplici funzioni biologiche. In primo luogo, è un antiossidante altamente reattivo ed efficace, che agisce sia direttamente che indirettamente da scavenger dei ROS attraverso reazioni enzimatiche e non enzimatiche. Anche in piccole quantità svolge un ruolo importante nel proteggere le biomolecole essenziali (proteine, lipidi, carboidrati, DNA e RNA) dai danni generati dai ROS durante il normale metabolismo, così come in condizioni patologiche e/o in presenza di tossine e inquinanti (come il fumo). In secondo luogo, la vitamina C è richiesta anche come cofattore

essenziale per la sintesi del collagene, degli ormoni, della noradrenalina e di piccole molecole intracellulari come carnitina, e sembra favorire la funzionalità del sistema immunitario. Oltre alla presenza di vitamina C, anche l'alta concentrazione di folati (Fig.4) (20-25 $\mu\text{g}/100$ g di peso secco, una delle più alte concentrazioni registrate tra i frutti) assume un ruolo predominante nella definizione della QN.

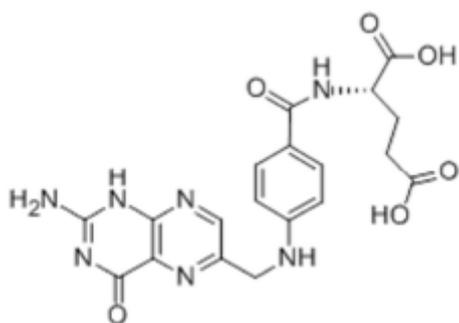


Figura 4. Struttura chimica della molecola di un folato

I folati risultano essere un micronutriente essenziale in una serie di processi biologici, come la sintesi degli acidi nucleici e la rimetilazione dell'omocisteina in metionina, e un adeguato apporto alimentare di folati svolge un ruolo cruciale nella promozione della salute e nella prevenzione delle malattie associate alla loro carenza, come l'anemia megaloblastica ed alcuni tipi di cancro. L'importanza della fragola come fonte naturale di folati, però, è stata riconosciuta solamente di recente^[75]. Nonostante l'attenzione sia rivolta soprattutto ai potenziali effetti benefici di questi due abbondanti composti, nella fragola sono presenti in misura minore altre vitamine, come la

tiamina (B1), la riboflavina (B2), la niacina (B3), la vitamina B6, la vitamina K, la vitamina A e la vitamina E. La fragola inoltre è una fonte eccellente di microelementi, in particolare manganese e potassio e presenta anche una discreta quantità di iodio, magnesio, ferro e fosforo.

1.2.2 I polifenoli

I polifenoli comprendono un gruppo eterogeneo di metaboliti secondari abbondanti nelle piante, dove svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della crescita, del metabolismo, della protezione dai raggi UV e da vari agenti patogeni. Sono stati identificati più di 8000 composti polifenolici in varie specie di piante. La ricerca sta cercando di indagare riguardo al loro potenziale benefico sulla salute, compresa la protezione contro lo stress ossidativo, le malattie cardiovascolari, il diabete, l'asma, le malattie neurodegenerative e persino l'invecchiamento^[76]. Un particolare interesse per i composti bioattivi di queste piante è stato determinato dalla ricerca di nuovi agenti chemiopreventivi più efficaci e meno tossici delle terapie convenzionali. Come tale, questo gruppo di sostanze è studiato per le proprietà anticancerogene, come la modulazione della proliferazione cellulare, la crescita del tumore, l'angiogenesi, le metastasi, l'infiammazione e il meccanismo di apoptosi^[77,78]. I polifenoli sono classificati in base al numero di anelli fenolici e degli elementi strutturali che legano questi anelli l'uno

all'altro. I gruppi includono: acidi fenolici, stilbeni, lignani, flavonoidi e un gruppo non classificato che comprende i tannini e i curcuminoidi. I flavonoidi, che hanno proprietà sia antiossidanti che antinfiammatorie, si trovano nella frutta, nella verdura, nei legumi, nel vino rosso e nel tè verde. Sono suddivisi in sei classi: flavonoli, flavoni, isoflavoni, flavanoni, antocianine e flavanoli (catechine e proantocianidine)^[79].

1.2.3 Polifenoli della fragola

I polifenoli maggiormente presenti nella fragola sono i flavonoidi (principalmente antocianine, in secondo luogo flavonoli e flavanoli), seguiti dai tannini idrolizzabili (ellagitannini e gallotannini) e da costituenti minori come gli acidi fenolici (acido idrossibenzoico e idrossicinnamico) e i tannini condensati (proantocianidine) (Fig. 5).

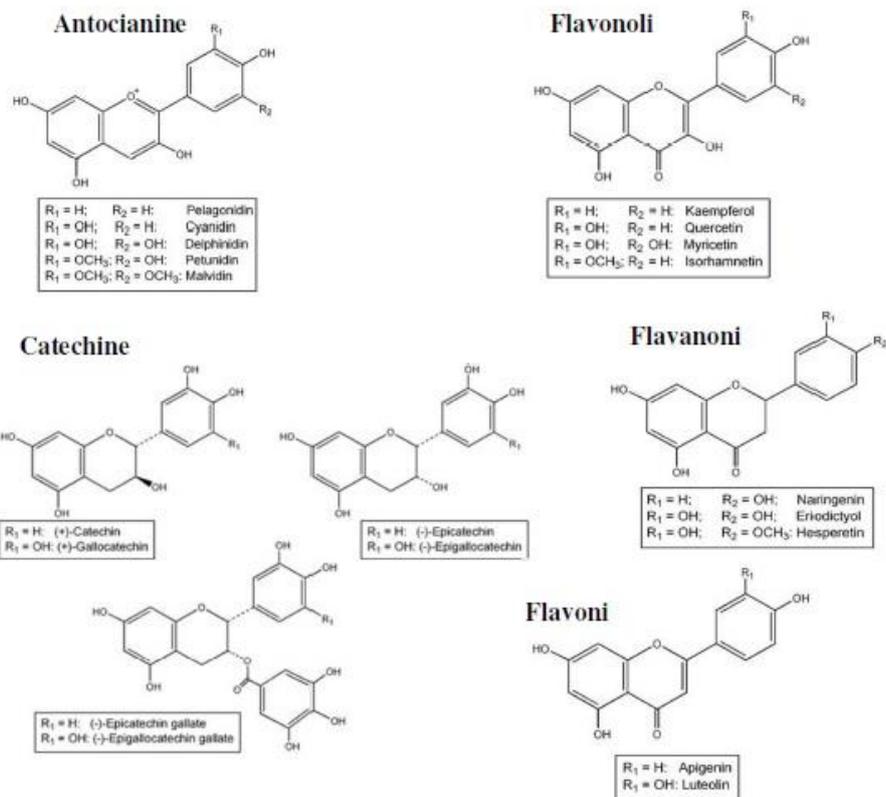


Figura 5. Principali polifenoli presenti nella fragola

1.2.3.1 Antocianine

Le antocianine sono i composti fenolici delle fragole più abbondanti e maggiormente conosciuti^[80]: fino ad oggi, sono stati descritti più di 25 tipi diversi di antocianine da numerose varietà e selezioni^[81]. Le principali antocianine presenti nella fragola sono la pelargonidina-3-glucoside (Pg 3-glu) e, in misura minore, la cianidina-3-glucoside (Cy 3-glu)^[82].

1.2.3.2 Ellagitannini

Gli ellagitannini (ETs), insieme con le antocianine, rappresentano i composti fenolici più abbondanti nelle fragole^[83]. Dal punto di vista chimico, gli ETs sono esteri dell'acido esaidrossidifenico e del glucosio, e si possono presentare in diverse strutture, come monomeri (ad esempio glicosidi dell'acido ellagico), come oligomeri (il sanguin H-6, l'ET più comune nella fragola) e come polimeri complessi. Gli ETs, insieme ai gallotannini, costituiscono il gruppo dei tannini idrolizzabili; questi, in seguito a reazione di idrolisi, rilasciano acido ellagico permettendo la formazione di diversi metaboliti. Per quanto riguarda le fragole, alcuni studi hanno riportato che il contenuto di ETs si aggira tra 25 e 59 mg/100 g di frutta fresca.

1.2.3.3 Altre sostanze polifenoliche

Oltre ai composti già citati, la fragola contiene anche altre sostanze polifenoliche come i flavonoli^[84] che derivano dal caempferolo e, soprattutto, dalla quercetina. I flavanoli sono l'unica classe di flavonoidi che in natura non si presentano nella forma glicosilata. Nelle fragole, è possibile trovarli in forma monomerica (catechine) o polimerica, come tannini condensati o procianidine. Queste ultime sono state spesso individuate nella polpa e negli acheni del frutto, anche se in modeste quantità. Possiedono numerose attività

fisiologiche come proprietà antiossidanti (sia dirette che indirette), antimicrobiche, anti-allergiche, anti-ipertensive e inibitorie nei confronti dell'attività di alcuni enzimi e recettori^[85]. Infine, nelle fragole è possibile trovare una serie di acidi fenolici derivati dall'acido idrossicinnamico (HCA, come l'acido caffeico) e dall'acido idrossibenzoico (HBA, come l'acido gallico).

1.2.4 Capacità antiossidante della fragola

La capacità antiossidante dei frutti a bacca rossa è un indicatore della presenza di sostanze bioattive, responsabili del potenziale effetto benefico per la salute e della prevenzione di patologie come le malattie degenerative, l'obesità, il cancro in generale (compreso quello ovarico). Il valore della capacità anti-ossidante è strettamente correlato alla presenza di sostanze, come la vitamina C e i composti fenolici, dalla spiccata attività di scavenging radicalico nei confronti dei ROS. Sono state pubblicate da diversi autori delle liste indicanti i valori di Capacità Antiossidante Totale (TAC)^[86] e i berries si posizionano tra le fonti alimentari con i più alti valori di fenoli totali e di TAC (fino a 4 volte più elevati rispetto ad altri frutti, 10 volte più delle verdure e addirittura 40 volte più dei cereali)^[72]. In particolare, le fragole hanno una capacità antiossidante molto maggiore (da 2 a 11 volte) rispetto a mele, pesche, pere, uva, pomodori, arance o kiwi. Un aspetto di fondamentale

importanza da tenere in considerazione nella determinazione della TAC di un frutto è il contributo che ogni singolo composto fitochimico è in grado di apportare. In uno studio^[87] è stato dimostrato che la vitamina C è uno dei principali antiossidanti presenti nella fragola ed è responsabile da sola per più del 30% della TAC degli estratti analizzati, seguita dalle antocianine (che contribuiscono per il 25-40% alla TAC) e infine da altri composti come i derivati dell'acido ellagico e i flavonoli. Quanto appena esposto dimostra che la TAC della fragola è fortemente correlata al contenuto totale di vitamina C e di sostanze fenoliche, in particolare di antocianine ed ET, che agiscono in maniera sinergica nel contrastare i radicali liberi.

1.2.5 Possibile ruolo della fragola nella prevenzione del cancro

L'attività biologica dei frutti e in particolare dei piccoli frutti rossi è stata a lungo studiata tramite modelli *in vitro* e *in vivo*^[72,73,87-93], ma in letteratura si trovano ancora pochi studi che hanno trattato in maniera specifica l'attività biologica delle fragole. Alcuni possibili effetti benefici riguardano la prevenzione dalle infiammazioni, dallo stress ossidativo, dalle malattie cardiovascolari (CVD) e neurodegenerative, da alcuni tipi di tumori, dal diabete di tipo 2 e dall'obesità. I polifenoli hanno delle proprietà che vanno oltre al processo di antiossidazione come ad esempio la capacità di modulare la segnalazione cellulare; questo offre una visione interessante sulle loro

potenziali proprietà antitumorali. Infatti negli ultimi anni^[94], la capacità antiossidante dei polifenoli è stata presa in considerazione come uno dei meccanismi d'azione nell'inibizione della mutagenesi e dell'iniziazione del cancro, grazie alla loro capacità di eliminare i ROS, attivare enzimi antiossidanti, prevenire la formazione indotta dal DNA di agenti cancerogeni, migliorare la riparazione del DNA e ridurre il danno ossidativo del DNA (Fig. 6).

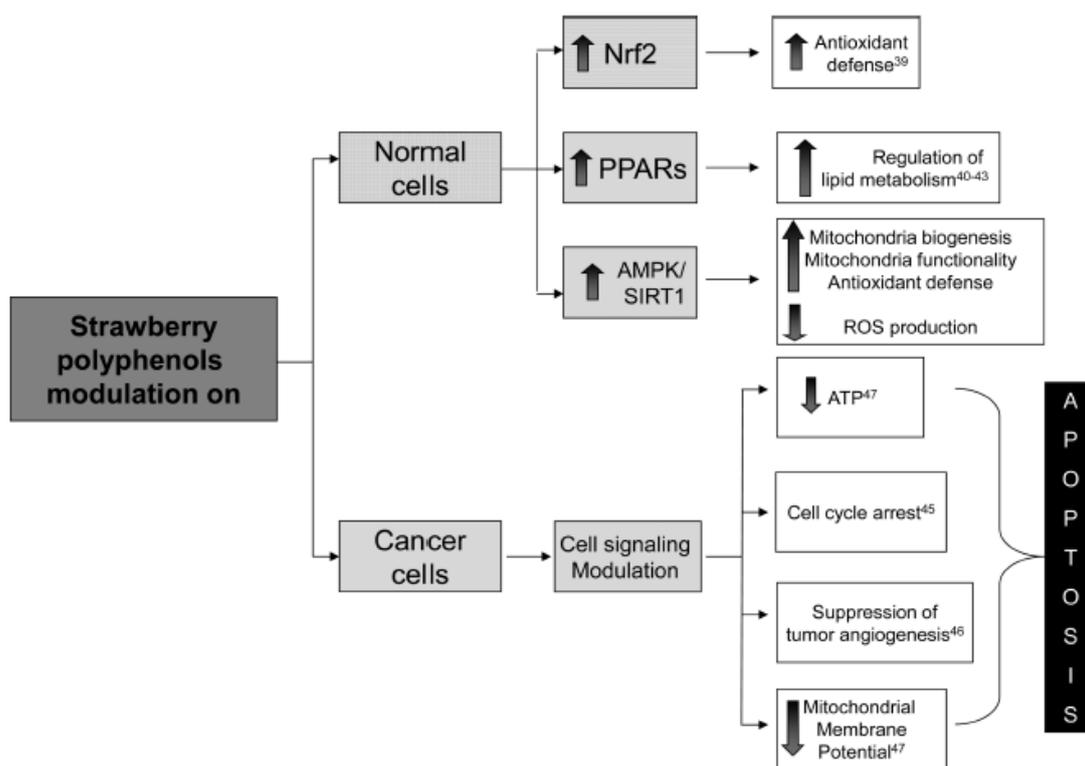


Figura 6. Meccanismi proposti per la modulazione dei polifenoli della fragola su cellule normali e cancerose. Abbreviazioni: Nrf2, fattore nucleare-eritroide 2- fattore correlato 2; PPAR, recettori attivati dal proliferatore del

perossisoma; AMPK, proteina chinasi attivata da 5'-adenosina monofosfato; Sirt1; ROS, specie reattive dell'ossigeno; ATP, adenosina trifosfato (Giampieri et al., 2014).

Diversi studi recenti hanno però supportato la funzione dei polifenoli, come modulatori dei processi cellulari, collegata alla crescita del cancro: prove *in vitro* e *in vivo* indicano infatti che i fenoli possono modulare la segnalazione cellulare nella cellula cancerosa inibendo ad esempio la proliferazione di queste cellule attraverso la demetilazione dei geni oncosoppressori, che inducono l'arresto del ciclo cellulare^[95], l'apoptosi^[95] e la soppressione dell'angiogenesi tumorale^[96]. I polifenoli, studiati per i loro effetti antitumorali, intervengono in meccanismi distinti di segnalazione e questo rimarca l'urgenza di effettuare ulteriori ricerche per evidenziare i percorsi coinvolti negli effetti antitumorali delle fragole e a caratterizzano i composti bioattivi.

1.3 Scopo dello studio

Questo studio, finanziato dal progetto strategico di Ateneo 2017-2020 presso l'Università Politecnica delle Marche, si propone di indagare il profilo dei composti bioattivi della fragola "Romina" e gli effetti anti-cancerogeni di questi componenti bioattivi sulle cellule del cancro ovarico osservando il

tasso di apoptosi, l'accumulo di specie reattive, la migrazione cellulare, la fosforilazione ossidativa e la capacità glicolitica delle cellule tumorali dopo essere state trattate con estratti di fragole. Questo progetto di ricerca contribuirebbe a delucidare le basi molecolari degli effetti anti-cancerogeni delle fragole con l'intento di creare potenziali interventi dietetici a base di bacche e/o prodotti alimentari innovativi e naturali.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Valutazione caratteristiche nutrizionali e fitochimiche cultivar Romina

2.1.1 Raccolta e trattamento dei campioni

La fragola Romina è stata scelta come cultivar per il presente progetto di ricerca; è una nuova varietà rilasciata nel 2011 da un programma di incrocio genetico presso l'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM, Ancona, Italia). Questa bacca possiede delle caratteristiche ben definite: un'elevata adattabilità a terreni non fumigati, frutti di forma conica o biconica a maturazione molto precoce, sapore molto buono e dolce, buon contenuto di zuccheri, bassa acidità ed è indicata per produzioni a basso impatto. L'elevata consistenza e conservabilità la rende un frutto idoneo per la commercializzazione nella grande distribuzione. Gli studi effettuati ne hanno evidenziato anche elevate caratteristiche nutrizionali, in particolare un elevato

contenuto di vitamina C e di folati. I frutti sono stati raccolti a mano da tre piante coltivate nel campo sperimentale per il miglioramento genetico presso l' Azienda Agraria Didattico Sperimentale "P. Rosati "di Agugliano (Ancona, Italia).

Per la caratterizzazione nutrizionale e fitochimica, l'estratto metanolico di fragola è stato ottenuto come precedentemente descritto dal nostro gruppo^[98]; in breve, 50 g di frutti sono stati aggiunti a 100 ml della soluzione di estrazione, costituita da metanolo/Milli-Q (Merck, Milano, Italia) e acqua/acido formico concentrato e sono stati omogeneizzati utilizzando un omogeneizzatore Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Germania). L' estrazione è stata massimizzata agitando la sospensione a 22g (ARE Magnetic agitatore, VELP Scientifica, Usmate, Italia) per 2 ore al buio a temperatura ambiente. La miscela è stata quindi centrifugata a 2400g per 15 min per due volte, per far sedimentare la componente solida. Il surnatante è stato filtrato attraverso un filtro Minisart da 0,45 µm (PBI International, Milano, Italia) e trasferito in un bicchiere ambrato. Infine, l'estratto metanolico è stato concentrato ed essiccato mediante evaporatore rotante. Il campione finale è stato conservato in aliquote a -80 ° C. Per le analisi HPLC-MS, l' estrazione di antociani è stata eseguita come descritto in precedenza^[91]. Le fragole congelate (50 g) sono state

omogeneizzate in metanolo contenente lo 0,1% HCl, mantenuto per una notte (~ 14 h) a 3-5 ° C e successivamente filtrato sotto vuoto attraverso un imbuto Büchner. Il prodotto solido è stato lavato con metanolo; i filtrati ottenuti sono stati centrifugati (4000 x g per 15 min a 21 ° C) e ulteriormente sottoposti allo stesso processo per il numero di volte necessario per completare l'estrazione del colore. Per rimuovere le sostanze liposolubili, l'estratto acquoso ottenuto è stato lavato con n-esano e quindi un'aliquota (2 ml) della fase acquosa è stata accuratamente depositata su una cartuccia C-18 SepPaks Vac 6cc (Waters). Gli zuccheri e le sostanze più polari sono stati rimossi con 15 ml di acqua ultrapura e i pigmenti di antociani sono stati ulteriormente eluiti con 5 ml di metanolo:acido trifluoroacetico allo 0,1% (95:5). L'estratto metanolico è stato concentrato in un evaporatore rotante a temperatura <30 ° C, previa aggiunta di acqua. L'estratto acquoso è stato raccolto, il suo volume portato a 2 ml con acqua ultrapura e filtrato attraverso un filtro Minisart da 45 µm (PBI International, Milano, Italia) per l'analisi HPLC.

2.1.2 Determinazione della capacità antiossidante totale (TAC)

Il metodo utilizzato per determinare la capacità antiossidante totale dell'estratto di fragola Romina è la TEAC, realizzato secondo il metodo modificato da Re e collaboratori^[97]. Questo metodo si basa sulla capacità dei composti bioattivi antiossidanti di smorzare il radicale cationico (ABTS^{•+})

derivante dall'acido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), e ridurre questo radicale, che possiede il massimo di assorbimento nell'intervallo del visibile a 734 nm (Fig. 7) , nella forma neutra incolore.

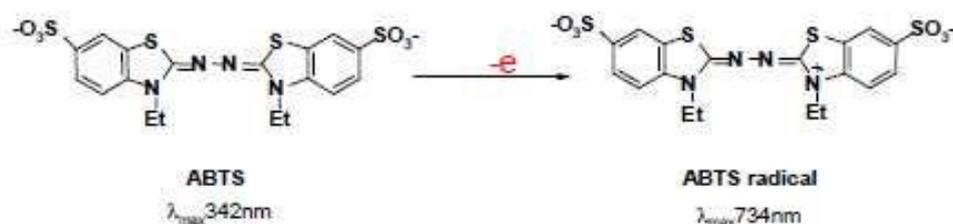


Figura 7. Reazione di radicalizzazione dell'ABTS.

Quando campioni biologici o chimici, contenenti specie antiossidanti, reagiscono con $\text{ABTS}^{\cdot+}$, eliminano il radicale, determinando un'inibizione dell'assorbanza. L' $\text{ABTS}^{\cdot+}$ è stato ottenuto facendo reagire 7 mM di soluzione madre ABTS con 2,45 mM di persolfato di potassio e mantenuto al buio per 12 ore prima dell'utilizzo. In questa forma l' $\text{ABTS}^{\cdot+}$ è stabile per almeno due giorni, se opportunamente conservato a 25 ° C e al buio. Subito prima dell'analisi, 1 ml di soluzione radicalica $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (opportunamente diluita 1:50 con tampone PBS a pH 7,4) è stato aggiunto a 10 μl di reagente, ovvero: (1) etanolo per il controllo della curva standard, (2) soluzione di Trolox per la curva standard^[97, 98], (3) metanolo:acqua 80:20 per il controllo degli estratti di fragola o (4) estratto metanolico di fragola per l'analisi. Il bianco utilizzato per tarare lo spettrofotometro consisteva in acqua milliQ. Dopo questo passaggio,

la soluzione di analisi è stata agitata su vortex per 20 secondi e dopo 1-3 minuti il valore di assorbanza letta nello spettrofotometro a 734 nm. La % di inibizione del colore è stata calcolata seguendo questa formula:

$$\% \text{ inibizione}_{734\text{nm}} = [(\text{controllo Abs}_{734\text{nm}} - \text{campione Abs}_{734\text{nm}}) / \text{controllo Abs}_{734\text{nm}}] \times 100$$

Il valore TEAC è stato determinato confrontando la % di inibizione del colore con la curva di calibrazione standard ottenuta con il Trolox. I risultati TEAC sono stati espressi come micromoli di equivalenti Trolox per kilogrammo di peso fresco di fragola ($\mu\text{mol TxEq/kg FW}$). I dati sono stati generalmente riportati come valore medio \pm DS di tre repliche.

2.1.3 Determinazione del contenuto fenolico totale (TPH)

Il contenuto fenolico totale dell'estratto di fragola Romina è stato determinato utilizzando il metodo colorimetrico Folin-Ciocalteu, come riportato da Slinkard & Singleton 1977 ^[99]. In breve, 100 μl di acqua milliQ come bianco (al fine di azzerare lo spettrofotometro), o di estratto metanolico di fragola diluiti con acqua o di soluzioni standard di acido gallico (1/10) sono stati aggiunti a 500 μl del reagente Folin-Ciocalteu in precedenza diluito con acqua (1/10) e il tutto tenuto al buio a 4 ° C. La miscela è stata incubata per circa 5 minuti a temperatura ambiente, poi sono stati aggiunti 400 μl di

carbonato di sodio 0,7 M (Na_2CO_3) e la soluzione è stata vortexata bene. Il prodotto finale è stato incubato per 2 ore a temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$) e al buio; infine l'assorbanza specifica è stata letta a 760 nm. Come standard è stata preparata una soluzione metanolo:acqua (80:20, v/v) di acido gallico (GA) 6 mM e conservata a 4°C per al massimo una settimana. Diluizioni standard seriali sono state preparate giornalmente dalla soluzione madre per le quantificazioni e la realizzazione di una curva di calibrazione. Ogni campione è stato analizzato in tre repliche e i risultati finali sono stati espressi come milligrammi di equivalenti di acido gallico per kilogrammo di peso fresco di fragola (mg GAeq/kg FW). I dati sono stati generalmente riportati come valore medio \pm DS.

2.1.4 Determinazione del contenuto dei flavonoidi totali (TFC)

Il contenuto dei flavonoidi totali è stato ottenuto utilizzando un metodo colorimetrico descritto in precedenza^[100,101]. In breve, 250 μl di acqua come bianco, di estratto metanolico di fragola o di soluzione standard di (+) – catechina sono stati miscelati con 1,25 ml di acqua MilliQ, seguito da aggiunta di 75 μl di una soluzione al 5% di nitrato di sodio (NaNO_2). Dopo 6 min sono stati aggiunti alla miscela 150 μl di una soluzione al 10% di cloruro di alluminio esaidrato ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e lo si è fatto riposare per 5 min. Infine sono stati aggiunti 500 μl di idrossido di sodio (NaOH) 1 M, la miscela è stata

portata a 2,5 mL con acqua MilliQ e mescolata bene; l'assorbanza è stata letta immediatamente a 510 nm contro il bianco (utilizzato per azzerare lo spettrofotometro). Per risultati quantitativi, da una soluzione madre metanolo:acqua (80:20, v/v) di (+) – catechina, sono state preparate diluizioni seriali e sono state tracciate le loro concentrazioni note rispetto alla corrispondente assorbanza. Ogni campione è stato analizzato in tre repliche e i risultati finali sono stati espressi come mg di catechine equivalenti per kilogrammo di peso fresco della fragola (mg CEeq/kg FW). I dati sono stati generalmente riportati come valore medio \pm DS.

2.1.5 Determinazione del contenuto totale di antociani (ACY)

Il contenuto totale di ACY degli estratti metanolici di fragola è stato determinata utilizzando un metodo differenziale di pH precedentemente descritto^[102], con alcune modifiche. Il metodo si basa su trasformazioni strutturali reversibili del cromoforo antocianico in funzione del pH: questi cambiamenti compaiono attraverso spettri di assorbanza diversi e quindi possono essere misurati utilizzando la spettroscopia ottica (Fig. 8).

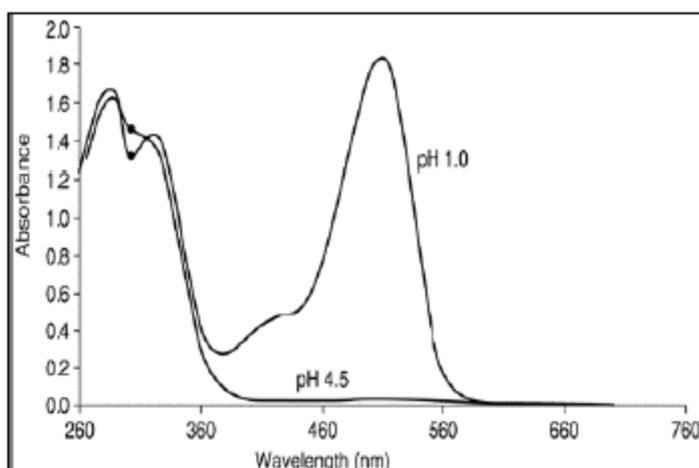


Figura 8. Caratteristiche spettrali degli antociani di ravanello purificati (pelargonidina-3-acilata derivati del sophoroside-5-glucoside) in tamponi pH 1.0 e pH 4.5^[102].

Il metodo del pH differenziale tiene conto solo delle reazioni specifiche degli antociani e consente una misurazione precisa e rapida degli antociani totali, anche in presenza di pigmenti polimerizzati degradati e altri composti interferenti. In breve, sono state preparate diverse soluzioni tampone: tampone 0,025 M di cloruro di potassio (KCl), tampone pH 1,0 e pH 4,5 (tampone 1 e 2, rispettivamente) e tampone acetato di sodio 0,4 M (CH₃CO₂Na). Dopo di che, sono state preparate due diluizioni (1/10 v/v) degli estratti di fragola e delle soluzioni standard, una con tampone 1 e l'altra con tampone 2. Queste diluizioni sono state lasciate riposare per 15 min prima della misurazione dell'assorbanza di ciascun estratto a 500 nm e a 700 nm,

contro il bianco rappresentato da acqua milliQ (utilizzato per azzerare lo spettrofotometro). L'assorbanza finale dei campioni diluiti è stata calcolata come segue:

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{500\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}}) \text{ pH } 1.0 - (\text{Abs}_{500\text{nm}} - \text{Abs}_{700\text{nm}}) \text{ pH } 4.5$$

Una soluzione stock di Pelargonidina-3-glucoside (Pg-3-glc) (pH = 4) è stata utilizzata come standard ed è stata preparata diluendo 0,002 g di Pg-3-glc in 10 ml di metanolo:acqua 80:20, v/v (0,2 mg/ml). I valori di assorbanza sono stati convertiti in un valore di concentrazione tramite una curva di calibrazione, ottenuta tracciando le concentrazioni note delle diluizioni seriali di Pg-3-glc rispetto all'assorbanza corrispondente calcolata. Ogni campione è stato analizzato in otto repliche e i risultati finali sono stati espressi come milligrammi di equivalenti Pg-3-glc per kilogrammo di peso fresco di fragola (mg pel-3-glu/kg FW). I dati sono stati riportati come valore medio \pm DS.

2.1.6 Identificazione e quantificazione degli antociani (HPLC-DAD-MS)

L'analisi della composizione e della quantificazione dei singoli antociani presenti nell'estratto di fragola è stata eseguita tramite una doppia rilevazione, mediante cromatografia liquida ad alta pressione collegata alla spettrometria di massa, come precedentemente descritto^[106-108]. Per la separazione cromatografica è stato utilizzato un HPLC (Hewlett-Packard 1100, Series

Instrument) dotato di una pompa quaternaria (HP G1312A), un degasser (HP G1322A), un iniettore automatico (HP G1313A), un sistema di termostatazione di colonna e un sistema rilevatore di diodi integrato (HP G1315A), dotato di una cella di flusso ad alta pressione collegato ad uno spettrometro di massa. Il sistema è stato accoppiato ad una stazione di controllo e di elaborazione di dati Hewlett-Packard HP Chemstation (Rev. A.05.04) per cromatografia liquida. Come fase stazionaria è stata utilizzata una colonna AQUA[®] C18 (Phenomenex, Torrance, CA) (150 mm × 4.6 mm; 5 µm di dimensione dei pori), termostatata a 35 °C. I solventi utilizzati sono stati: (A) 0,1% acido trifluoroacetico in acqua, e (B) acetonitrile, con il seguente gradiente: isocratico 10% B per 5 minuti, 10-15% B per 15 minuti, isocratico 15% B per 5 min, 15-18% B oltre 5 minuti, e 18-35% B oltre 20 minuti, utilizzando un flusso di 0.5 ml/min. L'analisi di spettrometria di massa è stata effettuata su uno spettrometro LCQ (Thermoquest, San José, USA) dotato di una sorgente di ionizzazione a pressione atmosferica (API), utilizzando un' interfaccia di ionizzazione per electrospray (ESI) e un rivelatore a trappola ionica, collegato ad una stazione di trattamento dati XcaliburTM (versione 1.2). Come gas ausiliario è stato utilizzato azoto, ad un flusso di 1.2 L/min. Gli spettri di massa sono stati registrati in modalità sia "ion positiva" che "negativa" nell'intervallo di m/z compreso tra 100 e 800. Il

rivelatore è stato programmato per eseguire una serie di tre scansioni consecutive, la prima in modalità full scan, la seconda MS2 e la terza MS3. Inoltre, lo strumento è stato programmato con il metodo di “esclusione dinamico”, ossia dopo che lo ione molecolare più abbondante viene frammentato per tre volte, vengono selezionati gli ioni molecolari successivi, secondo la loro abbondanza. Gli antociani nella fragola sono stati quantificati dalle aree dei picchi cromatografici registrati a 520 nm per confronto con le curve di calibrazione ottenute con standard esterni di Cy-3-glucoside (per gli antociani derivati dalla cianidina) e di Pg-3-glucoside (per gli antociani derivati dalla pelargonidina). Gli estratti di fragola sono stati analizzati in triplicato e i risultati espressi come mg di antociani/100g di frutto fresco (mg/100g FW).

2.1.7 Determinazione del contenuto di Vitamina C

Il contenuto di vitamina C (acido ascorbico) è stato valutato come indicato da Helsper e collaboratori^[109]. Gli estratti di fragola sono stati iniettati nel sistema HPLC immediatamente dopo la procedura di estrazione-sonicazione. L'apparecchiatura HPLC comprendeva un controller Waters 600, un Waters 996 Rivelatore a serie di fotodiodi (PDA) impostato su assorbanze di 262 e 244 nm e un incubatore a colonna a 30°C. La colonna HPLC utilizzata era una YMC Pack Pro 150x4,6 mm. L'eluizione è stata isocratica con 50 mM di

fosfato di potassio (KH_2PO_4) in acqua MQ, raggiungendo il valore di pH 3,2 (sotto il pK_a dell'acido ascorbico) aggiungendo acido ortofosforico. L'analisi è consistita in una corsa di 10 minuti e alla fine del processo la colonna è stata lavata con acetonitrile al 50%. La Vitamina C è stata eluita a $\text{RT} \approx 5,3$ min. La quantificazione del contenuto di Vitamina C è stata realizzata tramite una curva di calibrazione preparata per eseguire concentrazioni standard di vitamina C in modo simile rispetto agli estratti, e misurata in duplicato all'inizio e alla fine dell'analisi. Ogni campione è stato analizzato in tre repliche e i risultati finali sono stati espressi come mg di vitamina C per 100 grammi di frutto fresco (mg Vit C/100g FW). I dati sono stati generalmente riportati come valore medio \pm DS.

2.2 Studio in vitro

Come modello *in vitro* per saggiare gli effetti degli estratti di fragola Romina è stata scelta la linea cellulare NIH:OVCAR-3, una linea cellulare umana di adenocarcinoma ovarico. Le cellule sono state acquistate dall' America Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) e coltivate in fiasche da 75 cm^2 in DMEM (Dulbecco's Modification of Minimum Essential Medium), arricchito con siero fetale bovino (FBS) al 10%, glutammina 2 mM e piruvato di sodio 1 mM a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO_2 . I terreni e i reagenti per la coltura cellulare sono stati ottenuti da CARLO ERBA

Reagents (Milano, Italia). Le cellule sono state seminate ad una densità di circa 0.5×10^4 cellula/cm² ed il terreno è stato cambiato ogni 2-3 giorni. Raggiunta la confluenza, le cellule sono state dissociate mediante “tripsinizzazione”, cioè mediante l’utilizzo di una soluzione contenente 0.5 mg/ml di tripsina e 0.2 mg/ml di EDTA e quindi poste in opportune piastre (a seconda dell’analisi da effettuare) almeno 24 ore prima dell’ analisi. NIH: OVCAR-3 sono state valutate per la vitalità cellulare, per il tasso di apoptosi, per la migrazione cellulare, per l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno intracellulari (ROS), per la respirazione mitocondriale e la glicolisi.

2.2.1 Vitalità cellulare (test MTT)

Per valutare la potenziale citotossicità dell’estratto di fragola, le cellule NIH:OVCAR-3 sono state incubate con differenti concentrazioni degli estratti, opportunamente concentrati sotto vuoto a 40°C per eliminare il metanolo e sospesi in DMEM per ottenere un ampio range di concentrazione (0-10 mg) e la vitalità è stata determinata mediante il saggio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)^[103]. Questo test permette di stabilire indirettamente il numero di cellule vitali presenti in un campione attraverso una valutazione della loro attività metabolica; esso si avvale dell’ uso dei sali di tetrazolio, in particolare del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT), i quali coloranti vengono ridotti

dalle deidrogenasi mitocondriali NAD-dipendenti a composti di color porpora chiamati formazani (Fig. 9).

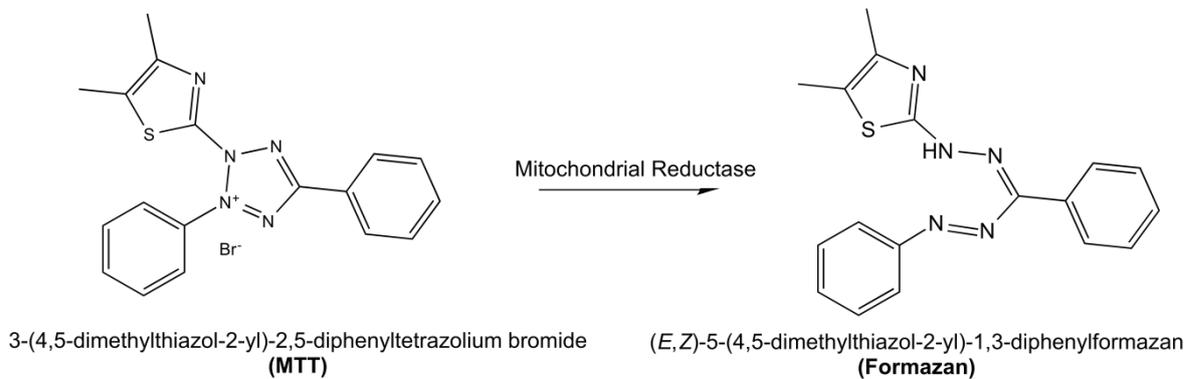


Figura 9. Riduzione mitocondriale di MTT a prodotto di formazano porpora.

Generalmente, le cellule con un metabolismo basso riducono molto poco l'MTT, mentre le cellule che si dividono rapidamente mostrano alti tassi di riduzione di questo sale di tetrazolio. Solo i mitocondri attivi delle cellule vive sono in grado di operare questa trasformazione e, poiché l'assorbanza di questi composti è funzione della loro concentrazione, dai dati ricavati da una lettura spettrofotometrica si può ottenere un'informazione quantitativa e risalire al numero di cellule vitali contenute nel campione. In pratica, l'MTT è stato sciolto in terreno RPMI in modo da ottenere una soluzione con una concentrazione finale di 0.5 mg/ml. I saggi sono stati condotti su cellule di controllo non trattate e su cellule trattate, rispettivamente, con le diverse concentrazioni di estratto di fragola (25µg-10mg), in piastre da 96 pozzetti, ognuno dei quali contenente 5.000 cellule/ml di DMEM a 24, 48 e 72 ore dal

trattamento. Ai pozzetti sono stati poi aggiunti 30 μ l di MTT; le piastre sono state lasciate in incubatore per circa 3/4 ore, al buio, per dare alle cellule il tempo di metabolizzare l'MTT. Trascorso il tempo necessario, a ciascun pozzetto è stato allontanato il terreno e sono stati addizionati 100 μ l di DMSO per solubilizzare i cristalli formati, procedendo quindi alla lettura delle piastre utilizzando una lunghezza d'onda di 595 nm^[103].

2.2.2 Tasso di apoptosi

L'apoptosi è stata misurata utilizzando il kit apoptosi Tali[®] e lo ioduro di propidio (PI), colorante sintetico caratterizzato da una bassa fluorescenza (rosso-arancio) in grado di legarsi selettivamente agli acidi nucleici, come precedentemente riportato^[105]. In breve, il primo giorno del saggio $1,5 \times 10^5$ cellule di adenocarcinoma ovarico sono state seminate in una piastra a 6 pozzetti e lasciate aderire per 18-20 ore. Il giorno dopo la semina, le cellule sono state trattate per 48 ore con l'estratto metanolico di fragola a diverse concentrazioni (7, 10 e 14 μ g/ml). Alla fine di ogni trattamento, le cellule sono state lavate con PBS, tripsinizzate mediante l'utilizzo di una soluzione contenente 0,5 mg/ml di tripsina e 0,2 mg/ml di EDTA e risospese in 100 μ l di tampone legante l'annessina (ABB). Successivamente, è stata aggiunta l'Annexin V Alexa Fluor[®] 488 (Thermo Fisher Scientific, Foster, CA) e la soluzione è stata incubata al buio a temperatura ambiente per 20 minuti.

Quindi, le cellule sono state centrifugate a 1000 rpm per 10 minuti, risospese in 100µl in ABB, ed è stato aggiunto 1µl di ioduro di propidio e incubato al buio a temperatura ambiente per 5 minuti. I campioni sono stati analizzati utilizzando il citometro basato su immagini Tali® (Invitrogen™, Life Technologies) e la percentuale di cellule apoptotiche, le cellule morte e le cellule vive sono state determinate sulla base del corrispondente istogramma di fluorescenza rispetto al controllo non trattato. Ogni trattamento è stato eseguito tre volte e i risultati finali sono stati riportati come aumento rispetto al controllo.

2.2.3 Saggio di migrazione cellulare (Wound healing assay)

La linea di cellule tumorali umane NIH: OVCAR-3 è stata coltivata fino alla confluenza e poi è stato eseguito un taglio del monostrato con un puntale sterile per pipette. Le cellule sono state risciacquate tre volte con terreno caldo per lavare via le cellule raschiate nel taglio e quindi mantenute in terreni integri in assenza o in presenza di fragola in diverse concentrazioni: IC₃₀ (7 µg/ml), IC₅₀ (10 µg/ml) e IC₇₀ (14 µg/ml) per 48 ore. Sono state scattate immagini digitali del taglio iniziale e alle 12, 24 e 48 ore. L'area (mm²) del taglio non occupata dalle cellule è stata misurata utilizzando un sistema di imaging morfologico Image J 1.49n software (National Institutes of Health). La percentuale di chiusura è stata calcolata come:

$[1 - (\text{area del taglio rimanente}) / (\text{area del taglio iniziale})] \times 100$

2.2.4 Concentrazione intracellulare ROS

La determinazione dei livelli di ROS intracellulari è stata eseguita utilizzando la sonda CellROX[®] Orange reagent (Invitrogen[™], Life Technologies), una sonda fluorogenica per misurare lo stress ossidativo nelle cellule vive, come precedentemente riportato^[104]. In breve, il primo giorno del saggio sono state piastrate su una piastra con 6 pozzetti $1,5 \times 10^5$ cellule di adenocarcinoma ovarico e sono state lasciate aderire per circa 16-18h. Il giorno dopo sono state trattate con l'estratto metanolico di fragola (7, 10 e 14 $\mu\text{g/ml}$) e lasciate in incubazione per 48h. Successivamente le cellule di controllo e le cellule trattate con l'estratto di fragola sono state lavate con PBS, tripsinizzate mediante l'utilizzo di una soluzione contenente 0,5 mg/ml di tripsina e 0,2 mg/ml di EDTA e risospese in DMEM. 2 μl di CellRox[®] Orange sono stati aggiunti per ogni ml di DMEM in cui sono state risospese le cellule. Questo colorante a permeato cellulare non è fluorescente se si trova in uno stato ridotto mentre presenta fluorescenza brillante all'ossidazione da parte dei ROS. I campioni sono stati incubati a 37°C per 30 minuti, centrifugati a 320g per 10 minuti per rimuovere il terreno in eccesso e quindi risospesi in PBS. Sono state utilizzate cellule di controllo non trattate per determinare i livelli basali di ROS intracellulare e per impostare la soglia di fluorescenza per lo

strumento Tali[®]. I risultati sono stati espressi come percentuale di livelli intracellulare di ROS. Le cellule colorate con il reagente arancione CellROX[®] possono essere analizzate utilizzando il citofluorimetro Tali[®] per valutare gli aumenti dei livelli di ROS; infatti, il reagente arancione CellROX[®] ha un massimo di eccitazione all'emissione di 545-565 nm, e questo lo rende compatibile con il Tali[®] che utilizza un filtro di emissione che va da 530 nm a 580 nm.

2.2.5 Analisi bioenergetiche

È stato utilizzato l'analizzatore di flusso extracellulare XF24 (Agilent, Milano, Italia) per rilevare in tempo reale l'OCR (Oxygen Consumption Rate) e l'ECAR (Extracellular Acidification Rate), che rappresentano la fosforilazione ossidativa e la glicolisi, rispettivamente, come recentemente descritto^[104,105]. In breve 3×10^4 cellule di adenocarcinoma ovarico sono state seminate per 16 ore nella piastra XF-24 e trattate per 48 ore con l'estratto metanolico di fragola Romina a diverse concentrazioni (7, 10 e 14 µg/ml). Alla fine del trattamento il terreno è stato sostituito con 450 ml di terreno di corsa XF24 per pozzetto. La piastra è stata trasferita nell'analizzatore di flusso extracellulare XF24 e per ogni analisi, sono state introdotte sequenzialmente delle iniezioni di diversi composti che modulano la respirazione mitocondriale o la glicolisi: per OCR, 55 µl di oligomicina (2,5 µg/ml), 61 µl

di 2,4 - DNP (1 mM) e 68 μ l di antimicina A/rotenone (10 μ M/1 μ M), mentre per ECAR, 55 μ l di rotenone (3 μ M), 61 μ l di glucosio (10 mM) e 68 μ l di 2-desossiglucosio (2-DG; 100 mM). Ogni trattamento è stato effettuato in tre repliche e i risultati finali sono stati espressi come pmol di O₂ consumato per 10⁵ cellule al minuto (pmol O₂ · min⁻¹ · 10⁻⁵ cellule) in caso di OCR, mentre per ECAR come variazione dell' mpH per 10⁵ cellule al minuto (mpH · min⁻¹ · 10⁻⁵ cellule).

2.2.6 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando Minitab versione 18 per Windows (GraphPad, San Diego,CA). I risultati sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza unidirezionale non parametrica "Kruskal-Wallis", seguita dal test post hoc "Dunn" per confronti multipli. I risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). Le differenze con $p < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative.

3. RISULTATI

3.1 Caratterizzazione nutrizionale e fitochimica della cultivar Romina

La caratterizzazione dell'estratto metanolico della fragola Romina mediante analisi spettrofotometriche ha permesso l'identificazione dei principali composti bioattivi responsabili delle attività biologiche di questo frutto rosso

(Tabella 1). Le analisi spettrofotometriche utilizzate sono tecniche di screening per la prima valutazione della qualità nutrizionale della fragola.

Parametro	Valore
<i>TPH</i> (mg GAeq/kg)	1846.18 ± 147.00
<i>TFC</i> (mg CEeq/kg)	732.72 ± 92.26
<i>ACY</i> (mg pel-3-glu eq /kg)	369.92 ± 98.74
Capacità totale antiossidante:	
<i>TEAC</i> (mmol Trolox eq/kg)	18.31 ± 1.92

Tabella 1. Contenuto di micronutrienti, fitochimici e attività antiossidante dell' estratto di fragola Romina.

3.1.1 Capacità antiossidante totale

L'analisi della capacità antiossidante totale, misurata con il saggio TEAC, conferma la buona capacità antiossidante della fragola Romina, con un valore medio di: 18,31 mmol Trolox eq/kg.

3.1.2 Contenuto totale di polifenoli, flavonoidi e antociani

Il contenuto fenolico totale (TPH), determinato utilizzando il metodo colorimetrico Folin-Ciocalteu, è di 1864,18 mg GAeq/kg di frutto fresco, mentre il contenuto totale di flavonoidi (TFC), determinato mediante un metodo colorimetrico, è di 732,72 mg CAeq/kg di frutto fresco. Il contenuto totale di antocianine (ACY) è di 369,92 mg pel-3-glu eq/kg.

3.1.3 Identificazione e quantificazione degli antociani (HPLC-DAD-MS)

L'analisi HPLC è stata eseguita per effettuare in modo più accurato l'identificazione e la quantità di antociani nei frutti della fragola Romina. Il contenuto in antociani totali (ACY TOT), ottenuto con l'analisi HPLC conferma il dato ottenuto con lo spettrofotometro, anche se con un valore leggermente inferiore (34,27 mg/100g FW, che corrisponde a 342,7 mg/kg FW). I risultati confermano che la pelargonidina-3-glucoside (PEL-3-GLU) è l'antocianina più rappresentata nei frutti di fragola (29,31 mg/100 g FW), seguita dalla pelargonidina-3-rutinoside (PEL-3-RUT) con 3,86 mg/100 g FW e cianidina-3-glucoside (1,10 mg/100 g FW) (Tabella 2).

Parametro	Valore (mg/100g FW)
CYA-3GLU	1.10 ± 0.85
PEL-3-GLU	29.31 ± 6.71
PEL-3-RUT	3.86 ± 0.80
ACY TOT	34.27 ± 7.37

Tabella 2. Risultati analisi HPLC per la quantificazione e la classificazione degli antociani.

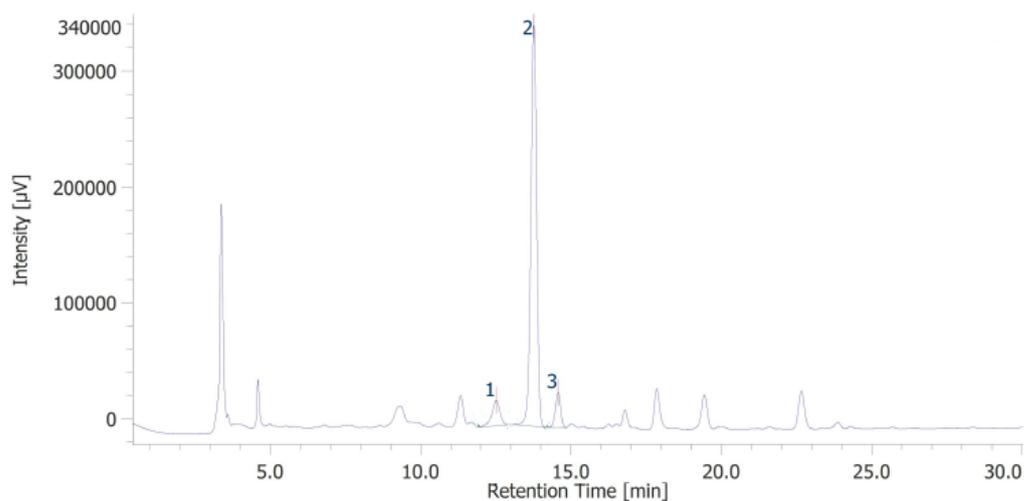


Figura 10. Cromatogramma HPLC della rilevazione degli antociani. Il picco 1 corrisponde alla cianidina-3-glucoside, il picco 2 alla pelargonidina-3-glucoside ed il picco 3 è la pelargonidina-3-rutinoside.

3.1.4 Contenuto Vitamina C

La Vitamina C è uno dei principali composti vitaminici dei frutti di fragola, nella cultivar Romina, è presente ad elevata concentrazione pari 42,85 mg/100 g FW, che corrisponde a più del 50% della dose giornaliera raccomandata di questo composto (80 mg).

3.2 Studio in vitro

3.2.1 Vitalità cellulare (test MTT)

Le cellule OVCAR-3 sono state trattate con l'estratto metanolico della fragola Romina a diverse concentrazioni (7, 10, 14 $\mu\text{g/mL}$) e tempi di incubazione (24, 48, 72 ore) ed è stato studiato l'effetto sulla vitalità cellulare con il saggio MTT (Fig. 11).

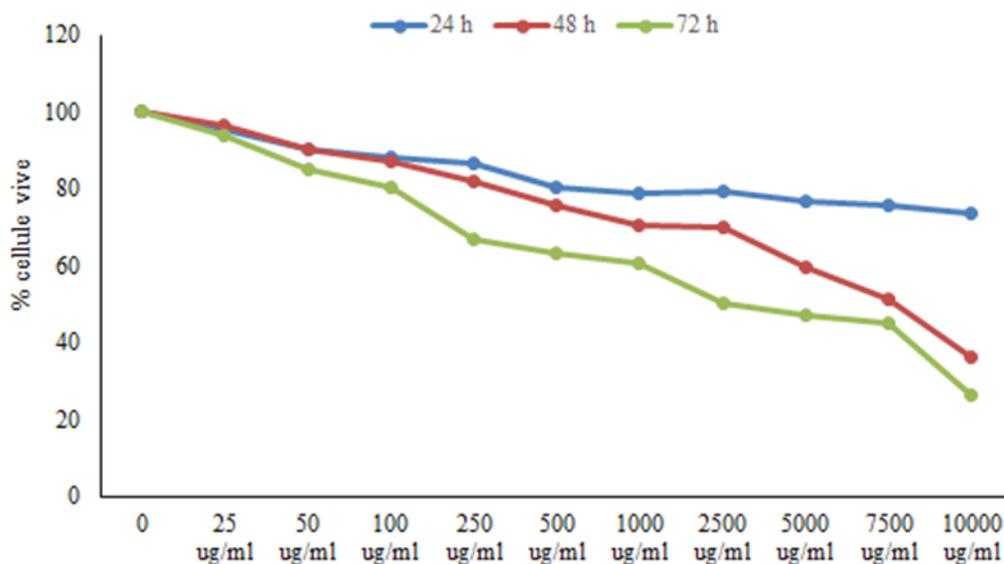


Figura 11. Effetto dell'estratto della fragola Romina sulla vitalità delle cellule OVCAR-3.

Come si evince dalla figura 11, la vitalità cellulare decresce all'aumentare della concentrazione dell'estratto metanolico di fragola e dei tempi di incubazione. Per tutte le successive analisi, sono state utilizzate le concentrazioni dell'estratto di fragola che hanno dato una vitalità cellulare del 70% ($IC_{30}=7 \mu\text{g/ml}$), del 50% ($IC_{50}=10 \mu\text{g/ml}$) e del 30% ($IC_{70}=14 \mu\text{g/ml}$) dopo 48 ore di incubazione.

3.2.2 Tasso di apoptosi

Il tasso di apoptosi è stato valutato per le cellule di controllo e le cellule OVCAR-3 preincubate per 48 ore con l'estratto di fragola Romina nelle tre differenti concentrazioni: IC_{30} ($7\mu\text{g/ml}$), IC_{50} ($10 \mu\text{g/ml}$) e IC_{70} ($14\mu\text{g/ml}$). Per determinare questo parametro, il citometro utilizza diverse lunghezze d'onda di eccitazione (530/580 nm) e di emissione (458/495 nm) per PI e annessina V. Le cellule annessina V-negative/PI negative sono state identificate come cellule vitali (fluorescenza blu), mentre le cellule annessina-V positive/PI negative sono state riconosciute come cellule apoptotiche (fluorescenza verde). Allo stesso modo, le cellule positive annessina V/PI

positive sono state identificate come cellule morte (fluorescenza giallo/rossa). Come si deduce dal grafico sotto riportato (Fig. 12), i risultati maggiormente significativi sono relativi all' IC₅₀ e IC₇₀: nel primo caso si ha una riduzione significativa delle cellule vive sia rispetto al controllo che a IC₃₀, non si ha variazione delle cellule morte rispetto a IC₃₀, mentre si ha un notevole aumento delle cellule apoptotiche sia rispetto al controllo che a IC₃₀. Nel secondo caso, invece, si ha un forte aumento delle cellule morte rispetto al controllo, a IC₃₀ e a IC₅₀; mentre le cellule apoptotiche diminuiscono rispetto a IC₅₀.

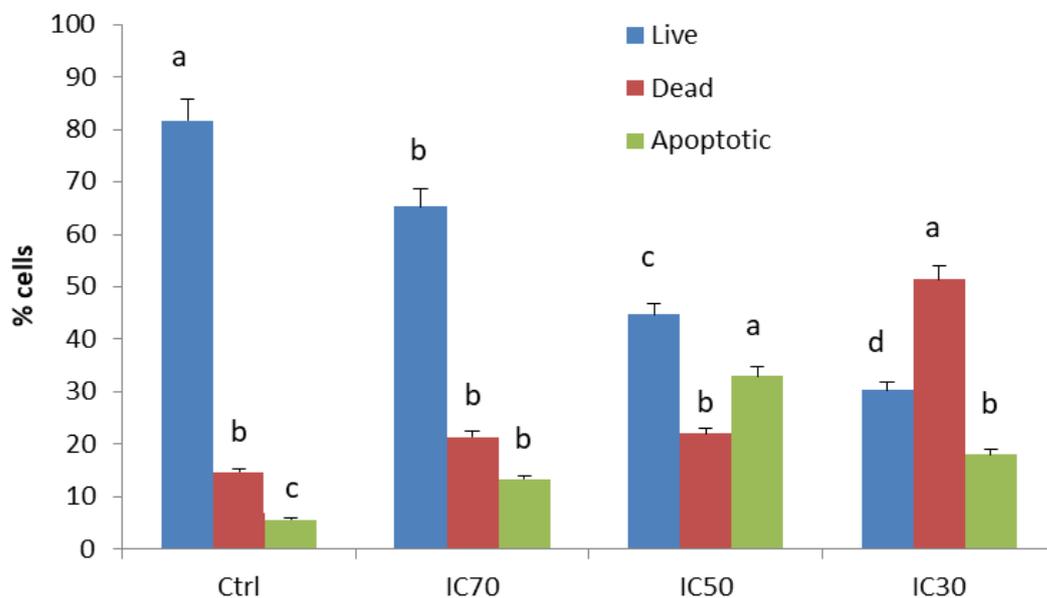
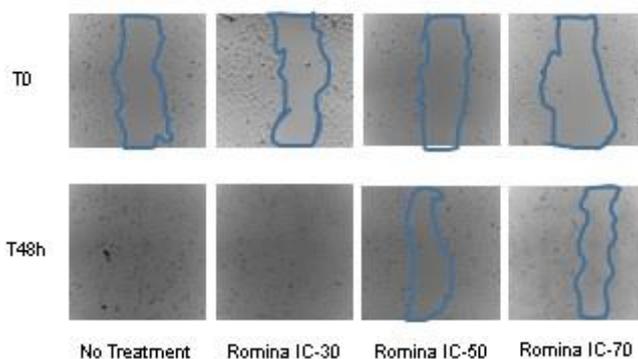


Figura 12. Effetto dell'estratto di fragola Romina sull'induzione dell'apoptosi nelle cellule OVCAR-3. Percentuale di cellule vive, morte e apoptotiche. Le

colonne etichettate con lettere diverse sono significativamente diverse dal controllo ($P < 0.05$). Media \pm DS di tre repliche.

3.2.3 Saggio di migrazione cellulare (*Wound healing assay*)

Per valutare l'effetto dell'estratto di fragola sulla migrazione cellulare, le cellule OVCAR-3 sono state trattate con l'estratto di Romina a diversa concentrazione: IC₃₀ (7 $\mu\text{g/ml}$), IC₅₀ (10 $\mu\text{g/ml}$) e IC₇₀ (14 $\mu\text{g/ml}$) per 48 ore ed è stata misurata la migrazione con il “wound healing assay”. Le immagini digitali sono state acquisite dal taglio iniziale e dopo 48 ore. I risultati hanno mostrato che l'estratto di fragola ha ridotto significativamente la migrazione delle cellule OVCAR-3, in particolare abbiamo osservato una riduzione significativa della migrazione delle cellule OVCAR-3 dopo il trattamento con Romina IC₅₀ (10 $\mu\text{g/ml}$) (Fig. 13).



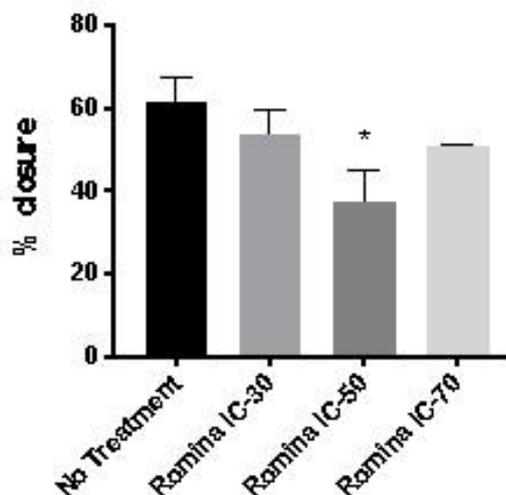


Figura 13. Effetto dell'estratto di fragola Romina sulla migrazione cellulare nelle cellule OVCAR-3. Le colonne sono significativamente diverse dal controllo (* P <0.05).

3.2.4 Concentrazione intracellulare ROS

La figura 14 mostra la percentuale di ROS nelle cellule di controllo e nelle cellule preincubate per 48 ore con l'estratto di fragola Romina nelle tre differenti concentrazioni: IC₃₀ (7µg/ml), IC₅₀ (10 µg/ml) e IC₇₀ (14 µg/ml). Come si evince, il trattamento con le fragole ha portato ad un aumento significativo dei ROS intracellulari e la maggiore % ROS è stata trovata nelle cellule OVCAR-3 trattate con l'estratto metanolico della fragola Romina nella concentrazione 10 µg/ml (IC₅₀) e 14 µg/ml (IC₇₀) µg/ml.

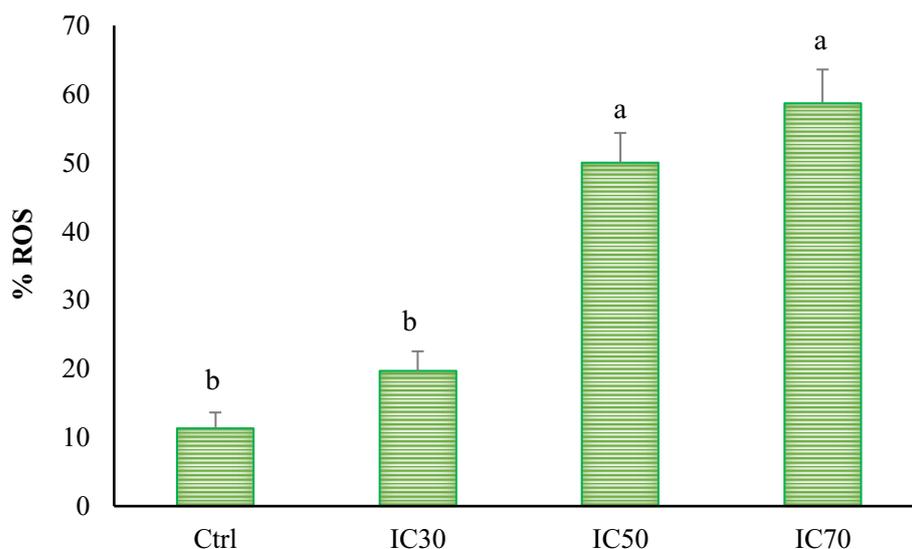


Figura 14. Effetto dell'estratto di fragola sulla concentrazione dei ROS intracellulari nelle cellule OVCAR-3. Le colonne etichettate con lettere diverse sono significativamente diverse dal controllo ($P < 0,05$). Media \pm DS di tre repliche.

3.2.5 *Analisi bioenergetiche*

Per esaminare il potenziale effetto positivo dell'estratto di fragola Romina sulla funzionalità mitocondriale, l'OCR e l'ECAR sono stati misurati nelle cellule di controllo e nelle cellule trattate, esposte sequenzialmente a dei differenti modulatori della fosforilazione ossidativa (OCR) e della glicolisi (ECAR), rispettivamente oligomicina/2,4-DNP/antimicina A-rotenone e rotenone/glucosio/2-deossiglucosio.

3.2.5.1 OCR (Oxygen Consumption Rate)

I risultati hanno dimostrato una significativa diminuzione dose-dipendente rispetto al controllo dell'OCR basale nelle cellule preincubate con l'estratto di fragola Romina alle tre differenti concentrazioni: IC₃₀ (7 µg/ml), IC₅₀ (10 µg/ml) e IC₇₀ (14 µg/ml). L'aggiunta di oligomicina, inibitore della F₁F₀-ATPasi (complesso V) che porta la respirazione residua ad essere dovuta esclusivamente alla perdita di protoni, ha causato un' inibizione del flusso di elettroni con una diminuzione dell' OCR nei gruppi di cellule di controllo, IC₇₀ e IC₅₀. L' aggiunta del protonoforo 2,4-DNP provoca un flusso protonico artificiale nella membrana; questa massima respirazione (consumo di O₂) è ora regolata dall'attività dell'ETC (Electron Transport Chain) e/o dalla disponibilità del substrato. La capacità respiratoria massima è definita come la maggiore capacità respiratoria al di sopra della respirazione basale. L'aggiunta di questa sostanza porta nei gruppi di cellule di controllo, IC₃₀ e IC₅₀ ad un consistente aumento dell'OCR, in maniera dose-dipendente. Infine, l'aggiunta di rotenone/antimicina, inibitori del complesso I e III, rispettivamente, ha arrestato il flusso di elettroni attraverso i complessi respiratori mitocondriali causando una notevole riduzione del consumo di O₂, come mostrato dalla caduta dei livelli di OCR in tutte le cellule; ciò dimostra che il trattamento con la fragola non interferisce con la capacità di bloccaggio

della catena respiratoria, come evidenziano anche i risultati ottenuti dopo l'iniezione di oligomicina, ma al contrario influisce sulla capacità respiratoria basale delle cellule tumorali ovariche.

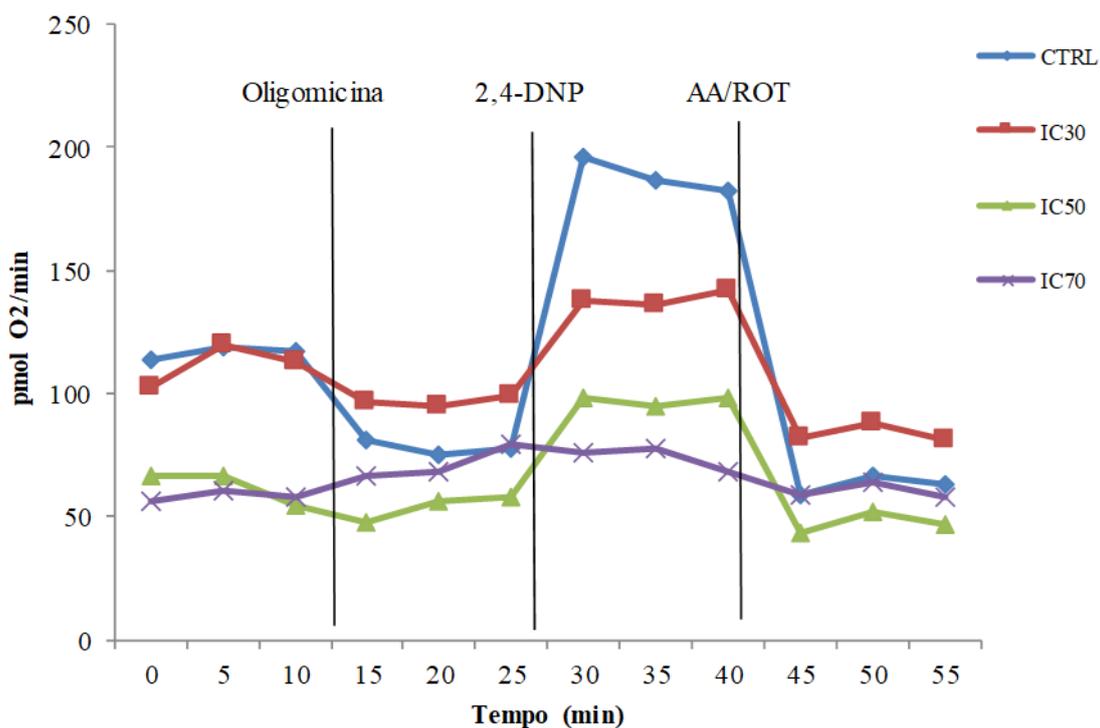


Figura 15. Effetti del trattamento delle cellule OVCAR-3 con l'estratto di fragola sull'OCR o fosforilazione ossidativa; il consumo di ossigeno è stato monitorato mediante iniezione sequenziali di oligomicina, 2,4-DNP, rotenone/antimicina A, dopo misurazione della respirazione basale. I dati sono presentati come media \pm DS di tre repliche.

3.2.5.2 ECAR (Extracellular Acidification Rate)

I risultati hanno dimostrato un notevole aumento dell'ECAR dose-dipendente rispetto al controllo nelle cellule preincubate con l'estratto di fragola Romina alle tre differenti concentrazioni: IC₃₀ (7µg/ml), IC₅₀ (10 µg/ml) e IC₇₀ (14µg/ml). L'aggiunta di rotenone, inibitore del complesso I della catena di trasporto degli elettroni, blocca la fosforilazione ossidativa e come vediamo dal grafico sotto riportato (Fig.15) si ha un aumento degli ioni H⁺ in tutti i gruppi di cellule analizzate. Successivamente viene aggiunto glucosio come substrato energetico che permette di valutare la massima capacità glicolitica; in IC₃₀ e nelle cellule di controllo si ha un drastico aumento dell'ECAR, mentre in IC₅₀ e IC₇₀ è meno significativo. Infine, l'aggiunta del 2-deossiglucosio inibisce la glicolisi, andando a legare la glucosio esochinasi, e permette di determinare l'acidificazione non dovuta alla glicolisi; infatti provoca una notevole riduzione dell'acidificazione come mostrato dalla caduta dei livelli di ECAR in tutte le cellule; ciò dimostra che il trattamento con la fragola influisce sulla capacità glicolitica delle cellule tumorali ovariche in modo dose-dipendente.

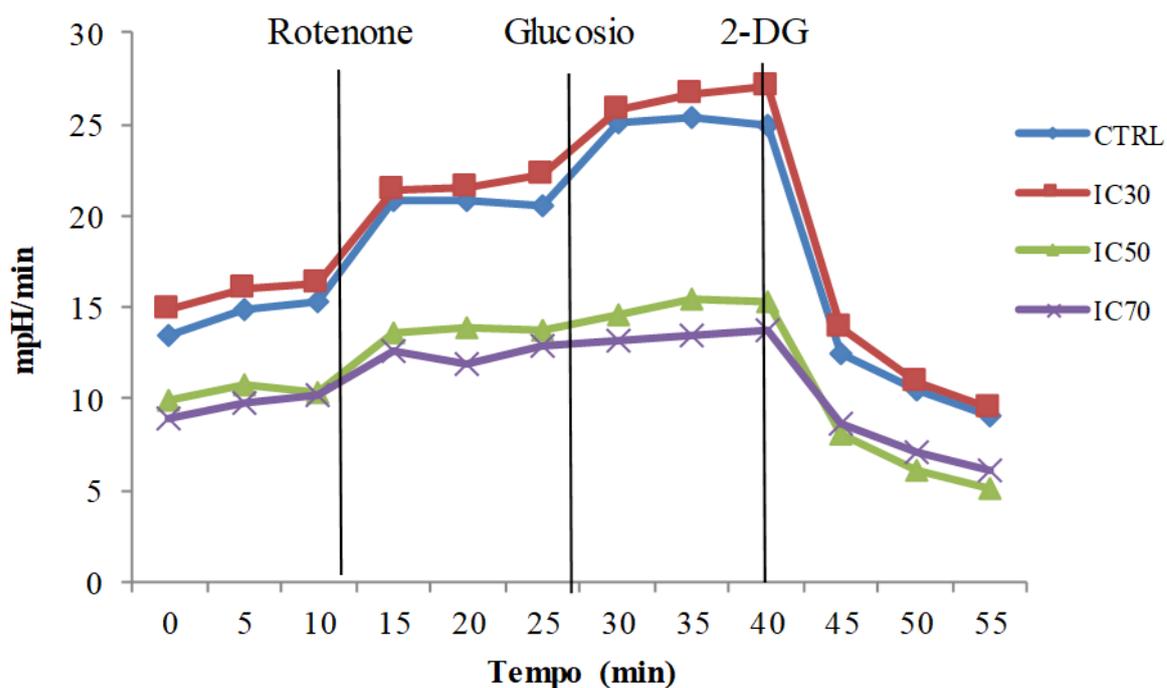


Figura 16. Caratterizzazione metabolica delle cellule OVCAR-3. ECAR o glicolisi. I dati sono presentati come media \pm DS di tre repliche.

4. DISCUSSIONE

Il carcinoma ovarico è una malattia a grande incidenza che affligge le donne in tutti i Paesi del mondo e, generalmente, viene diagnosticata in uno stadio avanzato (III e IV); nonostante lo sviluppo di efficaci metodiche di screening, di specifici interventi chirurgici e della terapia chemioterapica, rimane il cancro ginecologico più letale in tutto il mondo. Pertanto, è diventato di comune interesse studiare delle opzioni terapeutiche e/o di prevenzione. La relazione tra una dieta ricca di frutta e verdura e una ridotta incidenza di

diverse patologie croniche, incluso il cancro, è stata ampiamente dimostrata attraverso numerosi studi epidemiologici^[110]. Tra questi alimenti, i piccoli frutti (o berries) presentano un elevato contenuto di composti fitochimici^[72] come la vitamina C, i folati e i composti fenolici^[86] che esprimono proprietà antiossidanti sia *in vitro* che *in vivo*^[89, 111-113]. La fragola (*Fragaria x ananassa*) è uno dei piccoli frutti rossi con un maggior contenuto di micronutrienti, come minerali e vitamine e di sostanze non-nutrienti, come i polifenoli (flavonoidi, acidi fenolici, tannini, ecc.)^[111] e inoltre presenta un' evidente e notevole attività antiossidante. In questo progetto di ricerca, è stata scelta la cultivar Romina, una nuova varietà rilasciata nel 2011 dal programma di miglioramento genetico dell'Università Politecnica delle Marche. I risultati ottenuti in studi recenti^[114,115] hanno mostrato un profilo fitochimico e, in generale, nutrizionale molto interessante di questa cultivar. Rispetto ad altre cultivar di fragola analizzate negli ultimi anni come Alba, Clery, Portola, Sveva etc...^[106,114], Romina presenta il maggior contenuto di fenoli (TPH) e di antociani (ACY) ed è un'importante fonte di Vitamina C. Queste evidenze sono state confermate dal presente studio e sono stati trovati dei valori di TPH, di ACY e di Vitamina C rispettivamente di: 1864,18 mg GAeq/kg FW, 369,92 mg pel-3-glu eq/kg FW e di 42,85 mg/100 g FW. E' da notare che il contenuto di Vitamina C in 100 g di fragola Romina corrisponde

a più del 50% della dose giornaliera raccomandata di questo composto (80 mg). La quantificazione e l'identificazione di queste differenti sostanze sono stati utili a spiegare la notevole capacità antiossidante della fragola Romina, determinata mediante la TAEC. Il risultato ottenuto è di 18,31 mmol Trolox eq/kg ed è pienamente in accordo con il valore trovato in un precedente studio^[114]. Il contenuto fitochimico, in particolare, la concentrazione di ACY e la capacità antiossidante totale sono generalmente correlate agli effetti sulla salute esercitati da questo frutto.

In questo studio si è cercato di identificare i potenziali effetti benefici della cultivar Romina e di delucidarne le basi molecolari in una specifica condizione patologica, il cancro ovarico, e per far ciò sono state utilizzate le cellule NIH:OVCAR-3. I nostri risultati hanno mostrato che la fragola Romina ha importanti effetti biologici sulle cellule umane di adenocarcinoma ovarico, modulando la vitalità cellulare, il tasso di apoptosi, la migrazione cellulare, la concentrazione dei ROS intracellulari e due parametri metabolici ovvero la fosforilazione ossidativa e la glicolisi. Nello studio già sopra citato^[114] è stato dimostrato che varie cultivar di fragola come Alba, Clery, Portola etc... hanno importanti effetti biologici sulle cellule miometriali e sulle cellule del leiomioma uterino, regolando ad esempio la vitalità cellulare. Nel nostro lavoro il test MTT mostra che la vitalità delle cellule OVCAR-3

trattate con le diverse concentrazioni di estratto di fragola Romina (25 µg/ml-10 mg/mL) per diversi tempi di incubazione (24, 48, 72 ore) diminuisce all'aumentare della concentrazione di estratto e dei tempi di incubazione. I risultati ottenuti sono in accordo con altri studi condotti su cellule tumorali ovariche trattate con altre varietà di bacche e frutta^[116, 117]; ad esempio è stato trovato che il mirtillo rosso, ricco di proantocianidine, ha attività citotossica nei confronti delle cellule di carcinoma ovarico, portando a riduzione della vitalità e della proliferazione cellulare^[116]; lo stesso effetto è stato evidenziato in un altro lavoro che si è servito dell'estratto di semi di uva, ugualmente ricco di proantocianidine, per trattare le cellule OVCAR-3^[117]. Anche l'estratto di gelso, varietà di bacca originaria dell'Asia, ha mostrato un evidente effetto anti-proliferativo nelle cellule tumorali di ovaio^[118].

Dai risultati del saggio MTT, sono state identificate tre concentrazioni di estratto di fragola che sono state poi applicate a tutti i successivi tests: $IC_{30}=7\mu\text{g/ml}$, $IC_{50}=10\ \mu\text{g/ml}$ e $IC_{70}=14\mu\text{g/ml}$ dopo 48 ore di incubazione. Per quanto riguarda l'apoptosi, i risultati del presente studio hanno evidenziato che IC_{50} , corrispondente alle cellule OVCAR-3 trattate con l'estratto di fragola a concentrazione 10 µg/ml, presenta un aumento significativo delle cellule apoptotiche rispetto alle cellule trattate con gli altri due estratti di fragola, mentre l' IC_{70} , cellule OVCAR-3 trattate con l'estratto di fragola a

concentrazione 14 µg/ml, mostra un forte accrescimento di cellule morte. Esiti simili sono stati trovati negli studi precedentemente menzionati^[116,117], i quali si sono anche occupati di indagare la stretta relazione tra tasso di apoptosi e bacca/frutta come il mirtillo rosso e l'estratto dei semi di uva. Inoltre col nostro lavoro è stato evidenziato che gli estratti di fragola Romina riducono in modo significativo la migrazione cellulare delle cellule OVCAR-3, in particolar modo è stata ridotta dalla cultivar Romina IC₅₀. Questi risultati sono in linea con lavori già indicati^[105, 114] nei quali sono stati dimostrati gli effetti *in vitro* di estratti di varie cultivar di fragola sulle cellule di leiomioma uterino, un tipo di tumore benigno che colpisce l'utero. Si è constatato che gli estratti delle fragole Alba e Romina riducono significativamente la migrazione cellulare delle cellule del leiomioma rispetto alle cellule sane del miometrio, proponendo gli estratti di fragola come metodo di prevenzione del fibroma uterino.

Un altro importante risultato della nostra ricerca è stato trovato analizzando la concentrazione dei ROS intracellulari nelle cellule OVCAR-3 precedentemente incubate con i tre differenti estratti di fragola (7-10-14µg/ml) per 48 ore. In condizioni fisiologiche, i ROS esercitano un duplice effetto in base alla loro concentrazione: a bassa concentrazione, sono essenziali per mantenere l'omeostasi cellulare, agendo come messaggeri

redox, mentre ad alta concentrazione diventano dannosi, danneggiando le macromolecole cellulari come i lipidi, le proteine e il DNA e inducendo la morte cellulare. Al contrario, in condizioni patologiche, come in caso di tumore, alti livelli di ROS svolgono sia un ruolo nell'iniziazione del tumore che nell'inibizione della crescita del cancro e nella promozione di apoptosi o morte cellulare, esercitando quindi degli effetti chemioterapici^[119]. Questo duplice comportamento è stato confermato dallo studio sopra riportato sulle cellule cancerose di leiomioma uterino e sulle cellule miometriali trattate con diverse cultivar di fragole^[114]. Nel leiomioma, Alba e Romina erano le più efficaci nell'aumentare i livelli di ROS intracellulari; al contrario, nelle cellule sane miometriali si è ottenuto l'effetto opposto ovvero una diminuzione dei ROS intracellulari. Il nostro studio si è limitato a valutare gli effetti della fragola Romina in condizioni patologiche e è stato trovato che la maggior produzione di ROS intracellulari si ha in IC₇₀, seguita da IC₅₀ e infine IC₃₀ che mostra un aumento non significativo rispetto al controllo. L'aumento dei ROS intracellulari nelle cellule di cancro ovarico in seguito a trattamento con diversi estratti di frutta/bacche è confermato da studi già citati condotti sul mirtillo rosso e sull'estratto di semi d'uva ^[116,117].

Gli ultimi due parametri valutati nel presente progetto sono l' OCR, ovvero la fosforilazione ossidativa (processo dipendente dall'ossigeno) e l' ECAR,

ovvero la glicolisi (processo indipendente dall'ossigeno), i quali sono dei percorsi metabolici finalizzati a generare energia per mantenere la normale funzionalità cellulare. La fosforilazione ossidativa è la principale via metabolica per la generazione di ATP, infatti vengono prodotte 38 molecole di adenosina-tri-fosfato rispetto alle 2 molecole prodotte nel processo glicolitico; nonostante ciò, le cellule normali come anche quelle tumorali possono attivare la glicolisi aerobica (presenza di adeguati livelli di ossigeno) come fonte principale del loro approvvigionamento energetico; infatti la maggior parte delle cellule cancerose mostrano un aumento della glicolisi, prediligendo proprio questa via per accrescersi e sopravvivere. Questo fenomeno è ben noto come Effetto Warburg (Warburg, 1956). Pertanto, interrompere l'equilibrio energetico attraverso l'inibizione della glicolisi tumorale rappresenta una potenziale strategia terapeutica^[114]. Nel presente studio, gli estratti di fragola Romina hanno influenzato la funzionalità mitocondriale, provocando la diminuzione della respirazione basale in modo dose-dipendente. Una tendenza simile è stata osservata nella glicolisi in cui gli estratti di fragola Romina sono stati in grado di inibire questo processo metabolico, diminuendo la capacità glicolitica, soprattutto alle concentrazioni più elevate. Nel complesso, i dati *in vitro* ottenuti supportano l'ipotesi che le “powerful strawberry” possano essere utilizzate per sviluppare terapie e

interventi dietetici preventivi in una grande varietà di patologie croniche, compreso il cancro ovarico. Queste fragole dovrebbero avere un'elevata capacità antiossidante (ad es > 15 mmolTE/kg FW), TPH alto (ad esempio > 1000 mgGA/kg FW), alto ACY (ad es > 350 mgpel-3-glu/kg FW)^[114]. La cultivar Romina possiede tutte le caratteristiche di una “powerful strawberry” che suggeriscono e incentivano l'uso di questo frutto per future attività preventive e/o in associazione alla terapia farmacologica.

5. CONCLUSIONI

Nella società odierna è ormai consolidato che il quotidiano consumo di frutta, ricca di composti utili e vantaggiosi per la salute, rappresenta una strategia appropriata per beneficiare delle sue proprietà. La fragola rappresenta una delle più importanti fonti di vitamine, minerali, acido folico, fibre e di composti bioattivi, per lo più rappresentati dai polifenoli. Anche se questi composti sono noti principalmente per le loro azioni antiossidanti e anti-infiammatorie, di recente è stato evidenziato che l'elevato contenuto di composti bioattivi è implicato anche nella regolazione di altri meccanismi molecolari e cellulari. Diversi studi hanno dimostrato numerosi benefici cardiovascolari, antiproliferativi e neurologici associati al consumo di fragole. I risultati presentati in questo studio mostrano il ruolo che i composti bioattivi della fragola Romina hanno nella regolazione dei processi cellulari legati allo

stress ossidativo e al metabolismo nelle cellule di adenocarcinoma ovarico, offrendo un quadro generale sulle potenzialità della fragola come importante alleata al fine di proteggere o ridurre l'insorgenza di diverse patologie croniche, come il cancro, e in condizioni fisiologiche caratterizzate da un elevato stress ossidativo e al fine di promuovere un buono stato di salute e qualità della vita. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per verificare l'evidente effetto benefico dei composti bioattivi della fragola Romina e, in generale della fragola, nella condizione patologica del cancro ovarico e soprattutto per delineare i meccanismi molecolari coinvolti nell'effetto anti-cancerogenico. Inoltre è sicuramente opportuno un grande lavoro di ricerca per testare gli effetti *in vivo* su animali e sull'uomo in modo da approfondire il potenziale utilizzo di agenti terapeutici o preventivi che coinvolgono i composti bioattivi dell'estratto di fragola e/o l'aggiunta di bacche come parte dei trattamenti dietetici a sostegno delle terapie convenzionali.

Ringraziamenti

Il presente studio è stato possibile grazie al finanziamento del progetto strategico di Ateneo 2017-2020, presso l'Università Politecnica delle Marche.

BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

[1] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancerbase No. 11 [internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed 14 July 2016.

[2] Ferlay J, Bray F, Steliarova-Foucher E, et al. Cancer incidence in five continents, CI5plus. IARC CancerBase No. 9. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2014. Available from: <http://ci5.iarc.fr>, accessed 14 July 2016.

[3] Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov). Seer*Stat Database: Incidence-SEER 18 Regs Research Data Hurricane Katrina impacted Louisiana Cases, Nov 2015 sub (2000e2013). National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Surveillance Systems Branch, April 2016.

[4] Singh, N.; Gilks, C.B.; Hirschowitz, L.; Kehoe, S.; McNeish, I.A.; Miller, D.; Naik, R.; Wilkinson, N.; McCluggage, W.G. Primary site assignment in tubo-ovarian high-grade serous carcinoma: Consensus statement on unifying practice worldwide. *Gynecol. Oncol.*, 2016, 141(2), 195-198.

- [5] McAlpine, J.N.; Tone, A.A.; Hanley, G.E. Opportunistic Salpingectomy: We chose to act, not wait. *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, 2016, 38(5), 425-427.
- [6] Cress, R.D.; Chen, Y.S.; Morris, C.R.; Petersen, M.; Leiserowitz, G.S. Characteristics of long-term survivors of epithelial ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.*, 2015, 126(3), 491-497.
- [7] Stratton J, Pharoah P, Smith SK, et al. A systematic review and meta-analysis of family history and risk of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105(5):493e9.
- [8] Jervis S, Song H, Lee A, et al. Ovarian cancer familial relative risks by tumour subtypes and by known ovarian cancer genetic susceptibility variants. *J Med Genet* 2014;51(2):108e13.
- [9] Alsop K, Fereday S, Meldrum C, et al. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutationpositive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2012; 30(21):2654e63.
- [10] Boyd J. Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know. *Gynecol Oncol* 2003;88(1 Pt 2):S8e10.

[11] Ramus SJ, Song H, Dicks E, et al. Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015;107(11).

[12] Song H, Dicks E, Ramus SJ, et al. Contribution of germline mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D genes to ovarian cancer in the population. *J Clin Oncol* 2015;33(26):2901e7.

[13] Gong TT, Wu QJ, Vogtmann E, et al. Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 2013;132(12):2894e900.

*[14] Wentzensen N, Poole EM, Trabert B, et al. Ovarian cancer risk factors by histologic subtype: an analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *J Clin Oncol* 2016;34(24):2888e98.

[15] Whittemore AS, Harris R, Itnyre J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US casecontrol studies. ii. Invasive epithelial ovarian cancers in white women. Collaborative Ovarian Cancer Group. *Am J Epidemiol* 1992;136(10):1184e203.

[16] Hankinson, S.E.; Colditz, G.A.; Hunter, D.J.; Willett, W.C.; Stampfer, M.J.; Rosner, B.; Hennekens, C.H.; Speizer, F.E. A prospective study of

reproductive factors and risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 1995, 76(2), 284-290.

[17] Whiteman DC, Murphy MF, Cook LS, et al. Multiple births and risk of epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(14):1172e7.

[18] Dick ML, Siskind V, Purdie DM, et al. Incomplete pregnancy and risk of ovarian cancer: results from two Australian casecontrol studies and systematic review. *Cancer Causes Control* 2009;20(9):1571e85.

[19] Braem MG, Onland-Moret NC, Schouten LJ, et al. Multiple miscarriages are associated with the risk of ovarian cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *PLoS One* 2012;7(5):e37141.

*[20] Usha Menon, MD, FRCOG, Chloe Karpinskyj, BSc, and Aleksandra Gentry-Maharaj, Ovarian cancer prevention and screening by American College of Obstetricians 2018;vol.131, no.5.

[21] Sung HK, Ma SH, Choi JY, Hwang Y, Ahn C, Kim BG, et al. The effect of breastfeeding duration and parity on the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Prev Med Public Health* 2016;49:349–66.

*[22] Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Doll R, et al. Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls. *Lancet* 2008;371(9609):303e14.

[23] Iodice S, Barile M, Rotmensz N, et al. Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in *brca1/2* carriers: a metaanalysis. *Eur J Cancer* 2010;46(12):2275e84.

*[24] Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V, Gaitskell K, et al. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies. *Lancet* 2015;385(9980):1835e42.

[25] Trabert B, Ness RB, Lo-Ciganic WH, et al. Aspirin, nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drug, and acetaminophen use and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a pooled analysis in the Ovarian Cancer Association Consortium. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(2):djt431.

[26] Baandrup L, Kjaer SK, Olsen JH, et al. Low-dose aspirin use and the risk of ovarian cancer in Denmark. *Ann Oncol* 2015; 26(4):787e92.

[27] Liu, Y.; Warren Andersen, S.; Wen, W.; Gao, Y.T.; Lan, Q.; Rothman, N.; Ji, B.T.; Yang, G.; Xiang, Y.B.; Shu, X.O.; Zheng, W. Prospective cohort

study of general and central obesity, weight change trajectory and risk of major cancers among Chinese women. *Int. J. Cancer*, 2016, 139(7), 1461-1470.

[28] Peres, L.C.; Camacho, F.; Abbott, S.E.; Alberg, A.J.; Bandera, E.V.; Barnholtz-Sloan, J.; Bondy, M.; Cote, M.L.; Crankshaw, S.; Funkhouser, E.; Moorman, P.G.; Peters, E.S.; Schwartz, A.G.; Terry, P.; Wang, F.; Schildkraut, J.M. Analgesic medication use and risk of epithelial ovarian cancer in African American women. *Br. J. Cancer*, 2016, 114(7), 819-825.

[29] Ovarian cancer and body size: individual participant meta-analysis including 25,157 women with ovarian cancer from 47 epidemiological studies. *PLoS Med.*, 2012, 9(4), e1001200.

[30] Foong, K.W.; Bolton, H. Obesity and ovarian cancer risk: A systematic review. *Post Reprod. Health*, 2017, 23(4), 183-198.

[31] Szlosarek, P.W.; Balkwill, F.R. Tumour necrosis factor α : a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol.*, 2003, 4(9), 565-573.

[32] Zhang, M.; Yang, Z.Y.; Binns, C.W.; Lee, A.H. Diet and ovarian cancer risk: a case-control study in China. *Br. J. Cancer*, 2002, 86(5), 712-717.

[33] Shanmughapriya, S.; Senthilkumar, G.; Arun, S.; Das, B.C.; Natarajaseenivasan, K. Risk factors for epithelial ovarian carcinoma in India:

A case control study in low-incidence population. *International Journal of Cancer Research*, 2016, 12(1), 61-68.

[34] Blank, M.M.; Wentzensen, N.; Murphy, M.A.; Hollenbeck, A.; Park, Y. Dietary fat intake and risk of ovarian cancer in the NIHAARP Diet and Health Study. *Br. J. Cancer*, 2012, 106(3), 596- 602.

[35] Erickson BK, Kinde I, Dobbin ZC, Wang Y, Martin JY, Alvarez RD, et al. Detection of somatic TP53 mutations in tampons of patients with high-grade serous ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 2014;124:881–5.

[36] Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018;359:926–30.

[37] McAlpine, J.N.; Tone, A.A.; Hanley, G.E. Opportunistic Salpingectomy: We chose to act, not wait. *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, 2016, 38(5), 425-427.

[38] Madsen, C.; Baandrup, L.; Dehlendorff, C.; Kjaer, S.K. Tubal ligation and salpingectomy and the risk of epithelial ovarian cancer and borderline ovarian tumors: a nationwide case-control study. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2015, 94(1), 86-94.

[39] Antoniou, A.C.; Rookus, M.; Andrieu, N.; Brohet, R.; Chang- Claude, J.; Peock, S.; Cook, M.; Evans, D.G.; Eeles, R.; Nogues, C.; Faivre, L.; Gesta,

P.; van Leeuwen, F.E.; Ausems, M.G.; Osorio, A.; Caldes, T.; Simard, J.; Lubinski, J.; Gerdes, A.M.; Olah, E.; Furhauser, C.; Olsson, H.; Arver, B.; Radice, P.; Easton, D.F.; Goldgar, D.E. Reproductive and hormonal factors, and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2009, 18(2), 601-610.

*[40] Cibula, D.; Widschwendter, M.; Majek, O.; Dusek, L. Tubal ligation and the risk of ovarian cancer: review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 2011, 17(1), 55-67.

[41] Gaitskell, K.; Coffey, K.; Green, J.; Pirie, K.; Reeves, G.K.; Ahmed, A.A.; Barnes, I.; Beral, V. Tubal ligation and incidence of 26 site-specific cancers in the Million Women Study. *Br. J. Cancer*, 2016, 114(9), 1033-1037.

[42] Greggi, S.; Parazzini, F.; Paratore, M.P.; Chatenoud, L.; Legge, F.; Mancuso, S.; La Vecchia, C. Risk factors for ovarian cancer in central Italy. *Gynecol. Oncol.*, 2000, 79(1), 50-54.

[43] Havrilesky, L.J.; Gierisch, J.M.; Moorman, P.G.; Coeytaux, R.R.; Urrutia, R.P.; Lowery, W.J.; Dinan, M.; McBroom, A.J.; Wing, L.; Musty, M.D.; Lallinger, K.R.; Hasselblad, V.; Sanders, G.D.; Myers, E.R. Oral

contraceptive use for the primary prevention of ovarian cancer. *Evid. Rep. Technol. Assess. (Full. Rep)*, 2013, (212), 1-514.

[44] Moorman, P.G.; Havrilesky, L.J.; Gierisch, J.M.; Coeytaux, R.R.; Lowery, W.J.; Peragallo Urrutia, R.; Dinan, M.; McBroom, A.J.; Hasselblad, V.; Sanders, G.D.; Myers, E.R. Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol.*, 2013, 31(33), 4188-4198.

*[45] Friebel, T.M.; Domchek, S.M.; Rebbeck, T.R. Modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2014, 106(6), dju091.

[46] Merritt, M.A.; De Pari, M.; Vitonis, A.F.; Titus, L.J.; Cramer, D.W.; Terry, K.L. Reproductive characteristics in relation to ovarian cancer risk by histologic pathways. *Hum. Reprod.*, 2013, 28(5), 1406-1417.

[47] Vachon, C.M.; Mink, P.J.; Janney, C.A.; Sellers, T.A.; Cerhan, J.R.; Hartmann, L.; Folsom, A.R. Association of parity and ovarian cancer risk by family history of breast or ovarian cancer in a population-based study of postmenopausal women. *Epidemiology*, 2002, 13(1), 66-71.

[48] Park, B.; Park, S.; Shin, H.R.; Shin, A.; Yeo, Y.; Choi, J.Y.; Jung, K.W.; Kim, B.G.; Kim, Y.M.; Noh, D.Y.; Ahn, S.H.; Kim, J.W.; Kang, S.; Kim,

J.H.; Kim, T.J.; Kang, D.; Yoo, K.Y.; Park, S.K. Population attributable risks of modifiable reproductive factors for breast and ovarian cancers in Korea. *BMC Cancer*, 2016, 16, 5.

[49] Kotsopoulos, J.; Lubinski, J.; Gronwald, J.; Cybulski, C.; Demsky, R.; Neuhausen, S.L.; Kim-Sing, C.; Tung, N.; Friedman, S.; Senter, L.; Weitzel, J.; Karlan, B.; Moller, P.; Sun, P.; Narod, S.A. Factors influencing ovulation and the risk of ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Int. J. Cancer*, 2015, 137(5), 1136-1146.

[50] Li, D.P.; Du, C.; Zhang, Z.M.; Li, G.X.; Yu, Z.F.; Wang, X.; Li, P.F.; Cheng, C.; Liu, Y.P.; Zhao, Y.S. Breastfeeding and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, 15(12), 4829- 4837.

[51] Sung, H.K.; Ma, S.H.; Choi, J.Y.; Hwang, Y.; Ahn, C.; Kim, B.G.; Kim, Y.M.; Kim, J.W.; Kang, S.; Kim, J.; Kim, T.J.; Yoo, K.Y.; Kang, D.; Park, S. The effect of breastfeeding duration and parity on the risk of epithelial ovarian cancer. A systemic review and meta -analysis. *J. Prev. Med. Public Health*, 2016, 49(6), 349-366.

[52] Trabert, B.; Ness, R.B.; Lo-Ciganic, W.H.; Murphy, M.A.; Goode, E.L.; Poole, E.M.; Brinton, L.A.; Webb, P.M.; Nagle, C.M.; Jordan, S.J.; Risch,

H.A.; Rossing, M.A.; Doherty, J.A.; Goodman, M.T.; Lurie, G.; Kjar, S.K.; Hogdall, E.; Jensen, A.; Cramer, D.W.; Terry, K.L.; Vitonis, A.; Bandera, E.V.; Olson, S.; King, M.G.; Chandran, U.; Anton-Culver, H.; Ziogas, A.; Menon, U.; Gayther, S.A.; Ramus, S.J.; Gentry-Maharaj, A.; Wu, A.H.; Pearce, C.L.; Pike, M.C.; Berchuck, A.; Schildkraut, J.M.; Wentzensen, N. Aspirin, nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drug, and acetaminophen use and risk of invasive epithelial ovarian cancer: a pooled analysis in the Ovarian Cancer Association Consortium. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2014, 106(2), djt431.

[53] Baandrup, L.; Kjaer, S.K.; Olsen, J.H.; Dehlendorff, C.; Friis, S. Low-dose aspirin use and the risk of ovarian cancer in Denmark. *Ann. Oncol.*, 2015, 26(4), 787-792.

[54] Vaughan, L.E.; Prizment, A.; Blair, C.K.; Thomas, W.; Anderson, K.E. Aspirin use and the incidence of breast, colon, ovarian, and pancreatic cancers in elderly women in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Causes Control*, 2016, 27(11), 1395-1402.

[55] Huang, Y.; Lichtenberger, L.M.; Taylor, M.; Bottsford-Miller, J.N.; Haemmerle, M.; Wagner, M.J.; Lyons, Y.; Pradeep, S.; Hu, W.; Previs, R.A.; Hansen, J.M.; Fang, D.; Dorniak, P.L.; Filant, J.; Dial, E.J.; Shen, F.;

Hatakeyama, H.; Sood, A.K. Antitumor and Antiangiogenic Effects of Aspirin-PC in Ovarian Cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2016, 15(12), 2894-2904.

[56] Peres, L.C.; Camacho, F.; Abbott, S.E.; Alberg, A.J.; Bandera, E.V.; Barnholtz-Sloan, J.; Bondy, M.; Cote, M.L.; Crankshaw, S.; Funkhouser, E.; Moorman, P.G.; Peters, E.S.; Schwartz, A.G.; Terry, P.; Wang, F.; Schildkraut, J.M. Analgesic medication use and risk of epithelial ovarian cancer in African American women. *Br. J. Cancer*, 2016, 114(7), 819-825.

[57] Zhang, D.; Bai, B.; Xi, Y.; Wang, T.; Zhao, Y. Is aspirin use associated with a decreased risk of ovarian cancer? A systematic review and meta-analysis of observational studies with dose-response analysis. *Gynecol. Oncol.*, 2016, 142(2), 368-377.

[58] Zhang, M.; Yang, Z.Y.; Binns, C.W.; Lee, A.H. Diet and ovarian cancer risk: a case-control study in China. *Br. J. Cancer*, 2002, 86(5), 712-717.

[59] Zhang, M.; Lee, A.H.; Binns, C.W. Reproductive and dietary risk factors for epithelial ovarian cancer in China. *Gynecol. Oncol.*, 2004, 92(1), 320-326.

[60] Pan, S.Y.; Ugnat, A.M.; Mao, Y.; Wen, S.W.; Johnson, K.C. A case-control study of diet and the risk of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2004, 13(9), 1521-1527.

- [61] Tzonou, A.; Hsieh, C.C.; Polychronopoulou, A.; Kaprinis, G.; Toupadaki, N.; Trichopoulou, A.; Karakatsani, A.; Trichopoulos, D. Diet and ovarian cancer: a case-control study in Greece. *Int. J. Cancer*, 1993, 55(3), 411-414.
- [62] Pan, S.Y.; Ugnat, A.M.; Mao, Y. Physical activity and the risk of ovarian cancer: a case-control study in Canada. *Int. J. Cancer*, 2005, 117(2), 300-307.
- [63] Riman, T.; Dickman, P.W.; Nilsson, S.; Nordlinder, H.; Magnusson, C.M.; Persson, I.R. Some life-style factors and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish women. *Eur. J. Epidemiol.*, 2004, 19(11), 1011-1019.
- [64] Boyle, P.; Maisonneuve, P.; Autier, P. Update on cancer control in women. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 2000, 70(2), 263-303.
- [65] Kolahtooz, F.; Ibiebele, T.I.; van der Pols, J.C.; Webb, P.M. Dietary patterns and ovarian cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, 89(1), 297-304.
- [66] Shanmughapriya, S.; Senthilkumar, G.; Arun, S.; Das, B.C.; Natarajaseenivasan, K. Risk factors for epithelial ovarian carcinoma in India: A case control study in low-incidence population. *International Journal of Cancer Research*, 2016, 12(1), 61-68.

[67] Prentice, R.L.; Thomson, C.A.; Caan, B.; Hubbell, F.A.; Anderson, G.L.; Beresford, S.A.; Pettinger, M.; Lane, D.S.; Lessin, L.; Yasmeen, S.; Singh, B.; Khandekar, J.; Shikany, J.M.; Satterfield, S.; Chlebowski, R.T. Low-fat dietary pattern and cancer incidence in the Women's Health Initiative Dietary Modification Randomized Controlled Trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2007, 99(20), 1534-1543.

[68] Zhang, M.; Lee, A.H.; Binns, C.W. Reproductive and dietary risk factors for epithelial ovarian cancer in China. *Gynecol. Oncol.*, 2004, 92(1), 320-326.

*[69] Tzonou, A.; Hsieh, C.C.; Polychronopoulou, A.; Kaprinis, G.; Toupadaki, N.; Trichopoulou, A.; Karakatsani, A.; Trichopoulos, D. Diet and ovarian cancer: a case-control study in Greece. *Int. J. Cancer*, 1993, 55(3), 411-414.

[70] Giacosa, A.; Barale, R.; Bavaresco, L.; Gatenby, P.; Gerbi, V.; Janssens, J.; Johnston, B.; Kas, K.; La Vecchia, C.; Mainguet, P.; Morazzoni, P.; Negri, E.; Pelucchi, C.; Pezzotti, M.; Rondanelli, M. Cancer prevention in Europe: the Mediterranean diet as a protective choice. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2013, 22(1), 90-95.

[71] World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Systematic literature review continuous update project report: The

associations between food, nutrition and physical activity and the risk of ovarian cancer. London: 2013.

*[72] Halvorsen BL, Holte M, Myhrstad MCW, Bariamo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner, K, Baugerød H, Andersen LF, Moskaug , Jacobs DR, Blomhoff R. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J. Nutr.* 2002, 132, 461-71.

[73] Hannum SM. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* 2004, 44(1), 1-17.

[74] Giampieri F, Tulipani S, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. The strawberry: Composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition.* 2012c, 28, 9–19.

[75] Tulipani S, Romandini S, Alvarez Suarez JM, Capocasa F, Mezzetti B, Busco F, Bamonti F, Novembrino C, Battino M. Folate content in different strawberry genotypes and folate status in healthy subjects after strawberry consumption. *Biofactors.* 2008b, 34, 47–55.

[76] Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jime'nez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2005, 45, 287–306.

- [77] Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signaling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, 507–526.
- [78] Fantini, M.; Benvenuto, M.; Masuelli, L.; Frajese, G.V.; Tresoldi, I.; Modesti, A.; Bei, R. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 9236–9282.
- [79] Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jime'nez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–747.
- [80] Lopes da Silva F, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC, Santuos-Buelga C. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv. Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 214, 248-53.
- [81] Lopes da Silva F, Escribano-Bailon MT, Perez Alonso JJ, Rivas-Gonzalo J, Santos-Buelga C. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT-Food Scien. Tech.* 2007, 40, 374-82.

- [82] Bridle P & Garcia-Viguera C. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC. *Food Chem*, 1997;59:299-304.
- [83] Aaby K, Skrede G, Wrolstad RE. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem*. 2005, 53, 4032-40.
- [84] Hakkinen SH, Torronen AR. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Res. Int*. 2000, 33, 517-24.
- [85] Santos-Buelga C & Scalbert A. Proanthocyanidins and tanninlike compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric*. 2000, 80, 1094-117.
- [86] Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van De Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic. Res*. 2002, 36, 217-33.
- [87] Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, de Vos CH, Capanoglu E, Bovy A, Battino M. Antioxidants, phenolic compounds,

and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 2008a, 56(3), 696-704.

[88] Tulipani S, Mezzetti B, Battino M. Impact of strawberry on human health: insight into marginally discussed bioactive compounds for the Mediterranean diet. *Public Health Nutr.* 2009a, 12(9A), 1656–62.

[89] Tulipani S, Romandini S, Busco F, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M. Ascorbate, not urate, modulates the plasma antioxidant capacity after strawberry intake. *Food Chem.* 2009b, 117, 181–88.

[90] Tulipani S, Armeni T, Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Gonzalez-Paramás AM, Santos- Buelga C, Busco F, Principato G, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Strawberry intake increases blood fluid, erythrocyte and mononuclear cell defenses against oxidative challenge. *Food Chem.* 2014, 156, 87–93.

[91] Alvarez-Suarez JM, Dekanski D, Ristic S, Radonjic NV, Petronijevic ND, Giampieri F, Astolfi P, Gonzalez-Paramas AM, Santos-Buelga C, Tulipani S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PlosOne*, 2011, 6, 10:e25878.

- [92] Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, González-Paramás AM, Santos-Buelga C, Busco F, Quiles JL, Cordero MD, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M. One-month strawberry supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelets activation in humans. *J. Nutr. Biochem.* 2014, 25(3), 289-94.
- [93] Romandini S, Mazzoni L, Giampieri F, Tulipani S, Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Locorotondo N, D'Alessandro M, Mezzetti B, Bompadre S, Alvarez-Suarez JM. Effects of an acute strawberry (*Fragaria × ananassa*) consumption on the plasma antioxidant status of healthy subjects. *J. Berry Res.* 2013, 3, 169–79.
- [94] Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Battino M. Strawberry and human health: effects beyond antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2014c, 62 (18), 3867–76.
- [95] Wang, L. S.; Kuo, C. T.; Cho, S J.; Seguin, C.; Siddiqui, J.; Stoner, K.; Weng, Y. I.; Huang, T. H.; Tichelaar, J.; Yearsley, M.; Stoner, G. D.; Huang, Y. W. Black raspberry-derived anthocyanins demethylate tumor suppressor genes through the inhibition of DNMT1 and DNMT3B in colon cancer cells. *Nutr. Cancer* 2013, 65, 118–125.

[96] Atalay, M.; Gordillo, G.; Roy, S.; Rovin, B.; Bagchi, D.; Bagchi, M.; Sen, C. K. Antiangiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Lett.* 2003, 544, 252–257.

*[97] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 1999, 26, 1231-37.

[98] Pellegrini N, Re R, Yang M, Rice-Evans CA. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying the 2,2'-azobis(3-ethylenebenzothiazoline-6- sulfonic) acid radical cation decolorization assay. *Method. Enzymol.*, 1999, 299: 379-389.

[99] Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.*, 1977, 28: 49-55.

[100] Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxides radicals. *Food Chem.*, 1999, 64: 555-559.

[101] Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Agric. Food Chem.*, 2002, 50(10): 3010-4.

[102] Giusti M, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, F:F1:F1.2.

*[103] Maines MD, Costa LG, Reed DJ, Sassa S, Sipes IG. *Current Protocols in Toxicology*; Wiley: New York, 1998.

[104] Gasparriani, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., Alvarez- Suarez, J. M., Mazzoni, L., ... Battino, M. (2017). Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 1–10.

[105] Islam, M. S., Giampieri, F., Janjusevic, M., Gasparriani, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Mazzoni, L., ... Ciarmela, P. (2017). An anthocyanin-rich strawberry extract induces apoptosis and ROS while decreases glycolysis and fibrosis in human uterine leiomyoma cells. *Oncotarget*, 8(14), 23575– 23587.

[106] Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Forbes-Hernandez TY, Gasparriani M, González-Paramàs AM, Santos-Buelga C, Quiles JL, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. *Molecules*. 2014a, 19(6), 7798-816.

[107] Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Forbes-Hernandez TY, Gasparri M, González-Paramàs AM, Santos-Buelga C, Quiles JL, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M. An anthocyaninrich strawberry extract protects against oxidative stress damage and improves mitochondrial functionality in human dermal fibroblasts exposed to an oxidizing agent. *Food Funct.*, 2014b, 5(8):

[108] Giampieri F, Alvarez-Suarez M, Tulipani S, Gonzales-Paramas AM, Santos-Buelga C, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Photoprotective potential of strawberry (*Fragaria × ananassa*) extract against UV-A irradiation damage on human fibroblasts. *J. Agric. Food Chem.* 2012b, 60, 2322–27. 1939-48.

[109] Helsper JPF, de Vos CHR, Maas FM, Jonker HH, van den Broeck HC, Jordi W, Pot CS, Keizer LCP, Schapendonk AHCM. Response of selected antioxidants and pigments in tissues of *Rosa hybrida* and *Fuchsia hybrida* to supplemental UV-A exposure. *Physiol. Plantarum*, 2003, 117: 171–187.

www.salute.gov.it

www.airc.it

www.iss.it

www.fondazioneveronesi.it

www.freshplaza.it