



UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

CORSO DI LAUREA
Scienze Biologiche

**IN VITRO CHEMOPREVENTIVE PROPERTIES OF GREEN TEA,
ROOIBOS AND HONEYBUSH EXTRACTS IN SKIN CELLS**

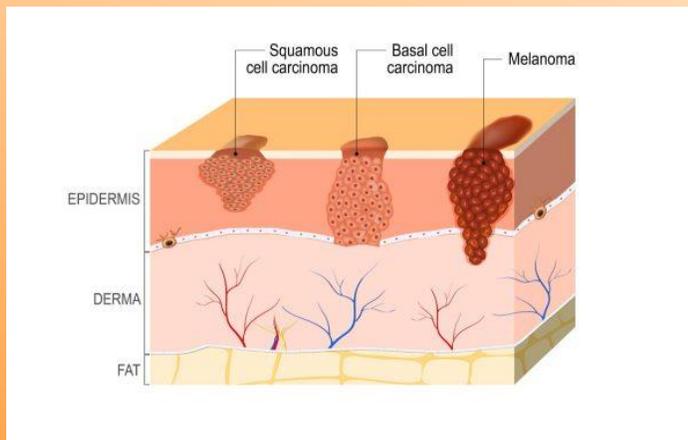
LAUREANDA
Michela Bardeggia

Anno Accademico
2019 /2020

RELATRICE
Prof.ssa Elisabetta Damiani

CANCRO ALLA PELLE

- Causato da raggi UVB
- Una diagnosi di cancro su tre
- Tipo: *melanoma* e *non-melanoma* (*carcinoma basocellulare* e *carcinoma a cellule squamose*)
- Stadi: *iniziazione*, *promozione*, *progressione*.
- Segni distintivi: iperproliferazione, trasformazione iperplastica, disregolazione apoptosi



TÈ VERDE (*Camellia sinensis*)

Variante di tè cinese le cui foglie non subiscono ossidazione.

Ricco di polifenoli (flavanoli e catechine, EGCG) che gli conferiscono proprietà chemopreventive ben studiate.



ROOIBOS (*Aspalathus linearis*)

HONEYBUSH (*Cyclopia* spp.)

Tè erbali di origine sudafricana.

Le loro proprietà anti-tumorali sono già state dimostrate su topi e correlate alla loro composizione di polifenoli.

SCOPO DELLO STUDIO

Considerando che le proprietà chemiopreventive di rooibos e honeybush erano già state dimostrate *in vivo* sulle cellule della pelle nei topi, i ricercatori a capo di questo studio desideravano determinare **l'attività antiproliferativa e proapoptotica degli estratti acquosi e al metanolo di *Aspalathus linearis* e di due specie di *Cyclopia in vitro*** tramite analisi su diverse colture cellulari.

Poiché numerosi studi avevano già riscontrato tali proprietà nel tè verde (*Camellia sinensis*), i suoi estratti sono stati utilizzati come riferimento durante le varie analisi sui tè erbali.

È stata inoltre caratterizzata la componente polifenolica presente negli estratti allo scopo di individuare possibili collegamenti fra questa e le alterazioni riscontrate nelle colture cellulari.



MATERIALI E METODI

- Estratti acquosi e al metanolo delle piante *C. sinensis*, *A. linearis*, *Cyclopia intermedia* e *subternata* che non avevano subito fermentazione.
- Colture cellulari derivanti da:
 - Cellule normali/non-maligne del tipo fibroblasti cutanei (CRL 7761)
 - Cellule premaligne del tipo cheratinociti spontaneamente immortalizzati (HaCat)
 - Cellule cancerose del tipo carcinoma basale (CRL 7762)



- **Tecniche utilizzate:**
 - BrdU chemiluminescent immunoassay kit
(proliferazione cellulare)
 - CellTiter-Glo Luminescent assay
(viabilità e attività apoptotica)
 - Staurosporine e colorante Hoechest
(alterazioni morfologiche)
 - Citometria a flusso
(apoptosi)
 - Cromatografia liquida ad alta prestazione
(caratterizzazione polifenoli)

ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA NEGLI ESTRATTI ACQUOSI E AL METANOLO

Table 1. Anti-proliferative activity (BrdU IC₅₀) of aqueous and methanol extracts of green tea and different herbal teas in skin cells.

Cell Type	Extract	Green Tea and Herbal Teas (mg/mL)			
		<i>C. sinensis</i>	<i>A. linearis</i>	<i>C. intermedia</i>	<i>C. subternata</i>
Premalignant cells	MeOH	0.035 ± 0.003 ^{c_A*}	0.037 ± 0.005 ^{c_A}	0.350 ± 0.077 ^{a_A}	0.190 ± 0.019 ^{b_A}
	Aq	0.045 ± 0.007 ^{c_B*}	0.068 ± 0.011 ^{c_B}	0.202 ± 0.037 ^{a_B}	0.164 ± 0.039 ^{b_A}
Normal cells	MeOH	0.063 ± 0.009^{c_A}	0.058 ± 0.014^{c_A}	0.151 ± 0.013 ^{b_A}	0.200 ± 0.025 ^{a_A}
	Aq	0.154 ± 0.021^{b_B}	0.208 ± 0.038^{a_B}	0.091 ± 0.022^{c_B}	0.098 ± 0.019^{c_B}
Cancer cells	MeOH	0.035 ± 0.012 ^{c_A}	0.016 ± 0.003 ^{d_A*}	0.150 ± 0.046 ^{b_A}	0.223 ± 0.030 ^{a_A}
	Aq	0.124 ± 0.025 ^{a_B}	0.048 ± 0.022 ^{b_B}	0.143 ± 0.037 ^{a_B}	0.158 ± 0.039 ^{a_B}

- **TÈ VERDE (*C. sinensis*)**

Estratti MeOH e Aq entrambi attivi contro la proliferazione cellulare (soprattutto l'estratto MeOH).

- **ROOIBOS (*A. linearis*)**

Estratto MeOH ha una spiccata attività antiproliferativa (in particolare su cellule cancerose).

Estratto Aq ha una minore attività antiproliferativa.

- **HONEYBUSH (*Cyclopia* spp.)**

Estratto MeOH ha una debole attività antiproliferativa.

Estratto Aq è il più attivo degli estratti di questo tipo contro la proliferazione cellulare.

INDUZIONE DELL'ATTIVITÀ PRO-APOPTOTICA DELLA CASPASI-3

Table 2. Dose response effects of methanol and aqueous extracts of green tea and rooibos on the pro-apoptotic activity as a function of cell viability (ATP production) in skin cells.

Tea/Herbal Tea	Cell Type	Units	Methanol Extract				Aqueous Extract	
<i>C. sinensis</i>	Premalignant cells	Extract (mg/mL)	0.080	0.050	0.035	0.170	0.114	0.038
		Caspase-3_Fold	5.75 ± 1.26 ^a	3.54 ± 1.00 ^a	1.14 ± 0.22 ^{c,*}	6.88 ± 1.65 ^a	4.94 ± 2.43 ^{a,b}	1.57 ± 0.76 ^{c,*}
		% ATP production	36.12 ± 6.90 ^c	49.08 ± 12.55 ^a	79.19 ± 7.79 ^a	47.49 ± 5.88 ^c	67.63 ± 3.81 ^b	83.67 ± 8.18 ^a
	Normal cells	Extract (mg/mL)	0.230	0.154	0.051	0.340	0.228	0.075
		Caspase-3_Fold	4.33 ± 0.68 ^a	1.98 ± 0.36 ^b	1.22 ± 0.18 ^{c,*}	5.58 ± 2.01 ^a	3.20 ± 1.47 ^b	1.07 ± 0.15 ^{c,*}
		% ATP production	28.58 ± 4.22 ^c	50.11 ± 1.50 ^b	82.37 ± 5.04 ^a	42.69 ± 14.23 ^c	60.64 ± 15.10 ^b	95.57 ± 26.22 ^a
Cancer cells	Extract (mg/mL)	0.210	0.141	0.047	0.410	0.275	0.091	
	Caspase-3_Fold	2.13 ± 0.25 ^a	1.79 ± 0.20 ^a	1.26 ± 0.37 ^{b,*}	1.55 ± 0.22 ^a	1.35 ± 0.12 ^a	1.13 ± 0.17 ^{b,*}	
	% ATP production	62.27 ± 8.70 ^c	75.41 ± 7.10 ^b	96.70 ± 8.59 ^a	58.92 ± 4.58 ^c	73.75 ± 6.09 ^b	88.35 ± 7.24 ^a	
<i>A. linearis</i>	Premalignant cells	Extract (mg/mL)	0.130	0.087	0.029	0.140	0.094	0.031
		Caspase-3_Fold	4.67 ± 0.63 ^a	3.06 ± 0.28 ^a	1.32 ± 0.40 ^{b,*}	4.89 ± 0.78 ^a	2.33 ± 0.59 ^b	1.24 ± 0.25 ^{c,*}
		% ATP production	41.74 ± 5.09 ^c	68.12 ± 3.27 ^b	83.04 ± 4.51 ^a	50.41 ± 5.35 ^b	69.76 ± 7.86 ^b	76.36 ± 6.61 ^a
	Normal cells	Extract (mg/mL)	0.260	0.174	0.058	0.290	0.194	0.060
		Caspase-3_Fold	2.91 ± 0.29 ^a	2.46 ± 0.30 ^a	1.57 ± 0.21 ^{b,*}	1.80 ± 0.22 ^a	1.71 ± 0.33 ^a	1.58 ± 0.44 ^{a,*}
		% ATP production	38.68 ± 5.91 ^b	54.29 ± 9.58 ^b	89.76 ± 10.73 ^a	41.09 ± 6.74 ^b	54.11 ± 6.55 ^b	78.65 ± 15.47 ^a
Cancer cells	Extract (mg/mL)	0.310	0.163	0.016	0.260	0.154	0.048	
	Caspase-3_Fold	1.98 ± 0.17 ^a	1.56 ± 0.19 ^b	1.30 ± 0.24 ^{b,*}	2.22 ± 0.25 ^a	1.86 ± 0.26 ^{a,b}	1.46 ± 0.39 ^{b,*}	
	% ATP production	54.53 ± 6.51 ^c	72.00 ± 5.23 ^b	90.60 ± 15.84 ^a	51.72 ± 2.39 ^c	63.19 ± 5.56 ^b	87.05 ± 6.65 ^a	

- Cyclopia spp.*: gli estratti Aq inducono l'attività della caspasi-3 ma solo a dosi elevate. Gli estratti MeOH di *C. intermedia* non hanno alcun effetto pro-apoptotico, quelli di *C. subternata* hanno un effetto di attivazione della caspasi-3 solo su cellule precancerose ad alte concentrazioni.

- Induzione dell'attività della caspasi-3 in maniera dose dipendente.
- C. sinensis*: estratti MeOH più attivi sulla caspasi-3 degli estratti Aq, attività simile su cellule cancerose.
- A. linearis*: effetto pro-apoptotico paritario fra estratti Aq e MeOH sulle tre tipologie cellulari e a diverse concentrazioni.

Herbal tea	Cell Type	Units	Methanol Extract			Aqueous Extract		
<i>C. intermedia</i>	Premalignant cells	Extract (mg/mL)	0.720	0.360	0.180	0.520	0.260	0.130
		Caspase-3 fold	1.12 ± 0.34 ^{a,*}	1.34 ± 0.29 ^{b,*}	1.17 ± 0.25 ^{a,*}	3.40 ± 0.95 ^a	1.81 ± 0.26 ^b	1.32 ± 0.18 ^{c,*}
		% ATP production	60.05 ± 12.31 ^b	72.21 ± 11.72 ^b	94.66 ± 4.73 ^a	39.08 ± 2.50 ^c	60.23 ± 8.09 ^b	78.90 ± 10.09 ^a
	Normal cells	Extract (mg/mL)	1.370	0.760	0.150	0.500	0.295	0.091
		Caspase-3 fold	1.09 ± 0.11 ^{a,*}	1.10 ± 0.18 ^{a,*}	0.98 ± 0.26 ^{a,*}	1.86 ± 0.61 ^a	1.42 ± 0.31 ^{a,b}	1.16 ± 0.26 ^b
		% ATP production	39.33 ± 4.46 ^c	61.95 ± 11.40 ^b	89.50 ± 20.60 ^a	38.13 ± 12.42 ^b	54.03 ± 11.80 ^b	80.35 ± 20.17 ^a
	Cancer cells	Extract (mg/mL)	1.290	0.84	0.38	0.440	0.291	0.143
		Caspase-3 fold	0.65 ± 0.17 ^c	0.94 ± 0.14 ^{b,*}	1.40 ± 0.23 ^a	1.69 ± 0.32 ^a	1.51 ± 0.13 ^a	1.32 ± 0.20 ^{b,*}
		% ATP production	49.57 ± 5.00 ^c	66.6 ± 7.97 ^b	95.48 ± 9.11 ^a	48.65 ± 8.56 ^b	63.32 ± 8.60 ^b	92.17 ± 8.98 ^a
<i>C. subternata</i>	Premalignant cells	Extract (mg/mL)	0.468	0.234	0.117	0.417	0.209	0.104
		Caspase-3 fold	1.73 ± 0.20 ^a	1.46 ± 0.12 ^a	1.10 ± 0.25 ^{b,*}	3.27 ± 1.00 ^a	2.03 ± 0.44 ^b	1.45 ± 0.22 ^{c,*}
		% ATP production	52.72 ± 10.24 ^c	71.09 ± 7.65 ^b	87.17 ± 9.40 ^a	50.33 ± 7.21 ^b	61.50 ± 8.53 ^b	75.80 ± 6.51 ^a
	Normal cells	Extract (mg/mL)	1.080	0.640	0.200	0.370	0.230	0.098
		Caspase-3 fold	1.25 ± 0.27 ^{a,*}	1.39 ± 0.37 ^{a,*}	1.14 ± 0.16 ^{a,*}	2.11 ± 0.61 ^a	1.77 ± 0.37 ^{a,b}	1.45 ± 0.27 ^{a,*}
		% ATP production	40.17 ± 6.89 ^c	64.71 ± 5.99 ^b	84.98 ± 8.28 ^a	49.96 ± 6.09 ^c	63.28 ± 7.45 ^b	80.42 ± 9.88 ^a
	Cancer cells	Extract (mg/mL)	1.140	0.680	0.223	0.430	0.294	0.158
		Caspase-3 fold increase	0.97 ± 0.26 ^{a,*}	1.04 ± 0.12 ^{a,*}	1.15 ± 0.06 ^{a,*}	1.45 ± 0.33 ^{a,*}	1.55 ± 0.35 ^{a,*}	1.28 ± 0.23 ^{a,*}
		% ATP production	36.09 ± 1.31 ^c	60.68 ± 3.46 ^b	76.79 ± 0.70 ^a	39.68 ± 2.28 ^c	66.38 ± 1.77 ^b	82.00 ± 8.73 ^a

RELAZIONE TRA EFFETTO PRO-APOPTOTICO E VIABILITÀ CELLULARE

ESTRATTI AL METANOLO

- *C. sinensis* e *A. linearis*: forte relazione negativa nelle tre tipologie cellulari.
- *C. subternata*: forte relazione negativa in cellule premaligne, moderata in cellule normali e nessuna correlazione in cellule cancerose.
- *C. intermedia*: moderata relazione negativa in cellule premaligne, nessuna correlazione in cellule normali e relazione moderata positiva in cellule cancerose.

ESTRATTI ACQUOSI

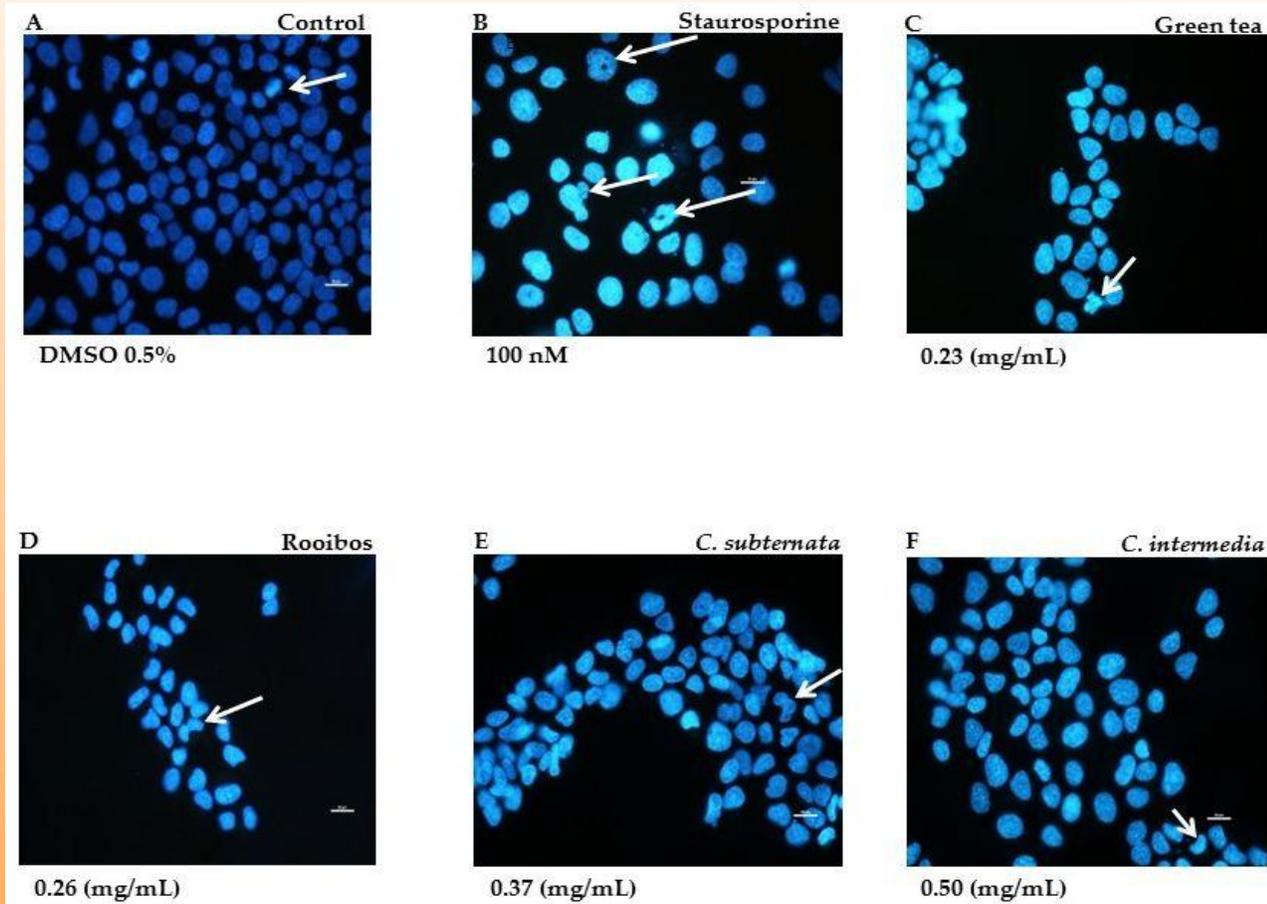
- *C. sinensis*: forte relazione negativa nelle tre tipologie cellulari.
- *A. linearis* e *Cyclopia* spp.: forte relazione negativa in cellule premaligne e normali, moderata su cellule cancerose.

Table 4. Correlation between caspase-3 activity and cell viability (ATP production) for cells treated with green tea and herbal tea extracts.

Tea/Herbal Tea	Methanol Extracts			Aqueous Extracts		
	Premalignant Cells	Normal Cells	Cancer Cells	Premalignant Cells	Normal Cells	Cancer Cells
<i>C. sinensis</i>	-0.881 (<0.0001)	-0.888 (<0.0001)	-0.800 (<0.0001)	-0.742 (<0.0001)	-0.878 (<0.0001)	-0.672 (<0.0001)
<i>A. linearis</i>	-0.881 (<0.0001)	-0.802 (<0.0001)	-0.769 (<0.0001)	-0.745 (=0.0001)	-0.547 (=0.0002)	-0.724 (<0.0001)
<i>C. subternata</i>	-0.841 (<0.0001)	-0.588 (=0.0004)	-	-0.783 (<0.0001)	-0.864 (<0.0001)	-0.554 (=0.0027)
<i>C. intermedia</i>	-0.527 (=0.0005)	-	0.479 (=0.0015)	-0.819 (<0.0001)	-0.699 (<0.0001)	-0.599 (<0.0001)

- Induzione dell'apoptosi da parte degli estratti di tè verde e tè erbali strettamente correlata alla riduzione della viabilità cellulare.
- Relazione inversa fra induzione dell'attività della caspasi-3 e presenza di ATP.

ALTERAZIONI MORFOLOGICHE IN CELLULE NORMALI ASSOCIATE ALL'INDUZIONE APOPTOTICA



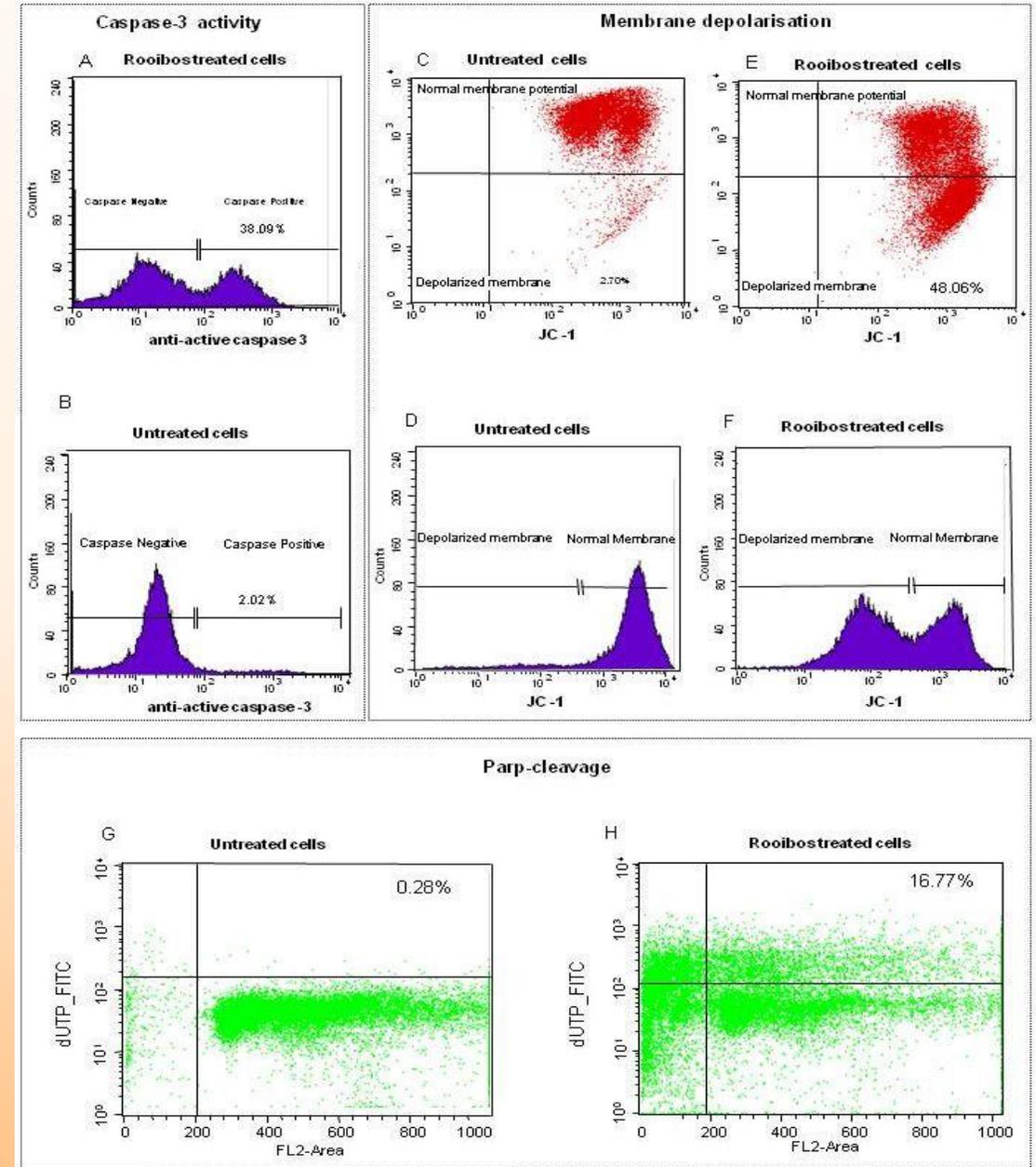
- CELLULE NORMALI:
colorazione blu a bassa intensità [A]
- CELLULE APOPTOTICHE:
colorazione blu brillante [B]
regioni nucleari non colorate [C]
nuclei di dimensioni ridotte [D]
strutture a mezza luna [E]
presenza di bleb nucleari [F]

*Trattamento dei campioni cellulari con
colorante nucleare Hoechst e Staurosporina (B)*

CARATTERIZZAZIONE TRAMITE CITOMETRIA A FLUSSO DI APOPTOSI INDOTTA DA ROOIBOS

Trattamento con estratto MeOH di rooibos (0,32 mg/mL)
[concentrazione IC50 per riduzione del contenuto di ATP]

- Oltre 30% delle cellule trattate presenta attivazione della caspasi-3 [A]
- Depolarizzazione della membrana mitocondriale con spostamento del JC-1 nel citoplasma [E,F]
- Frammentazione del DNA presente nelle cellule trattate [H]



DIFFERENZE NEL CONTENUTO DI POLIFENOLI

C. sinensis

- Contenuto di polifenoli (TP), flavanolo/proantocianidina (FLAVA), flavanoli monomerici (soprattutto catechine, EGCG) e caffeina ridotto in estratto Aq.
- Rapporto TP/FLAVA simile fra i due estratti.

A. linearis

- Contenuto di polifenoli monomerici ridotto in estratto Aq.
- Alto contenuto di diidrocalconi (DHC) in estratto MeOH.
- Rapporto TP/FLAVA più elevato che in *C. sinensis* (basso contenuto di FLAVA).

Cyclopia spp.

- Contenuto polifenoli monomerici (xantoni, esperidina) molto ridotto nell'estratto Aq.
- Rapporto TP/FLAVA molto ridotto in estratto Aq (basso contenuto di FLAVA) rispetto all'estratto MeOH.
- Rapporto TP/FLAVA più elevato in estratto al MeOH di *Cyclopia spp.* che in *C. sinensis* e *A. linearis*.

Table 5. Concentration of TP, FLAVA and monomeric polyphenolic compounds of the methanol and aqueous extracts of green tea and herbal teas expressed as the TP/FLAVA ratios.

Tea/Herbal Extracts	Polyphenols *	Concentration * (µg/mg Extract)		TP/FLAVA Ratio	
		Methanol	Aqueous	Methanol	Aqueous
<i>C. sinensis</i>	TP	256.5 ± 36.9 ^A	161.0 ± 20.8 ^B	1.94	2.07
	FLAVA	132.3 ± 3.4 ^A	77.6 ± 1.5 ^B		
	EGCG	111.9 ± 3.0 ^A	46.1 ± 1.5 ^B		
	Total flavanols	200.8 ± 6.2 ^A	100.0 ± 2.8 ^B		
<i>A. linearis</i>	TP	350.7 ± 35.0 ^A	250.5 ± 16.4 ^B	12.92	13.92
	FLAVA	27.1 ± 0.8 ^A	18.0 ± 0.6 ^B		
	DHC	151.8 ± 1.7 ^A	100.6 ± 1.8 ^B		
	Total_mono	209.1 ± 1.8 ^A	138.1 ± 3.6 ^B		
<i>C. intermedia</i>	TP	172.1 ± 4.1 ^A	164.5 ± 11.3 ^B	15.23	9.19
	FLAVA	11.3 ± 0.9 ^B	17.9 ± 0.9 ^A		
	Xanthones	87.8 ± 2.9 ^A	54.0 ± 0.8 ^B		
	Hesperidin	88.8 ± 11.6 ^A	7.3 ± 0.6 ^B		
Total_mono	186.2 ± 13.0 ^A	64.0 ± 0.6 ^B			
<i>C. subternata</i>	TP	220.5 ± 14.5 ^A	175.0 ± 24.1 ^B	16.96	7.64
	FLAVA	13.0 ± 0.6 ^B	22.9 ± 0.9 ^A		
	Xanthones	78.5 ± 1.3 ^A	30.7 ± 4.4 ^B		
	Hesperidin	63.1 ± 8.6 ^A	8.0 ± 0.2 ^B		
Total_mono	174.4 ± 9.0 ^A	51.3 ± 4.5 ^B			

CONCLUSIONI

Dopo aver analizzato gli estratti acquosi e al metanolo di tè verde (*C. sinensis*), rooibos (*A. linearis*) e honeybush (*Cyclopia* spp.) a diverse concentrazioni, le loro componenti polifenoliche e i loro effetti su attività come la proliferazione cellulare e l'induzione all'apoptosi, il team di ricerca ha concluso che:

- Gli estratti (Aq e MeOH) di rooibos e gli estratti acquosi di honeybush alterano la crescita cellulare in modalità simili a quelle esibite dagli estratti del tè verde con distruzione delle attività metaboliche cellulari tramite depolarizzazione della membrana mitocondriale.
- A basse concentrazioni degli estratti la proliferazione viene inibita mentre ad alte è indotta l'apoptosi con target primario sulle cellule precancerose.
- L'attività antiproliferativa di *C. sinensis* e *A. linearis* è ricollegabile ai flavonoidi monomerici mentre in *Cyclopia* spp. è legata alle componenti simili alle proantocianidine polimeriche.
- L'estratto al metanolo di honeybush, al contrario, presenta un'attività protettiva sulla proliferazione cellulare ricollegabile alla componente dei polifenoli monomerici.

Grazie per l'attenzione!