



Articolo

L'estratto di foglie di olivo ha effetti antitumorali contro il neuroblastoma attraverso l'inibizione della proliferazione cellulare e l'induzione dell'apoptosi

Fabio Morandi ^{1,†}, Veronica Bensa ^{2,†}, Enzo Calarco ², Fabio Pastorino ², Patrizia Perri ², Maria Valeria Corrias ², Mirco Ponzoni ² e Chiara Brignole ^{2,*}

- ¹ Laboratorio di Cellule Staminali e Centro di Terapia Cellulare, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italia; fabiomorandi@gaslini.org
- ² Laboratorio di Terapie Sperimentali in Oncologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, 16147 Genova, Italia; veronicabensa@gaslini.org (VB); enzocalarco@gaslini.org (CE); fabiopastorino@gaslini.org (FP); patriziaperrri@gaslini.org (PP); mariavaleriacorrias@gaslini.org (MVC); microponzoni@gaslini.org (MP)
- * Corrispondenza: chiarabrignole@gaslini.org ; Tel.: +39-10-56363533 † Questi autori hanno contribuito in egual modo a questo lavoro.

Astratto: Il neuroblastoma (NB) è il tumore solido extracranico più diffuso in età pediatrica. La prognosi per i pazienti con NB ad alto rischio rimane sfavorevole e sono auspicabili nuove strategie di trattamento. L'estratto di foglie di olivo (OLE) è costituito da composti fenolici, i cui effetti benefici per la salute sono stati riportati. Qui, gli effetti antitumorali dell'OLE sono stati studiati in vitro su un pannello di linee cellulari NB in termini di (i) riduzione della vitalità cellulare; (ii) inibizione della proliferazione cellulare mediante arresto del ciclo cellulare; (iii) induzione dell'apoptosi; e (iv) inibizione della migrazione cellulare. Inoltre, sono stati eseguiti anche esperimenti di citotossicità, combinando OLE con il chemioterapico topotecan. L'OLE ha ridotto la vitalità cellulare delle cellule NB in modo dipendente dal tempo e dalla dose nei modelli 2D e 3D. Le cellule NB esposte a OLE hanno subito l'inibizione della proliferazione cellulare, caratterizzata da un arresto della progressione del ciclo cellulare in fase G0/G1 e dall'accumulo di cellule in fase sub-G0, caratteristica della morte apoptotica. Ciò è stato confermato da un aumento dose-dipendente delle cellule di annessina V+ (particolare dell'apoptosi) e dalla sovraregolazione dei livelli proteici delle caspasi 3 e 7. Inoltre, OLE ha inibito la migrazione delle cellule NB. Infine, l'efficacia antitumorale del chemioterapico topotecan, in termini di riduzione della vitalità cellulare, è stata notevolmente potenziata dalla sua combinazione con OLE. In conclusione, OLE ha attività antitumorale contro NB inibendo la proliferazione e la migrazione cellulare e inducendo l'apoptosi. Ciò è stato confermato da un aumento dose-dipendente delle cellule di annessina V+ (particolare dell'apoptosi) e dalla sovraregolazione dei livelli proteici delle caspasi 3 e 7. Inoltre, OLE ha inibito la migrazione delle cellule NB. Infine, l'efficacia antitumorale del chemioterapico topotecan, in termini di riduzione della vitalità cellulare, è stata notevolmente potenziata dalla sua combinazione con OLE. In conclusione, OLE ha attività antitumorale contro NB inibendo la proliferazione e la migrazione cellulare e inducendo l'apoptosi.



Citazione: Morandi, F.; Bensa, V.; Calarco, E.; Pastorino, F.; Perri, P.; Corrias, MV; Ponzoni, M.; Brignole, C. L'estratto di foglie di olivo ha effetti antitumorali contro Neuroblastoma attraverso l'inibizione della proliferazione cellulare e l'induzione dell'apoptosi. *Nutrienti* **2021**, *13*, 2178. <https://doi.org/10.3390/nu13072178>

Redattrice accademica: Sadia Afrin

Ricevuto: 10 giugno 2021

Accettato: 21 giugno 2021

Pubblicato: 24 giugno 2021

Parole chiave: estratto di foglie di olivo; sostanze fitochimiche; neuroblastoma; effetti antitumorali; combinazione di farmaci

Nota dell'editore: MDPI rimane neutrale rispetto alle rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e nelle affiliazioni istituzionali.



Diritto d'autore: © 2021 dagli autori. Licenziario MDPI, Basilea, Svizzera. Questo articolo è un articolo ad accesso aperto distribuito secondo i termini e le condizioni della licenza Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduzione

Il neuroblastoma (NB), un tumore pediatrico derivato dalla cresta neurale, è il più comune tumore solido extracranico dell'infanzia, rappresentando circa il 7% di tutti i tumori maligni diagnosticati al di sotto dei 15 anni [1,2]. È il tumore più comune diagnosticato durante il primo anno di vita, con un'età media alla diagnosi di 17 mesi [2]. Un'ampia eterogeneità clinica caratterizza la malattia NB, che va dai casi di regressione spontanea a una malattia altamente metastatica già alla diagnosi. Sulla base della stadiazione della malattia e della valutazione dei fattori di rischio, il gruppo internazionale di rischio NB (INRG) stratifica i pazienti in rischio molto basso, basso, intermedio e alto. Questa classificazione riguarda il tipo di trattamento da intraprendere [3]. Ad oggi, la prognosi per i pazienti affetti da NB ad alto rischio rimane sfavorevole. Infatti, nonostante l'applicazione di un programma di trattamento intensivo, che prevede una fase di chemioterapia di induzione seguita da intervento chirurgico, terapia mieloablattiva combinata con trapianto di cellule staminali ematopoietiche e radioterapia locale, e mantenimento con anticorpi anti-disialoganglioside (GD2) più isotrenoina, il tasso di sopravvivenza ad alto rischio

NB pazienti è inferiore al 50% [3]. Questo scenario sfida i ricercatori a scoprire nuove terapie per supportare i regimi di trattamento standard di cura, con l'obiettivo di migliorare l'esito clinico di questi bambini.

I composti naturali hanno rappresentato per lungo tempo la principale fonte di agenti terapeutici [4]. Storicamente, sono stati ampiamente impiegati per la prevenzione e la cura di malattie sia fisiche che mentali [5]. Inoltre, sono stati anche di fondamentale importanza nella scoperta di farmaci [6]. È interessante notare che molti dei farmaci approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e/o dall'Agenzia medica europea (EMA) sono basati su derivati vegetali [7]. Gli alcaloidi della Vinca, derivati dalla pianta pervinca *Catharanthus roseus* e il terpeno Paclitaxel da *Taxus baccata*, sono tra gli agenti terapeutici di origine vegetale di maggior successo approvati per l'uso clinico in oncologia [8].

Il concetto di utilizzare derivati naturali, dotati di proprietà bioattive, come integratore alimentare per mantenere il benessere, migliorare la salute e lo stile di vita, migliorare e sostenere le risposte immunitarie, nonché prevenire e/o curare condizioni patologiche è tornato in gli ultimi anni. Di conseguenza, l'industria farmaceutica ha investito enormi risorse, economiche e non, portando a un settore industriale in forte espansione [9].

Le molecole bioattive di origine vegetale, chiamate anche sostanze fitochimiche, sono ampiamente distribuite all'interno di frutta, semi, verdure, legumi e foglie. È stato riportato che la dieta mediterranea contribuisce al benessere e ha effetti protettivi contro le malattie neurodegenerative e cardiovascolari, nonché contro il cancro [10–12]. Nello specifico, il consumo di olio extra vergine di oliva (EVOO) nella dieta porta a effetti protettivi nella popolazione mediterranea. Queste proprietà benefiche possono essere attribuite all'alto contenuto di molecole bioattive, la maggior parte delle quali sono composti fenolici (ad esempio, oleuropeina, tirosolo e idrossitirosolo), all'interno di EVOO [13]. È interessante notare che l'estratto di foglie di olivo (OLE) è caratterizzato da una concentrazione ancora più elevata di composti fenolici rispetto all'EVOO [13]. Infatti, le foglie di olivo sono costituite principalmente da secoiridoidi (es. oleuropeina, dimetiloleuropeina), flavonoidi (es. apigenina e luteolina), oltre che da altri fenoli (es. idrossitirosolo, tirosolo).

È stato dimostrato che i composti fenolici contenuti nell'OLE sono responsabili dell'inibizione della proliferazione cellulare e dell'induzione dell'apoptosi, in vitro, in diversi modelli di tumore (cioè cancro al seno, tumore al pancreas e leucemia) [13–16]. Inoltre, l'OLE migliora la risposta delle cellule di glioblastoma ai trattamenti standard modulando l'espressione dei miRNA [17]. Con questo background, abbiamo qui studiato gli effetti antitumorali e i relativi meccanismi d'azione di OLE in modelli monostrato (2D) e tridimensionali (3D) di NB in vitro. Inoltre, gli effetti della combinazione di OLE con topotecan, che è un chemioterapico utilizzato per il trattamento di pazienti NB recidivanti/refrattari ad alto rischio (Topotecan più Temozolomide, protocollo TOTEM, [18]), sono stati anche esaminati.

2. Materiali e metodi

2.1. Linee cellulari

Linee cellulari NB umane (HTLA-230, IMR-32, SH-SY5Y e SK-N-AS [19–22]), cellule HA-CAT (cheratinociti umani [23]) e B-end (cellule endoteliali cerebrali murine [24]) sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) e RPMI-1640 addizionato con 10% di siero fetale bovino inattivato al calore (FBS), 50 IU/mL di penicillina G, 50 µg/mL di streptomicina solfato e 2 mM di L-glutammina. Le cellule sono state periodicamente testate per la contaminazione da micoplasmi mediante saggio di reazione a catena della polimerasi (PCR), e caratterizzate dalla proliferazione cellulare e dalla valutazione della morfologia, e anche autenticate mediante profili di ripetizione multiplex short-tandem da BMR Genomics (Padova, Italia).

2.2. Estratto di foglie di olivo (OLE)

In questo studio, abbiamo utilizzato un estratto acquoso di foglie di olivo (OLE; OLIVUM, EvergreenLife, San Giovanni al Natisone, Italia), che contiene oleuropeina, idrotirosolo, tirosolo, acido elenolico e rutina, come valutato grazie alla cromatografia liquida ad alte prestazioni-

spettrometria di massa (HPLC-MS) da parte dei produttori. La concentrazione media di ogni singolo elemento è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Concentrazione media di sostanze fitochimiche contenute in OLE.

Composto	Concentrazione media
oleuropeina	2656 mg/l
Idroitirosolo	213 mg/l
tirosolo	174 mg/l
Acido Elenolico	1393 mg/l
rutina	237 mg/l

2.3. Proliferazione cellulare: carbossifluoresceina succinimidil estere (analisi CFSE)

NB le linee cellulari sono state etichettate con CFSE, seguendo le istruzioni del produttore (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) e poi seminato in piastre a 6 pozzetti ($1,8-2.8 \times 10^5$ cellule/pozzetto, a seconda della linea cellulare utilizzata). Il giorno dopo la semina, le cellule sono state trattate con dosi crescenti (50-300 μ M) di OLE, che sono stati somministrati in base alla concentrazione di oleuropeina all'interno dell'estratto. Dopo 72 ore (h) di trattamento, le cellule sono state raccolte e analizzate mediante citometria a flusso (FCM).

2.4. Apoptosi: dosaggio dell'annexina-V

Le linee cellulari NB sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ($1,8-2.8 \times 10^5$ cellule/pozzetto, a seconda della linea cellulare utilizzata). Il giorno dopo la semina, le cellule sono state trattate con OLE (50-300 μ M). Dopo 72 ore, le cellule sono state raccolte e processate per il rilevamento dell'apoptosi mediante il kit Annexin V-FITC (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), seguendo le istruzioni del produttore. In alcuni esperimenti, le cellule, prima di essere trattate con OLE, sono state pretrattate con l'inibitore delle pan-caspasi Q-VD-OPh (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 30 μ M per 30 min.

2.5. Citotossicità

2.5.1. Saggio di vitalità cellulare del sale di tetrazolio (MTS) in coltura 2D

Le linee cellulari NB e le cellule di controllo sane (HA-CAT e B-end) sono state seminate in piastre a 96 pozzetti ($4-9.6 \times 10^3$ cellule/pozzetto, a seconda della linea cellulare utilizzata). Il giorno dopo la semina, le cellule sono state trattate con OLE, in quadruplicato per ogni condizione sperimentale, come già dettagliato sopra. Dopo 48-120 ore, le cellule sono state processate per determinare gli effetti citotossici mediati dal trattamento con OLE. È stato utilizzato il dosaggio del composto di tetrazolio MTS, secondo le istruzioni del produttore (CellTiter 96® Saggio di proliferazione cellulare in soluzione acquosa, Promega Italia, Milano, Italia). Il composto MTS tetrazolio viene convertito da cellule metabolicamente attive per produrre un formazano colorato, la cui quantità è proporzionale al numero di cellule vitali. In alcuni esperimenti, linee cellulari NB e cellule di controllo sane sono state trattate con OLE per 18 ore (ovvero esperimenti di "trattamento breve"). Quindi, l'OLE è stato rimosso e le cellule sono state recuperate con terreno completo fresco per altre 54 e 102 ore. Al punto finale, rispettivamente 72 e 120 ore, è stato utilizzato il test MTS.

In una serie separata di esperimenti, le cellule NB seminate come descritto sopra sono state trattate con una combinazione di OLE e topotecan (TOPO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le dosi di TOPO sono state scelte sulla base della letteratura [25]. Dopo 96 ore di trattamento, le cellule sono state sottoposte al test MTS per determinare gli effetti citotossici. Quindi, i risultati sono stati analizzati mediante l'uso del software online Compusyn (disponibile su <http://www.combosyn.com> (consultato il 10 giugno 2021)), Combosyn, Inc., Paramus, NJ, USA), con l'obiettivo di valutare il sinergismo, la dipendenza e/o l'antagonismo tra OLE e TOPO.

2.5.2. CellTiter-Glo® Saggio nella coltura 3D

Le linee cellulari NB IMR-32 e SH-SY5Y (2×10^3 e 1×10^3 , rispettivamente) sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti a bassissimo attaccamento (Corning, Steuben, NY, USA). Dopo tre giorni

coltura, quando si è formato un singolo sferoide per pozzetto, le cellule sono state trattate continuamente in quadruplicato per ogni condizione sperimentale, con OLE come già descritto sopra. Dopo 72 e 120 ore, gli sferoidi sono stati trasferiti in piastre a 96 pozzetti con pareti nere e analizzati per la determinazione della vitalità cellulare attraverso il CellTiter-Glo® Saggio di vitalità cellulare 3D (Promega, Italia, Milano, Italia).

Gli sferoidi tumorali sono stati utilizzati anche per valutare la potenziale combinazione di OLE e TOPO in termini di riduzione della vitalità cellulare. La combinazione di OLE e TOPO, che porta al miglior risultato nel modello 2D (OLE 200µM + TOPO 10 nM), è stato utilizzato come test di prova del concetto nel modello 3D. Come già descritto in precedenza, il trattamento è stato somministrato in continuo quando si è formato un singolo sferoide per pozzetto. Dopo 96 ore, è stata determinata la vitalità cellulare di ogni sferoide tumorale.

2.6. Analisi del ciclo cellulare

Le linee cellulari NB (IMR-32 e HTLA-230) sono state seminate in piastre a 6 pozzetti ($2,8 \times 10^5$ e 3×10^5 celle/pozzetto, rispettivamente). Il giorno dopo la semina, le cellule sono state trattate con 200 e 300µM di OLE. Quindi, 72 ore dopo, le cellule sono state raccolte ed etichettate con Nuclear Green CCS1 (abcam, Cambridge, Regno Unito) per monitorare la progressione del ciclo cellulare nelle cellule vive. Secondo le istruzioni del produttore, le cellule sono state incubate con Nuclear Green per 1 ora a 37°C. Quindi, la progressione del ciclo cellulare è stata valutata mediante FCM.

2.7. Segnalazione

Le linee cellulari NB sono state seminate in piastre da 6 pozzetti, come già menzionato sopra. Il giorno dopo la semina, le cellule sono state trattate con 200 e 300µM di OLE, come già descritto sopra. Dopo 72 ore di trattamento, le cellule sono state raccolte ed elaborate per la valutazione della segnalazione cellulare mediante FCM. In particolare, è stata determinata l'espressione di caspasi scissa 3, caspasi scissa 7, caspasi scissa 8, p53, ciclina D1, Bcl-2, fosfo-Bcl-2, NF-kB p65 e fosfo-NF-kB p65, secondo le istruzioni del produttore (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA).

2.8. Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Per la rilevazione dei ROS totali, le linee cellulari NB (IMR-32 e HTLA-230) sono state marcate con H2DCFDA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) secondo protocolli precedentemente pubblicati [26], e seminato in piastre nere a 96 pozzetti con fondo trasparente (2×10^4 cellule/pozzetto). L'H2DCFDA è un colorante non fluorescente permeabile alle cellule che in presenza di ROS si ossida diventando fluorescente verde. Il giorno dopo la semina, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di OLE. Dopo 24 ore di esposizione a OLE, le piastre sono state centrifugate (1400 rpm per 7 min). Quindi, le cellule sono state lavate e recuperate con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS). La produzione di ROS è stata determinata misurando la fluorescenza verde (485 nm/535 nm, eccitazione/emissione).

2.9. Migrazione: Scratch Test

Le linee cellulari NB IMR-32 e SH-SY5Y (8×10^5 e 4.5×10^5 , rispettivamente) sono stati seminati in piastre da 6 pozzetti. Due giorni dopo la semina, quando le cellule erano quasi confluenti, è stata praticata una ferita verticale attraverso il monostrato cellulare, utilizzando un 200µPuntale per pipetta a L. Quindi, le cellule sono state trattate con OLE (200 e 300µM). Al momento del trattamento (T0) e a 4, 24, 36 e 48 ore, le cellule sono state fotografate e l'ampiezza del graffio è stata determinata e registrata mediante l'uso del software ImageJ (Rasband, WS; ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012; accesso: 2019–2020).

2.10. Statistiche

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti almeno tre volte con risultati simili. Ogni condizione sperimentale, per i saggi eseguiti in piastre da 96 pozzetti, è stata eseguita in quadruplicato.

I risultati differenziali tra i gruppi sperimentali sono stati determinati dall'analisi unidirezionale della varianza, con il test di confronto multiplo di Tukey, utilizzando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software v5.0, San Diego, CA, USA). Le differenze di pendenza del saggio di migrazione sono state determinate mediante l'uso di GraphPad Prism 5.

3. Risultati

3.1. L'estratto di foglie di olivo (OLE) ha effetti citotossici su un pannello di linee cellulari NB

Gli effetti citotossici dell'OLE sono stati valutati in vitro su un pannello di linee cellulari NB umane. Figura 1 mostra che tutte le cellule NB analizzate sono sensibili al trattamento OLE, in misura diversa e in modo dose-dipendente. In particolare, la vitalità cellulare delle cellule IMR-32 e HTLA-230 è stata ridotta dalla dose più bassa di OLE, mentre solo le concentrazioni più elevate di OLE hanno influenzato significativamente la vitalità cellulare di SH-SY5Y e SK-N-AS.

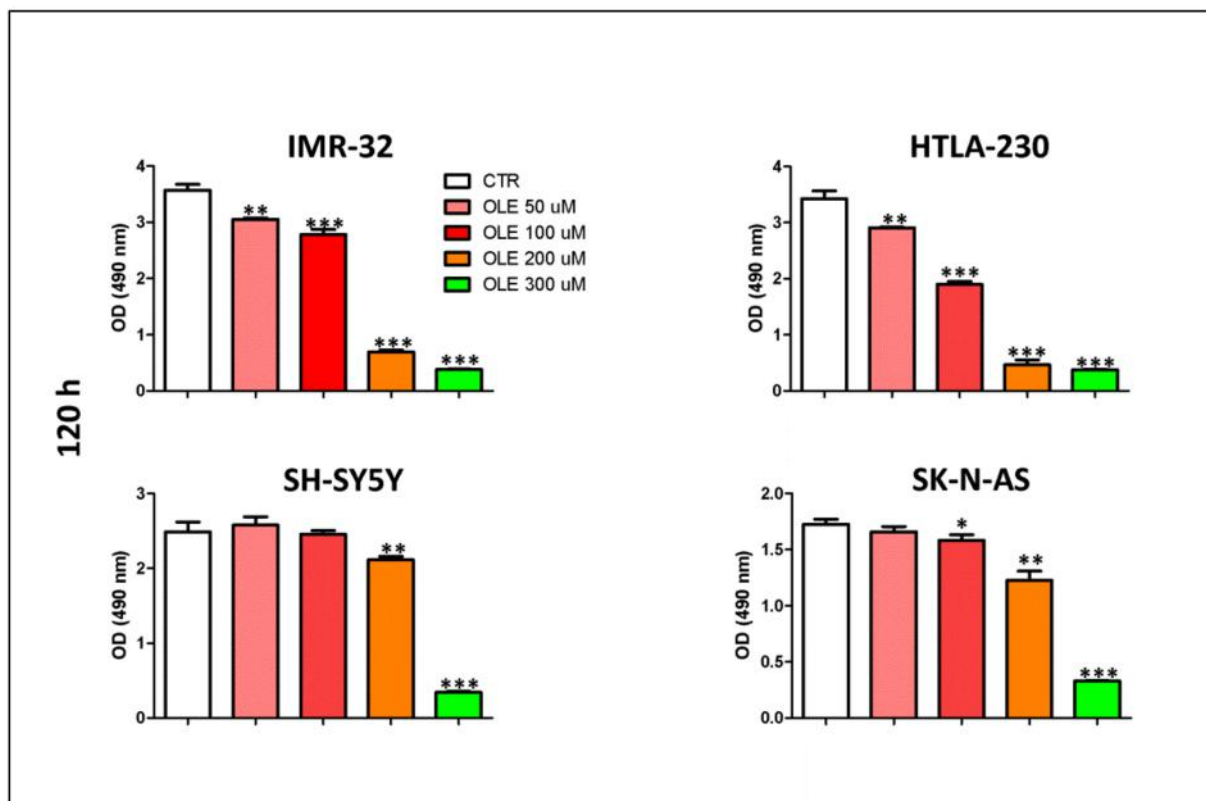


Figura 1. Effetti dose-dipendenti del trattamento OLE sulla vitalità cellulare delle cellule NB. I dati rappresentano i risultati dei test MTS eseguiti dopo 120 ore di trattamento OLE. La densità ottica (OD, a 490 nm) è stata registrata mediante l'uso del lettore di micropiastre TECAN, Infinite 200 (Tecan Life Sciences). I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ contro CTR). CTR: controllo; OLE: estratto di foglie di olivo; μ M: micromolare; nm: nanometro; h: ore.

Un esperimento a tempo, focalizzato solo sulle due dosi principalmente efficaci (200 e 300 μ M), è stato ulteriormente eseguito. Figura 2 mostra che l'OLE ha influenzato la vitalità cellulare delle cellule NB anche in modo dipendente dal tempo. Le linee cellulari IMR-32 e HTLA-230 erano, come previsto, più sensibili al trattamento OLE rispetto a SH-SY5Y e SK-N-AS, la cui vitalità cellulare era ridotta solo dopo un tempo più lungo di esposizione all'OLE.

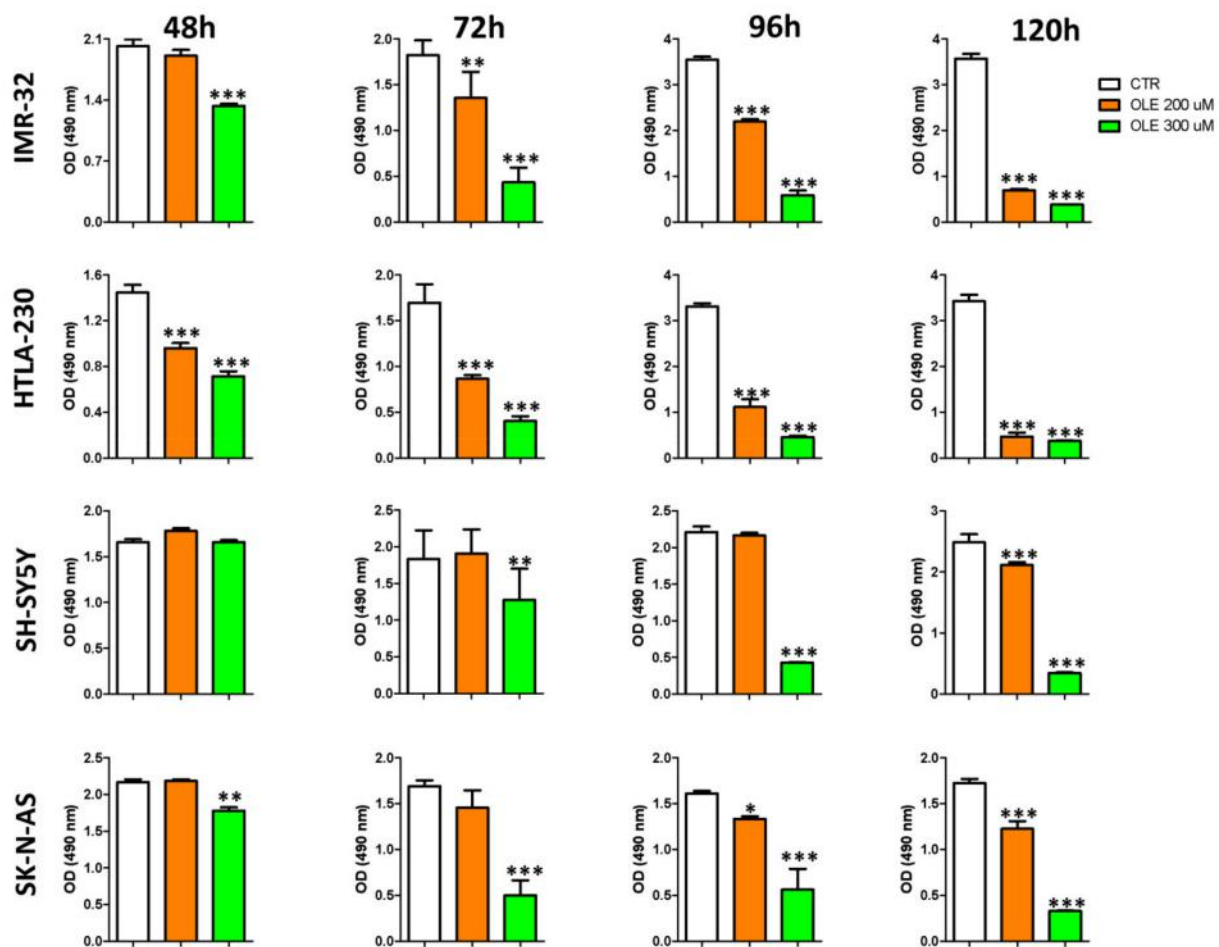


Figura 2. Effetti dipendenti dal tempo del trattamento OLE sulla vitalità cellulare delle cellule NB. Il test MTS è stato eseguito dopo 48, 72, 96 e 120 ore di trattamento con OLE. La densità ottica (OD, a 490 nm) è stata registrata mediante l'uso del lettore di micropiastre TECAN, Infinite 200 (Tecan Life Sciences). I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ contro CTR). CTR: controllo; OLE: estratto di foglie di olivo; μ M: micromolare; h: ore; nm: nanometro.

Esperimenti condotti su linee cellulari sane (B-end e HA-CAT) hanno rivelato che solo il 300 μ M di OLE ha determinato una moderata riduzione della vitalità cellulare in una delle due linee cellulari di controllo testate dopo un lungo tempo di esposizione (120 h; Figura supplementare S1).

Contabilità per la potenziale limitazione dell'uso in vivo di OLE a μ M concentrazioni nella gestione della malattia NB, sono stati eseguiti esperimenti di trattamento breve. Come illustrato nella Figura supplementare S2A,B, l'esposizione a breve trattamento è stata quasi inefficace contro le cellule di controllo sane, mentre le cellule NB esposte per 18 ore a OLE hanno subito una significativa riduzione dose-dipendente della vitalità cellulare in entrambi gli endpoint analizzati.

Gli esperimenti sono stati eseguiti anche in un sistema di coltura 3D, che ricorda le caratteristiche peculiari dei tumori solidi e riflette e prevede meglio la risposta a una data terapia. Figura 3 mostra i risultati di esperimenti citotossici condotti su sferoidi tumorali IMR-32 e SH-SY5Y. OLE ha mantenuto la sua capacità di ridurre significativamente la vitalità cellulare degli sferoidi NB in modo dose e tempo dipendente alle due dosi principalmente efficaci (200 e 300 μ M).

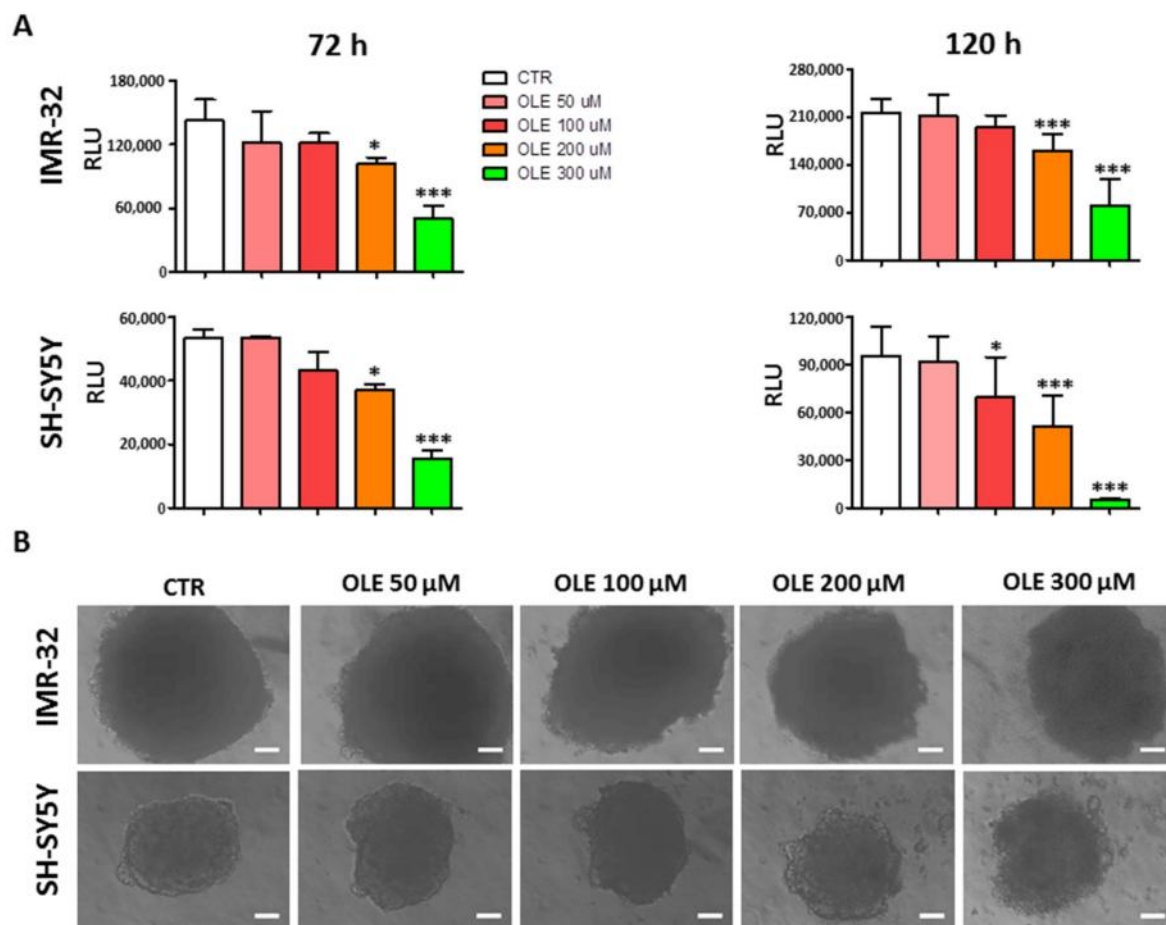


Figura 3. Effetti dipendenti dalla dose e dal tempo del trattamento OLE sulla vitalità degli sferoidi NB. **(UN)** Vitalità cellulare determinata in momenti indicati, grazie al CellTiter-Glo® Saggio di vitalità cellulare 3D. La luminescenza, prodotta solo da cellule metabolicamente attive, è stata registrata da TECAN Infinite 200 e registrata come unità di luminescenza relativa (RLU). I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ contro CTR). **(B)** Immagini rappresentative di microscopia a contrasto di fase di sferoidi prese a 120 h dopo il trattamento OLE. È stato utilizzato il programma di elaborazione ImageJ. Barra della scala: 100 μ m. CTR: controllo; OLE: estratto di foglie di olivo; μ M: micromolare; h: ore.

3.2. OLE inibisce la proliferazione cellulare delle linee cellulari NB attraverso un arresto del ciclo cellulare G0/G1

Le linee cellulari NB trattate con dosi crescenti di OLE per 72 h hanno subito una riduzione dose-dipendente della proliferazione cellulare, come valutato dal saggio CFSE (Figura 4UN). Anche in questo caso, tale effetto è stato ottenuto principalmente con 200 e 300 μ M di OLE ed era più evidente nelle cellule IMR-32 e HTLA-230 rispetto alle cellule SH-SY5Y e SK-N-AS. Pertanto, la progressione del ciclo cellulare è stata ulteriormente studiata nelle due precedenti linee cellulari. Entrambe le cellule IMR-32 e HTLA-230 sono andate a un arresto del ciclo cellulare G0/G1 dopo 72 ore di trattamento con 200 e 300 μ M di OLE (Figura 4B). A ciò si è accompagnata la quasi completa scomparsa della fase S e la progressiva riduzione della fase G2/M in entrambe le linee cellulari analizzate. Inoltre, a seguito dell'arresto del ciclo cellulare G0/G1, il trattamento con OLE ha determinato un aumento significativo delle cellule nella fase sub-G0 (Figura 4B). Inoltre, l'arresto G0/G1 era correlato con una sovraregolazione dose-dipendente dell'espressione della proteina p53 wild-type e della ciclina-D1 (Figura supplementare S3A, B).

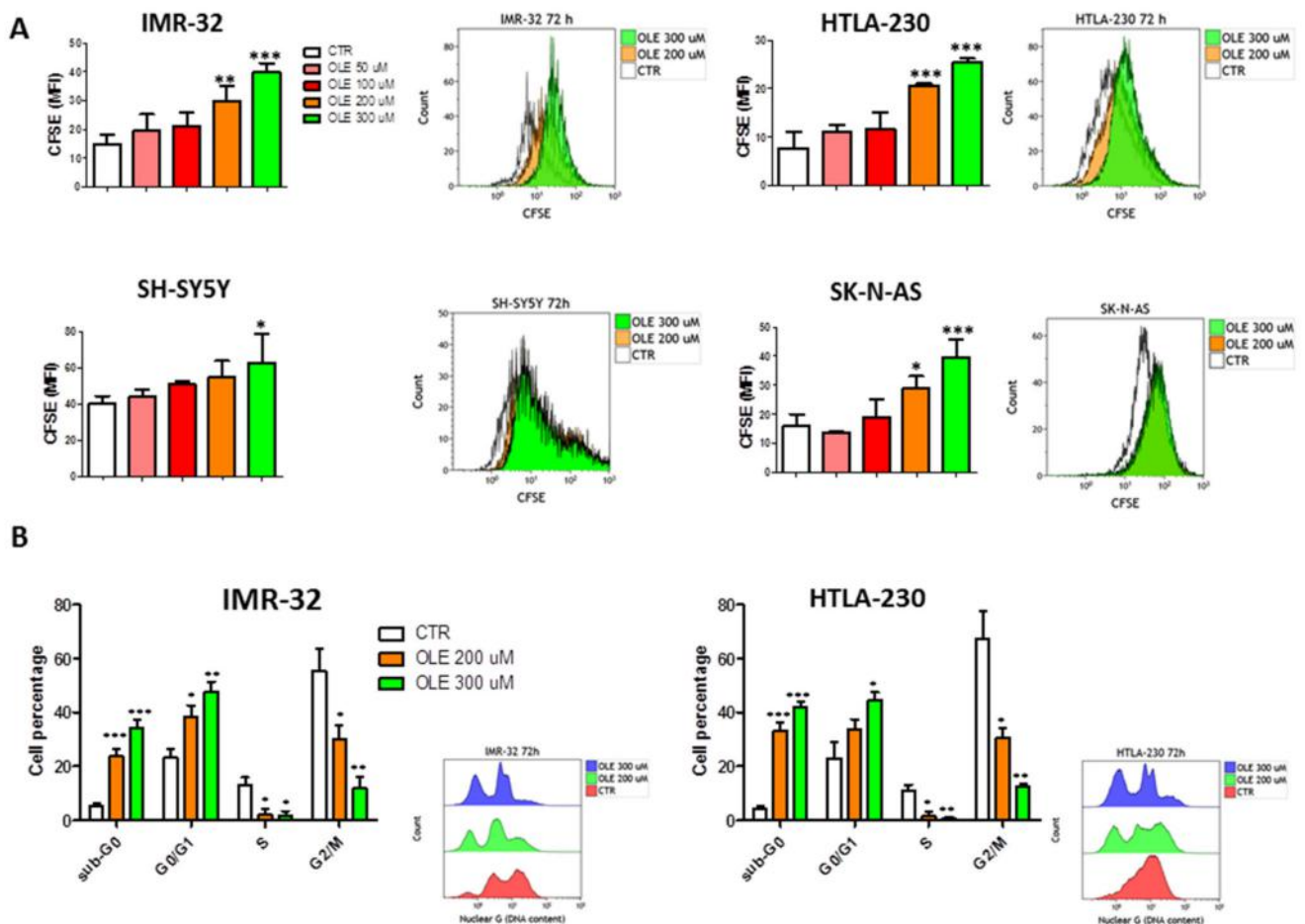


Figura 4. Inibizione della proliferazione cellulare, attraverso un arresto del ciclo cellulare G0/G1, mediata dal trattamento con OLE. **(UN)** L'intensità di fluorescenza verde di Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) è stata registrata mediante FCM. Secondo la diluizione del colorante, più fluorescenza significa meno proliferazione. I riquadri mostrano esperimenti FCM rappresentativi del saggio CFSE. **(B)** Progressione del ciclo cellulare di IMR-32 e HTLA-230 determinata dall'etichettatura Nuclear Green. Gli inserti mostrano un saggio di progressione del ciclo cellulare rappresentativo, analizzato da FCM. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0,05$, * $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ contro CTR). CTR: controllo; OLE: estratto di foglie di olivo; uM: micromolare; MFI: intensità di fluorescenza media.

3.3. OLE induce l'apoptosi delle cellule NB

Sono stati eseguiti ulteriori esperimenti per valutare se la percentuale crescente di cellule sub-G0 (ovvero apoptotiche) dopo l'esposizione a OLE fosse correlata all'induzione dell'apoptosi nelle cellule NB. Come mostrato in figura 5A e nella Figura supplementare S4A, le cellule trattate con OLE hanno subito un'apoptosi dose-dipendente, come sottolineato dall'aumentata percentuale di cellule Anx-V+, che era significativa, rispetto alle cellule di controllo, alle dosi più elevate di OLE utilizzate. Inoltre, in tutte le linee cellulari NB analizzate, il trattamento con OLE ha portato ad un'attivazione dose-dipendente delle caspasi carnefici 3 e 7 (Figura 5B,C e Figura supplementare S4B,C). Infine, la morte cellulare apoptotica indotta dal trattamento OLE è stata significativamente salvata dal pretrattamento delle cellule con l'inibitore delle pan-caspasi Q-VD-OPh, supportando ulteriormente i risultati ottenuti (Figura supplementare S5A, B). Sono stati condotti esperimenti per valutare le vie di segnalazione coinvolte nella morte cellulare apoptotica. L'aumento significativo dei livelli di espressione della proteina caspasi 8 scissa indica chiaramente il coinvolgimento della via estrinseca (Figura supplementare S6A, B). D'altra parte, la significativa sovraregolazione di fosfo-Bcl-2, solo alla dose più alta di OLE (300 μ M) utilizzato, sembra suggerire anche l'attivazione contemporanea della via apoptotica intrinseca (Figura complementare S6A,B). Quest'ultimo percorso potrebbe essere implicato di conseguenza

dell'aumento della produzione di ROS totale in risposta al trattamento OLE (Figura supplementare S7).

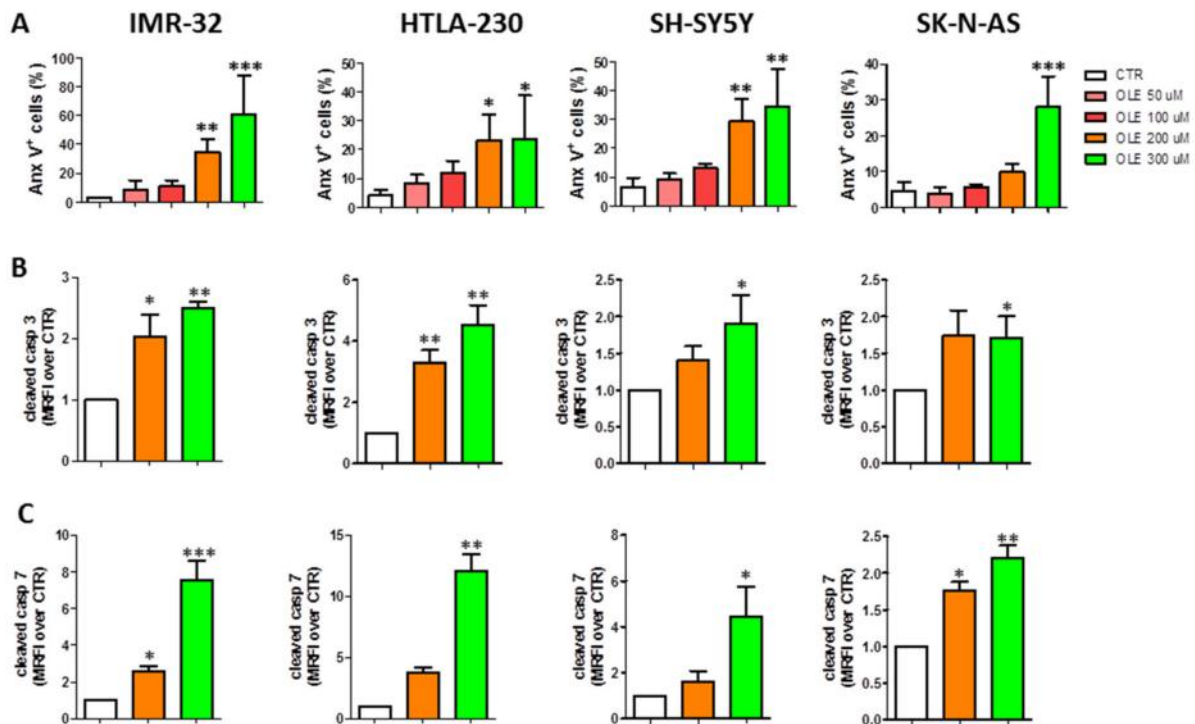


Figura 5. Induzione dose-dipendente dell'apoptosi delle cellule NB dopo trattamento con OLE. (UN) Cellule Anx-V+ determinate da FCM. Livelli di espressione proteica delle caspasi carnefici 3 (B) e 7 (C) valutata da FCM. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ contro CTR). OLE: estratto di foglie di olivo; CTR: controllo; uM: micromolare; MRFI: rapporto medio di intensità di fluorescenza.

3.4. OLE attiva il percorso NF-kB

Al fine di indagare se il trattamento con OLE possa essere coinvolto nelle vie infiammatorie, abbiamo anche studiato i livelli di espressione proteica di NF-kB e fosfo-NF-kB. Come illustrato nella Figura supplementare S8, il trattamento OLE ha portato a un'aumentata espressione di fosfo-NF-kB, mentre la forma nativa di NF-kB è rimasta inalterata.

3.5. OLE inibisce la migrazione delle cellule IMR-32 e SH-SY5Y

Lo scratch assay, eseguito su cellule IMR-32 e SH-SY5Y NB, ha dimostrato che il trattamento con OLE inibisce la migrazione delle cellule NB. Infatti, a seguito dell'esposizione OLE, le cellule IMR-32 e SH-SY5Y non sono riuscite a guarire completamente la ferita creata nel monostrato cellulare, rispetto alle cellule di controllo non trattate, per un periodo di 48 ore (Figura6). Applicando l'analisi di regressione lineare, per confrontare le curve di chiusura della ferita, è risultato che le pendenze delle cellule trattate con OLE (a 200 o 300 μ M) erano significativamente differenti rispetto a quelle delle cellule di controllo non trattate ($P < 0,0001$, per IMR-32 o SH-SY5Y). La larghezza della ferita delle cellule trattate con OLE era significativamente più ampia rispetto alle cellule non trattate a 24, 36 e 48 ore (Figura6 e Figura supplementare S9).

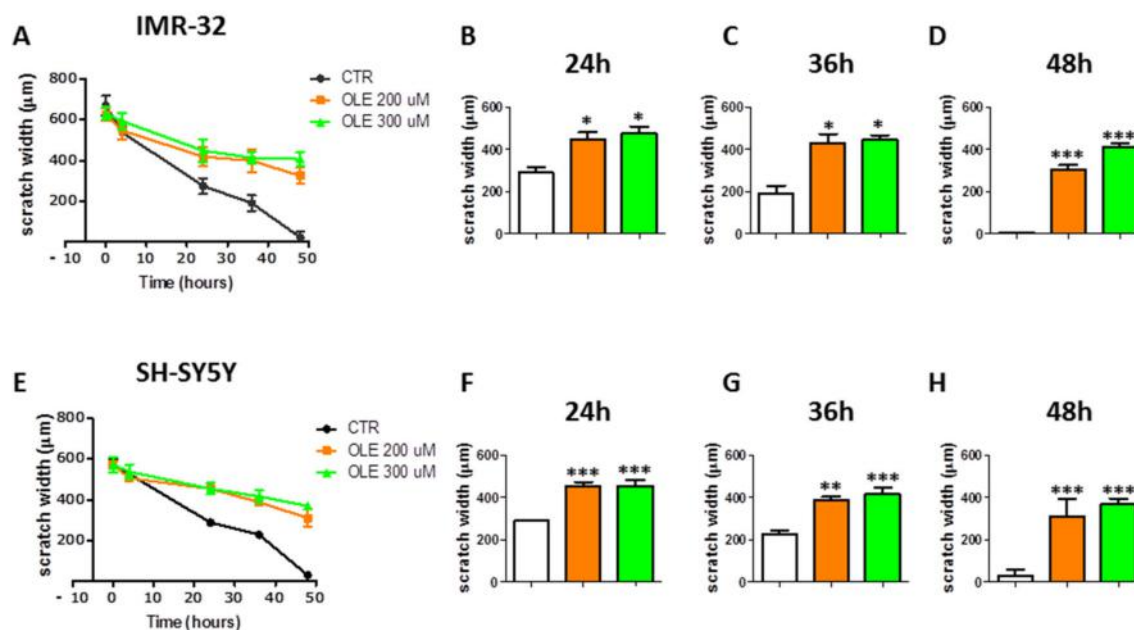


Figura 6. Effetti dell'OLE sulla migrazione delle cellule NB. (UN) e (E) rappresentano le curve di chiusura della ferita di CTR vs. cellule trattate con OLE di IMR-32 e SH-SY5Y, rispettivamente. (B–D) e (F–h) mostrano le differenze di larghezza della ferita tra i gruppi sperimentali nei momenti indicati. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0,05$, * $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ contro CTR). CTR: controllo; OLE: estratto di foglie di olivo; uM: micromolare; μ m: micrometro; h: ore.

3.6. OLE sinergizza con Topotecan contro le cellule NB

Sono stati eseguiti esperimenti di prova del concetto di combinazione di farmaci con l'obiettivo di determinare se l'OLE potesse supportare la chemioterapia convenzionale nel trattamento di pazienti con NB ad alto rischio in recidiva. Dosi crescenti di OLE (50, 100, 200 μ M) e topotecano (TOPO, 1, 5, 10 nM [25]) sono stati combinati tra loro. Figura 7A,B mostra i risultati ottenuti utilizzando "farmaci" come agenti singoli o in combinazione, rispettivamente. Gli effetti della combinazione di farmaci sono stati determinati grazie al teorema di Chou e Talalay [27]. I valori dell'indice di combinazione (CI) consentono di distinguere tra sinergismo ($CI < 1$), dipendenza ($CI = 1$) e antagonismo ($CI > 1$). Come mostrato in figura 7C, la somministrazione combinata di OLE e TOPO a cellule IMR-32, oltre 96 h di trattamento, ha portato a effetti sinergici generalizzati ad eccezione di due punti con un $CI > 1$. Più in dettaglio, la maggior parte della combinazione OLE-TOPO analizzata ha prodotto sia sinergismo (intervallo di IC = 0,3-0,7) o sinergismo moderato (intervallo di IC = 0,7-0,85). Inoltre le due combinazioni (OLE 50 μ M + TOPO 1 nM, $CI = 1,1$ e OLE 100 μ M + TOPO 1 nM, $CI = 1,07$) con un $CI > 1$ ha prodotto un effetto quasi di dipendenza, in cui il valore CI era compreso tra 0,9 e 1,1 [27]. La migliore combinazione che produce risultati sinergici (OLE 200 μ M + TOPO 10 nM, $CI = 0,31$) è stato testato anche contro sferoidi della linea cellulare IMR-32. Questa combinazione ha ridotto significativamente la vitalità cellulare degli sferoidi tumorali rispetto a ogni singolo farmaco utilizzato da solo, confermando ulteriormente i risultati ottenuti nei test basati su monostrato (Figura 7D).

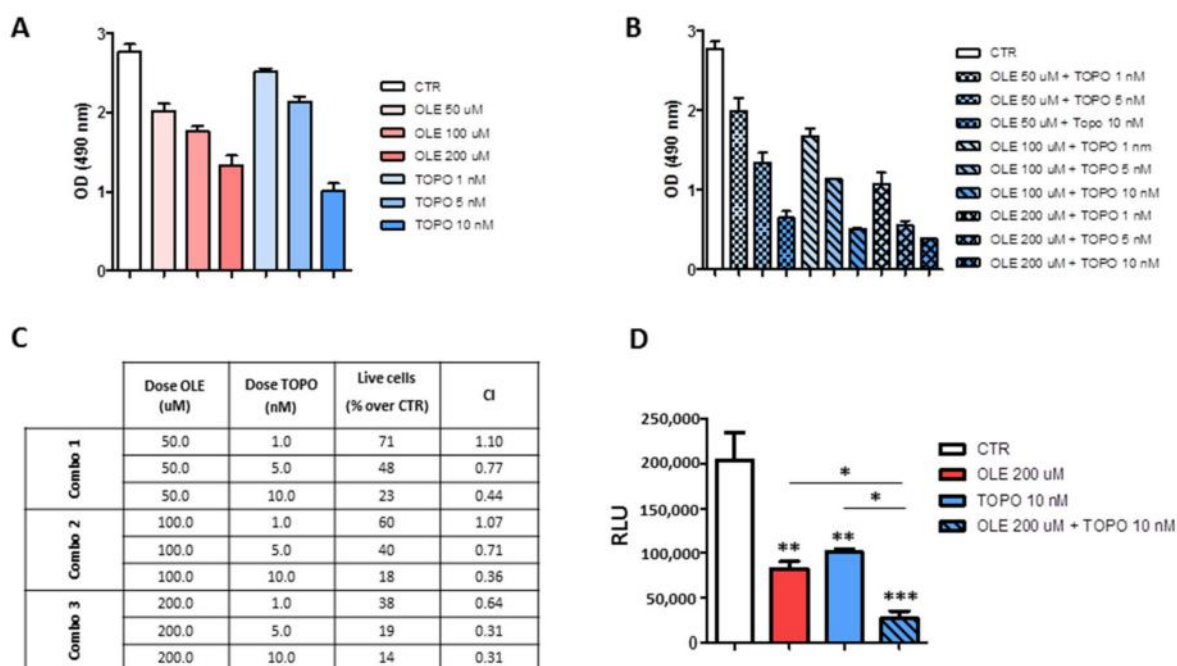


Figura 7. Effetti della combinazione OLE e topotecan sulla vitalità cellulare delle cellule IMR-32 e SH-SY5Y. **(UN)** Saggio MTS che mostra gli effetti dei singoli farmaci. **(B)** Saggio MTS che mostra gli effetti della combinazione di farmaci. **(C)** Tabella che mostra i valori dell'indice di combinazione (CI) per ciascuna combinazione OLE-TOPO. Combo 1 = OLE 50 μ M più TOPO 1, 5 e 10 nM; Combo2 = OLE 100 μ M più TOPO 1, 5 e 10; Combo 3 = OLE 200 μ M più TOPO 1, 5 e 10. CI < 1 significa sinergismo. CI > 1 significa antagonismo. CI = 1 significa dipendenza. **(D)** Saggio di vitalità che mostra gli effetti di OLE e TOPO, come farmaci singoli e in combinazione, sugli sferoidi tumorali della linea cellulare IMR-32. I dati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti indipendenti (* $P < 0.05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). CTR: controllo; OLE: estratto di foglie di olivo; TOPO: topotecano; μ M: micromolare; nM: nanomolare; OD: densità ottica; RLU: unità di luminescenza relativa.

4. Discussione

A nostra conoscenza, questo studio dimostra per la prima volta gli effetti antitumorali dell'estratto di foglie di olivo (OLE) contro le cellule NB studiando la vitalità cellulare, la proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi e la migrazione in vitro. Ad oggi, solo un rapporto ha esaminato l'efficacia antitumorale della singola molecola bioattiva oleuropeina contenuta in OLE contro la linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y [28], ma non viene riportato nulla sull'intero estratto.

L'OLE ha infatti la particolarità di essere costituito da un'ampia varietà di composti fenolici, i cui effetti benefici sulla salute sono stati segnalati [29,30]. Diversi studi si sono concentrati sui principali costituenti di OLE (cioè oleuropeina, idrossitirosolo) come singole molecole e hanno dimostrato le loro proprietà antitumorali in diversi modelli di tumore [13]. L'oleuropeina, il composto fenolico più abbondante presente negli OLE, ha dimostrato di essere efficace nell'indurre l'apoptosi attraverso l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione di una cascata di segnalazione mitocondriale nelle cellule HeLa. [31]. Inoltre, l'oleuropeina ha indotto l'apoptosi e ha inibito la proliferazione cellulare della linea cellulare di epatoma umano HepG2 [32]. Più recentemente, le proprietà pro-apoptotiche dell'oleuropeina sono state confermate anche da Antognelli et al., che hanno dimostrato che l'oleuropeina induce l'apoptosi in una linea cellulare di carcinoma polmonare non a piccole cellule (A549) attraverso la sovraregolazione della glicosilasi mitocondriale 2 [33]. Sono stati riportati anche effetti antitumorali per l'idrossitirosolo (HT), che ha ridotto la proliferazione delle cellule di adenocarcinoma del colon umano attraverso l'inibizione delle chinasi segnale-regolate extracellulari (ERK) 1/2 e della ciclina D1 [34]. Inoltre, l'HT era efficace anche contro le cellule del cancro alla prostata attraverso l'induzione dell'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare. [35]. Anche la luteolina e l'apigenina, sebbene meno concentrate, hanno dimostrato il loro potenziale come agenti antitumorali [36,37].

Il neuroblastoma (NB) è il tumore solido più comune dell'età pediatrica. La cura dei pazienti NB ad alto rischio è ancora impegnativa, e la possibilità di trovare integratori alimentari dotati

con proprietà antitumorali e da utilizzare come coadiuvante nelle terapie di combinazione appare interessante. L'estratto di foglie di olivo intero merita una grande attenzione, perché grazie alla cooperazione di diverse molecole bioattive, potrebbe avere proprietà antitumorali ancora più pronunciate di ogni composto preso come singolo agente.

Qui, l'OLE somministrato sulla base della concentrazione di oleuropeina ha portato a una riduzione della vitalità cellulare dipendente dal tempo e dalla dose su un pannello di linee cellulari NB umane. La sensibilità variabile delle cellule NB all'OLE riflette l'ampia eterogeneità dei tumori NB [38]. Da un punto di vista traslazionale, l'uso di una concentrazione M di OLE solleva la questione sulla possibile tossicità sui tessuti normali. Allo stato attuale, le conoscenze sul profilo di sicurezza dell'OLE nell'uomo sono ancora limitate, anche se è riportato che è generalmente affidabile e non tossico anche a dosi elevate [39,40]. Qui, è stato dimostrato che l'OLE non è tossico contro le cellule di controllo sane, come valutato confrontando l'esposizione lunga e continua all'OLE rispetto al trattamento a breve termine. Questi risultati sono incoraggianti e, sebbene siano necessari approfonditi studi di sicurezza e tossicologia per future applicazioni cliniche traslazionali, sembra che l'uso di OLE come adiuvante possa essere utile mentre non tossico utilizzando una finestra terapeutica appropriata.

I sistemi di coltura monostrato (2D) sono stati per decenni i migliori modelli per i test sui farmaci; tuttavia, i risultati ottenuti erano spesso incoerenti quando si passava ai modelli in vivo. Gli sferoidi tumorali imitano meglio le caratteristiche dell'architettura dei tumori solidi rispetto al 2D. Sono caratterizzati da una struttura complessa che ricapitola la complessità dei tumori solidi in termini di interazione cellula-cellula, interconnessione cellula-matrice extracellulare, accesso differenziale all'ossigeno e ai nutrienti da parte degli strati cellulari della struttura e il differenziale tasso di crescita degli strati [41]. Tutte queste caratteristiche, insieme al loro potenziale per riflettere e prevedere meglio la risposta alla terapia, hanno portato gli sferoidi tumorali ad emergere come un modello adeguato per lo screening dei farmaci antitumorali [42]. Esperimenti citotossici, eseguiti su sferoidi tumorali affidabili e riproducibili, hanno dimostrato che l'OLE riduce la vitalità delle cellule tumorali in modo dipendente dal tempo e dalla dose, confermando e convalidando i risultati ottenuti nelle colture 2D. Questi risultati traslazionali aprono la strada a futuri esperimenti in ambienti 3D più complessi e dinamici e in modelli preclinici in vivo.

Secondo un precedente studio eseguito nel melanoma [43], il nostro lavoro dimostra che OLE è in grado di inibire la proliferazione delle cellule NB arrestando il ciclo cellulare nella fase G0/G1. Al contrario, è stato riportato che l'oleuropeina ha inibito la proliferazione cellulare delle cellule dell'epatoma umano e delle cellule del cancro del colon attraverso un arresto del ciclo cellulare in fase G2/M [44,45]. Questa scoperta è alla base del fatto che l'OLE, grazie alla cooperazione di diverse molecole bioattive, può agire attraverso meccanismi diversi rispetto alle singole molecole. I nostri risultati dimostrano anche che le cellule NB esposte a OLE subiscono una morte cellulare apoptotica dose-dipendente, che è correlata con un'aumentata espressione delle caspasi 3 e 7, in parziale accordo con precedenti studi condotti sul melanoma [43].

Le indagini eseguite per svelare le principali vie di segnalazione attivate in risposta al trattamento OLE indicano chiaramente l'attivazione della via estrinseca apoptotica, che è sottolineata dall'aumentata espressione della forma scissa della caspasi 8. È interessante notare che i nostri dati dimostrano anche l'aumentata espressione di fosfo-Bcl-2 alle dosi più alte di OLE. Questo risultato apre a diverse ipotesi. Infatti, la fosforilazione di Bcl-2 può essere una conseguenza della produzione di ROS in risposta al trattamento con OLE, portando infine ad attivare anche la via intrinseca dell'apoptosi [46]. D'altra parte, la fosforilazione di Bcl-2 potrebbe rappresentare un meccanismo messo in atto dalle cellule per contrastare il danno al DNA correlato allo stress ossidativo, come precedentemente riportato [47]. Infatti, i ROS totali, ma non i ROS mitocondriali, sono stati aumentati dal trattamento con OLE (dati non mostrati).

Inoltre, il trattamento delle cellule NB con OLE ha portato all'attivazione della via NF- κ B, che è coinvolta, tra l'altro, anche nella segnalazione dell'infiammazione [48,49]. L'aumentata fosforilazione di NF- κ B dopo trattamento con OLE potrebbe suggerire l'attivazione di una cascata proinfiammatoria. Tale speculazione necessita di ulteriori indagini in vivo per essere confermata. Una delle caratteristiche chiave di una molecola bioattiva antitumorale è anche quella di interferire con il processo di migrazione delle cellule cancerose, responsabile della progressione del cancro e

metastatizzazione. In studi precedenti, è stato riportato che l'oleuropeina e l'idrossitirosolo sono in grado di inibire la migrazione di diversi tipi di cellule tumorali [28,50,51]. In accordo, qui dimostriamo che OLE è in grado di inibire significativamente la migrazione delle cellule NB, confermando ulteriormente la sua efficacia antitumorale.

Il nostro studio, eseguito su un pannello di linee cellulari NB umane, concorda principalmente con i precedenti risultati di Secme et al. [27], che ha dimostrato gli effetti antitumorali dell'oleuropeina contro la linea cellulare SH-SY5Y NB. Dai risultati ottenuti non è possibile indicare se l'OLE fosse vantaggioso in termini di effetti antitumorali rispetto all'oleuropeina in monoterapia. Tuttavia, possiamo sottolineare che l'OLE si è dimostrato efficace anche in tempi brevi di somministrazione. Inoltre, l'estratto acquoso presenta diversi vantaggi rispetto all'oleuropeina per future applicazioni cliniche. Infatti, dal punto di vista clinico, l'estratto acquoso potrebbe essere facilmente somministrato per os, caratteristica particolarmente importante per un "farmaco" coadiuvante da utilizzare in oncologia pediatrica. Al contrario, la solubilità dell'oleuropeina potrebbe richiedere lo sviluppo di formulazioni farmacologiche specifiche per renderla facilmente somministrabile [47].

L'obiettivo finale di questo studio era di indagare la potenziale cooperazione di OLE e il chemioterapico topotecan, che viene utilizzato nella pratica clinica per il trattamento di pazienti affetti da NB recidivanti/refrattari. La possibilità di combinare chemioterapici con sostanze fitochimiche, che potrebbero aumentare il loro indice terapeutico pur avendo un profilo tossico sicuro, sembra interessante e promettente, soprattutto per i pazienti NB recidivanti/refrattari. La capacità dell'OLE di aumentare la risposta delle cellule tumorali ai trattamenti standard è già stata dimostrata nel glioblastoma [17] e melanoma [43]. Mostriamo qui che la combinazione di OLE e topotecan ha portato a incoraggiare effetti antitumorali in un test monostrato, con valori dell'indice di combinazione che vanno dalla sinergia alla dipendenza. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati e supportati da esperimenti di proof-of-concept eseguiti contro sferoidi tumorali NB, in cui la combinazione di OLE e TOPO ha ridotto significativamente la vitalità cellulare degli sferoidi tumorali rispetto a ogni singolo farmaco usato da solo.

5. Conclusioni

In conclusione, i risultati in vitro qui mostrati aprono ad approfondite indagini precliniche prima di considerare la possibilità di tradurre la somministrazione di OLE nel contesto clinico e di migliorare probabilmente, in combinazione ai trattamenti standard, l'esito clinico dei pazienti con NB ad alto rischio.

Materiali supplementari: I seguenti sono disponibili online all'indirizzo <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13072178/s1>, Figura S1: Effetti dell'esposizione a lungo termine al trattamento OLE sulla vitalità cellulare di un controllo sano; Figura S2: Effetti dell'esposizione di breve durata a OLE sulla vitalità cellulare delle cellule NB e dei controlli sani; Figura S3: sovraregolazione dei livelli di espressione della proteina p-53 e ciclina-D1 dopo il trattamento con OLE; Figura S4: Induzione dell'apoptosi e sovraregolazione dell'espressione delle caspasi 3 e 7 dopo il trattamento con OLE. Figura S5: Salvataggio della morte cellulare apoptotica indotta da OLE mediante pretrattamento con l'inibitore delle caspasi pan Q-VD-OPh. Figura S6: sovraregolazione della caspasi scissa 8 e fosfo-Bcl-2 dopo il trattamento con OLE. Figura S7: Aumento della produzione di ROS totali dopo il trattamento OLE. Figura S8: sovraregolazione di fosfo-NF-kB dopo trattamento con OLE. Figura S9: Inibizione della migrazione delle linee cellulari IMR-32 e SH-SY5Y dopo il trattamento con OLE.

Contributi dell'autore: Concettualizzazione: FM, FP, MP, CB; Metodologia: VB e CE; Indagine: VB, FM e CB; Scrittura—Preparazione della bozza originale: CB; Scrittura—Revisione e modifica: FM, FP, MP, MVC e PP Tutti gli autori hanno letto e accettato la versione pubblicata del manoscritto.

Finanziamento: Lo studio è stato finanziato dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC): Investigator Grant n. 18474 a MP e n. 24397 a FP e Ministero della Salute, Ricerca Corrente 2021 a Istituto Giannina Gaslini.

Dichiarazione del comitato di revisione istituzionale: Non applicabile.

Dichiarazione di consenso informato: Non applicabile.

Dichiarazione sulla disponibilità dei dati: Non applicabile.

Ringraziamenti: VB e EC sono beneficiari di una borsa di studio della Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma e dell'Associazione Oncologia Pediatrica E Neuroblastoma (OPEN) ONLUS. Ringraziamo Torrisi C. per averci fornito l'estratto di foglie di olivo (OLIVUM, EvergreenLife). Ringraziamo BioRender.com (<https://biorender.com/>; data di accesso: marzo-giugno 2021) che è stato utilizzato per creare l'abstract grafico.

Conflitto di interessi: Gli autori dichiarano assenza di conflitto di interesse.

Riferimenti

1. Brodeur, Neuroblastoma GM: approfondimenti biologici in un enigma clinico. *Naz. Rev. Cancro* **2003**, *3*, 203-216. [[CrossRef](#)]
2. Maris, JM Recenti progressi nel neuroblastoma. *Nuovo inglese J. Med.* **2010**, *362*, 2202-2211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Matthay, KK; Maris, JM; Schleiermacher, G.; Nakagawara, A.; Mackall, CL; Diller, L.; Weiss, W. Neuroblastoma. *Naz. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 16078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Atanasov, AG; Waltenberger, B.; Pferschy-Wenzig, E.-M.; Linder, T.; Wawrosch, C.; Uhrin, P.; Temmi, V.; Wang, L.; Schwaiger, S.; Heiss, EH; et al. Scoperta e rifornimento di prodotti naturali di origine vegetale farmacologicamente attivi: una revisione. *Biotechnologie. avv.* **2015**, *33*, 1582-1614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Yuan, H.; Ma, Q.; Si, L.; Piao, G. La Medicina Tradizionale e la Medicina Moderna dai Prodotti Naturali. *molecole* **2016**, *21*, 559. [[CrossRef](#)]
6. Mishra, BB; Tiwari, prodotti VK Natural: un ruolo in evoluzione nella futura scoperta di farmaci. *Euro. J. Med. chimica* **2011**, *46*, 4769-4807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cragg, direttore generale; Pezzuto, JM Natural Products come fonte vitale per la scoperta di agenti chemioterapici e chemiopreventivi contro il cancro. *Med. principe pratica* **2015**, *25*, 41-59. [[CrossRef](#)]
8. Seca, AML; Pinto, Metaboliti secondari vegetali DCGA come agenti antitumorali: successi nelle sperimentazioni cliniche e nell'applicazione terapeutica. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 263. [[CrossRef](#)]
9. Nasri, H.; Baradaran, A.; Shirzad, H.; Rafieian-Kopaei, M. Nuovi concetti nei nutraceutici come alternativa ai prodotti farmaceutici. *Int. J. Prec. Med.* **2014**, *5*, 1487-1499. [[PubMed](#)]
10. Giardiniere, H.; Cauca, MR Dieta Mediterranea nella prevenzione delle malattie neurodegenerative. *Curr. nutr. Rappresentante* **2018**, *7*, 10-20. [[CrossRef](#)]
11. Martonez-Gonzunlez, MA; Gea, A.; Ruiz-Canela, M. La dieta mediterranea e la salute cardiovascolare. *Circ. Ris.* **2019**, *124*, 779-798. [[CrossRef](#)]
12. Barak, Y.; Fridman, D. Impatto della dieta mediterranea sul cancro: revisione mirata della letteratura. *Genoma del cancro. proteo* **2017**, *14*, 403-408. [[CrossRef](#)]
13. Capo, A.; Vescovo, KS; Marlow, G.; Barnet, MPG; Ferguson, LR Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract e Future Directions. *Nutrients* **2016**, *8*, 513. [[CrossRef](#)]
14. Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Andreucci, E.; Bianchini, F.; Scardigli, A.; Romani, A.; La Marca, G.; Nediani, C.; Calorini, L. Oleuropeina, il principale polifenolo dell'estratto di foglie di *Olea europaea*, ha un effetto antitumorale sulle cellule di melanoma umano BRAF e potenzia la citotossicità delle attuali chemioterapie. *Nutrients* **2018**, *10*, 1950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Orafo, CD; legame, DR; Jankowski, H.; Weidenhofer, J.; Stathopoulos, CE; Roach, PD; Scarlett, CJ I biofenoli dell'oliva oleuropeina e idrossitirosolo riducono selettivamente la proliferazione, influenzano il ciclo cellulare e inducono l'apoptosi nelle cellule del cancro del pancreas. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Samet, I.; Han, J.; Jlaiel, L.; Sayadi, S.; Isoda, H. Oliva (*Olea europaea*) L'estratto di foglie induce l'apoptosi e la differenziazione di monociti/macrofagi nelle cellule K562 di leucemia mieloide cronica umana: informazioni sul meccanismo sottostante. *Ossidativo Med. Cellula. Longev.* **2014**, *2014*, 1-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tezcan, G.; Tunca, B.; Bekar, A.; Budak, F.; Sahin, S.; Cecene, G.; Egeli, U.; Taskapilioglu, MO; Kocaeli, H.; Tolunay, S.; et al. L'estratto di foglie di *Olea europaea* migliora la risposta al trattamento delle cellule staminali GBM modulando l'espressione dei miRNA. *Sono. J. Cancer Res.* **2014**, *4*, 572-590.
18. Branco, F.; Basta, NO; McNally, RJ; Tweddle, DA Una revisione sistematica della chemioterapia di reinduzione per i bambini con neuroblastoma ad alto rischio recidivante. *Euro. J. Cancro* **2019**, *111*, 50-58. [[CrossRef](#)]
19. Ponzoni, M.; Curnis, F.; Brignole, C.; Bruno, S.; Guarnieri, D.; Siteia, L.; Marotta, R.; Sacchi, A.; Bauckneht, M.; Buschiazio, A.; et al. Miglioramento dell'homing del tumore mediante la chemioterapia: nanoparticelle caricate. *Piccolo* **2018**, *14*, e1802886. [[CrossRef](#)]
20. Pastorino, F.; Di Paolo, D.; Piccardi, F.; Nico, B.; Ribatti, D.; Daga, A.; Baio, G.; Neumaier, CE; Brignole, C.; Loi, M.; et al. Maggiore efficacia antitumorale della doxorubicina liposomiale mirata alla vascolarizzazione di grado clinico. *Clin. Ris. Cancro* **2008**, *14*, 7320-7329. [[CrossRef](#)]
21. Cossu, I.; Bottoni, G.; Loi, M.; Emionite, L.; Bartolini, A.; Di Paolo, D.; Brignole, C.; Piaggio, F.; Perri, P.; Sacchi, A.; et al. I nanocarrier mirati al neuroblastoma migliorano la somministrazione e la penetrazione dei farmaci, ritardano la crescita del tumore e annullano la diffusione metastatica. *Biomateriali* **2015**, *68*, 89-99. [[CrossRef](#)]

22. Di Paolo, D.; Pastorino, F.; Brignole, C.; Corrias, MV; Emionite, L.; Cilli, M.; Tamma, R.; Priddy, L.; Amaro, A.; Ferrari, D.; et al. Il rifornimento combinato di miR-34a e let-7b da parte di nanoparticelle mirate inibisce la crescita del tumore nei modelli preclinici di neuroblastoma. *Piccolo* **2020**, *16*. [CrossRef]
23. Seo, M.-D.; Kang, T.-J.; Lee, C.-H.; Lee, A.-Y.; Noh, M. HaCaT I cheratinociti e i cheratinociti epidermici primari hanno diversi profili trascrizionali dei geni associati alla busta cornificata alle citochine delle cellule T helper. *Biomol. J.* **2012**, *20*, 171-176. [CrossRef]
24. Garlanda, C.; Parravicini, C.; Sironi, M.; De Rossi, M.; de Calmanovici, RW; Carozzi, F.; Bussolino, F.; Colotta, F.; Mantovani, A.; Vecchi, A. Crescita progressiva in topi immunodeficienti e reclutamento di cellule ospiti da parte di cellule endoteliali di topo trasformate da antigene T di media grandezza del polioma: implicazioni per la patogenesi dei tumori vascolari opportunistici. *Proc. Natl. Acad. Sci. Stati Uniti d'America* **1994**, *91*, 7291-7295. [CrossRef]
25. Daniele, RA; Rozanska, AL; Tommaso, HD; Mulligan, EA; Drew, Y.; Castelbuono, dj; Hostomsky, Z.; Plummer, pronto soccorso; corpo, UN.; Tweddle, DA; et al. L'inibizione della poli(ADP-ribosio) polimerasi-1 migliora l'attività di temozolomide e topotecan contro il neuroblastoma infantile. *Clin. Ris. Cancro* **2009**, *15*, 1241-1249. [CrossRef]
26. Wu, D.; Yotnda, P. Produzione e rilevamento di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei tumori. *J. Vis. Scad.* **2011**, e3357. [CrossRef]
27. Chou, T.-C. Base teorica, disegno sperimentale e simulazione computerizzata del sinergismo e dell'antagonismo negli studi sulle combinazioni di farmaci. *Farmaco. rev.* **2006**, *58*, 621-681. [CrossRef]
28. Seçme, M.; Eroğlu, C.; Dodurga, Y.; Bağcı, G. Indagine sul meccanismo antitumorale dell'oleuropeina attraverso il ciclo cellulare e le vie apoptotiche nelle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. *Gene* **2016**, *585*, 93-99. [CrossRef]
29. Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. I composti fenolici dell'olio d'oliva: struttura, attività biologica ed effetti benefici sulla salute umana. *nutr. Ris. rev.* **2005**, *18*, 98-112. [CrossRef]
30. Bulotta, S.; Celano, M.; Lepore, SM; Montalcini, T.; Pujia, A.; Russo, D. Effetti benefici dei componenti fenolici dell'olio d'oliva oleuropeina e idrossitirosolo: Focus sulla protezione contro le malattie cardiovascolari e metaboliche. *J. Trad. Med.* **2014**, *12*, 219. [CrossRef]
31. Yao, J.; Wu, J.; Yang, X.; Yang, J.; Zhang, Y.; Du, L. Oleuropein ha indotto l'apoptosi nelle cellule HeLa tramite una cascata apoptotica mitocondriale associata all'attivazione della chinasi c-Jun NH2-terminale. *J. Pharmacol. Sci.* **2014**, *125*, 300-311. [CrossRef] [PubMed]
32. Yan, C.-M.; Chai, E.-Q.; Cai, H.-Y.; Miao, G.-Y.; Ma, W. L'oleuropeina induce l'apoptosi tramite l'attivazione delle caspasi e la soppressione della via fosfatidilinositolo 3-chinasi/proteina chinasi B nella linea cellulare di epatoma umano HepG2. *Mol. Med. Rappresentante* **2015**, *11*, 4617-4624. [CrossRef]
33. Antognelli, C.; Frosini, R.; Santolla, MF; Peirce, MJ; Talesa, VN L'apoptosi indotta dall'oleuropeina è mediata dalla gliossalasi mitocondriale 2 nelle cellule NSCLC A549: un meccanismo interno e un possibile nuovo ruolo non enzimatico per un antico enzima. *Ossidativo Med. Cellula. Longev.* **2019**, *2019*, 1-10. [CrossRef]
34. Corona, G.; Deiana, M.; Incani, A.; Vauzour, D.; Dessio, MA; Spencer, JPE L'idrossitirosolo inibisce la proliferazione delle cellule di adenocarcinoma del colon umano attraverso l'inibizione di ERK1/2 e della ciclina D1. *Mol. nutr. Ris. Alimentare* **2009**, *53*, 897-903. [CrossRef]
35. Zubair, H.; Bhardwaj, A.; Ahmad, A.; Srivastava, SK; Khan, MA; Patel, GK; Singh, S.; Singh, l'idrossitirosolo AP induce l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare e sopprime più vie di segnalazione oncogene nelle cellule del cancro alla prostata. *nutr. Cancro* **2017**, *69*, 932-942. [CrossRef]
36. Yan, X.; Qi, M.; Li, P.; Zhan, Y.; Shao, H. Apigenina nella terapia del cancro: effetti anticancro e meccanismi d'azione. *Cellula Biosci.* **2017**, *7*, 1-16. [CrossRef]
37. Imran, M.; Rauf, A.; Abu-Izneid, T.; Nadeem, M.; Shariati, MA; Khan, IA; Imran, A.; Orhan, IE; Rizwan, M.; Atif, M.; et al. Rettifica a "Luteolina, un flavonoide, come agente antitumorale: una recensione" [Biomed. Farmacotere. 112 (2019) 108612]. *Biomedicina. Farmacotere.* **2019**, *116*, 109084. [CrossRef]
38. Brodeur, GM; Nakagawara, A. Basi molecolari dell'eterogeneità clinica nel neuroblastoma. *J. Pediatr. ematolo.* **1992**, *14*, 111-116. [CrossRef]
39. Guex, CG; Reginato, FZ; Figueredo, KC; da Silva, A.; Pires, FB; Gesù, RDS; Lhamas, CL; Lopes, GHH; Bauermann, LDF Valutazione della sicurezza dell'estratto etanolicco di *Olea europaea* L. se ne va dopo somministrazione acuta e subacuta a ratti Wistar. *Regular. tossico. Farmaco.* **2018**, *95*, 395-399. [CrossRef]
40. Clewell, AE; Bére, E.; Vértési, A.; Glunvit, R.; Hirka, G.; Endres, JR; Murbach, TS; Szakonyiné, IP Una valutazione completa della sicurezza tossicologica di un estratto di *Olea Europaea* L. Foglie (Bonolive™). *Int. J. Tossicolo.* **2016**, *35*, 208-221. [CrossRef]
41. Costa, CE; Moreira, AF; De Melo-Diogo, D.; Gaspare, VM; Carvalho, deputato; Correia, sferoidi tumorali IJ 3D: una panoramica sugli strumenti e le tecniche utilizzate per la loro analisi. *Biotechnologie. avv.* **2016**, *34*, 1427-1441. [CrossRef] [PubMed]
42. Breslin, S.; O'Driscoll, L. La rilevanza dell'uso di colture cellulari 3D, oltre alle colture monostrato 2D, nella valutazione della sensibilità e della resistenza ai farmaci per il cancro al seno. *Oncotarget* **2016**, *7*, 45745-45756. [CrossRef]
43. Mijatovic, SA; Timotijevic, GS; Miljkovic, Đ.; Radovic, JM; Maksimovic-Ivanic, D.; Dekanski, D.; Stosic-Grujicic, S. Potenziale antimelanoma multiplo dell'estratto secco di foglie di olivo. *Int. J. Cancro* **2010**, *128*, 1955-1965. [CrossRef]
44. Cheng, J.-S.; Chou, C.-T.; Liu, Y.-Y.; Sole, W.-C.; Shieh, P.; Kuo, D.-H.; Kuo, C.-C.; Jan, C.-R.; Liang, W.-Z. L'effetto dell'oleuropeina dalla foglia di olivo (*Olea europaea*) estratto sull'omeostasi del Ca²⁺, citotossicità, distribuzione del ciclo cellulare e segnalazione dei ROS nelle cellule di epatoma umano HepG2. *chimica alimentare. tossico.* **2016**, *91*, 151-166. [CrossRef]

45. Fernaunndez-Arroyo, S.; Gómez-Martínez, A.; Rocamora-Reverte, L.; Quirantes-Piné, R.; Segura-Carretero, A.; Felceunndez-Gutiérrez, UN.; Ferragut, J. Applicazione di nanoLC-ESI-TOF-MS per l'analisi metabolomica di composti fenolici da olio extra vergine di oliva in cellule di cancro del colon trattate. *J. Pharm. Biomedicina. Anale*. **2012**, *63*, 128-134. [[CrossRef](#)]
46. Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, DA Attivazione delle vie di segnalazione dell'apoptosi da parte di specie reattive dell'ossigeno. *Biochim. Biofisica. Acta BBA Bioenerg*. **2016**, *1863*, 2977-2992. [[CrossRef](#)]
47. Chong, SJF; Iskandar, K.; Lai, JXH; Qu, J.; Raman, D.; Valentino, R.; Herbau, C.; Collins, M.; Basso, ICC; Loh, T.; et al. La serina-70 fosforilata Bcl-2 previene il danno al DNA indotto dallo stress ossidativo modulando il metabolismo redox mitocondriale. *Acidi nucleici Res.* **2020**, *48*, 12727-12745. [[CrossRef](#)]
48. Lawrence, T. Il percorso del fattore nucleare NF- κ B nell'infiammazione. *Primavera fredda Herb. prospettiva. Biol.* **2009**, *1*, a001651. [[CrossRef](#)]
49. Taniguchi, K.; Karin, M. NF- κ B, infiammazione, immunità e cancro: raggiungimento della maggiore età. *Naz. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 309-324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Choupani, J.; Alivand, signor; Derakhshan, SM; Zaeifzadeh, M.; Khaniani, MS L'oleuropeina inibisce la capacità di migrazione attraverso la soppressione della transizione epitelio-mesenchimale e migliora sinergicamente l'apoptosi mediata dalla doxorubicina nelle cellule MCF-7. *J. Cell. fisiolo.* **2019**, *234*, 9093-9104. [[CrossRef](#)]
51. Lu, H.-Y.; Zhu, J.-S.; Zhang, Z.; Shen, W.-J.; Jiang, S.; Lungo, Y.-F.; Wu, B.; Ding, T.; Huan, F.; Wang, S.-L. L'idrossitirosole e l'oleuropeina inibiscono la migrazione e l'invasione delle cellule di cancro al seno triplo negativo MDA-MB-231 tramite l'induzione dell'autofagia. *Agenti anticancro Med. chimica* **2020**, *19*, 1983-1990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]