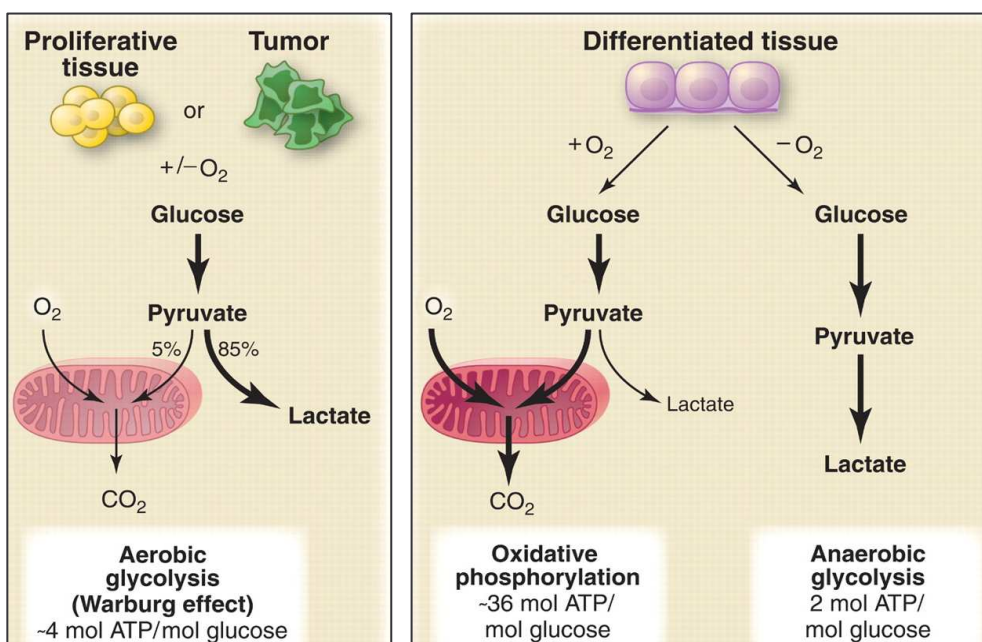


**VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' ANTIPROLIFERATIVA DI CELLFOOD®  
IN CELLULE TUMORALI IN CULTURA.  
(relazione preliminare)**

*Serena Benedetti, Simona Catalani, Valentina Carbonaro, Francesco Palma, Franco Canestrari.  
Dip.to Scienze Biomolecolari, Sez. Biochimica Clinica, Università di Urbino "Carlo Bo".*

**INTRODUZIONE**

Una delle caratteristiche principali della cellula tumorale è la resistenza all'apoptosi, definita come morte cellulare programmata. In seguito al blocco dell'apoptosi, la cellula tumorale iperprolifera in maniera incontrollata. L'apoptosi è un processo dipendente dall'energia mitocondriale prodotta durante la fosforilazione ossidativa; tuttavia, nella cellula tumorale si verifica uno spostamento del metabolismo energetico legato al glucosio dalla via ossidativa mitocondriale verso quella glicolitica citosolica (effetto Warburg), rendendo così la cellula resistente all'apoptosi. Con l'aumento della glicolisi, nella cellula tumorale la maggior parte del piruvato ottenuto a partire dal glucosio viene convertito in lattato invece di entrare nel mitocondrio per essere convertito ad acetil coenzima A (vedi Figura 1).



**Figura 1**

Molti farmaci antineoplastici agiscono a vari livelli per ripristinare la via energetica mitocondriale e rendere così la cellula tumorale suscettibile all'apoptosi. In questo contesto, la ricerca svolta presso l'Università di Urbino è stata finalizzata alla valutazione dell'attività antiproliferativa di CELLFOOD (CF) in cellule tumorali in coltura, selezionando tre linee tumorali leucemiche denominate Jurkat, U937 e K562. In particolare sono stati investigati gli effetti di CF sul metabolismo energetico cellulare e sulla morte cellulare per apoptosi.

## **MATERIALI E METODI**

Le cellule Jurkat, U937 e K562 sono state mantenute in coltura per 24, 48 e 72 ore sia in assenza (controllo di riferimento, CTR) che in presenza di CF a diverse diluizioni (1:600, 1:400, 1:200, corrispondenti a concentrazioni di CF pari a 1.7  $\mu\text{l/ml}$ , 2.5  $\mu\text{l/ml}$  e 5  $\mu\text{l/ml}$ , rispettivamente). CF è stato somministrato alle cellule in un'unica dose al tempo 0.

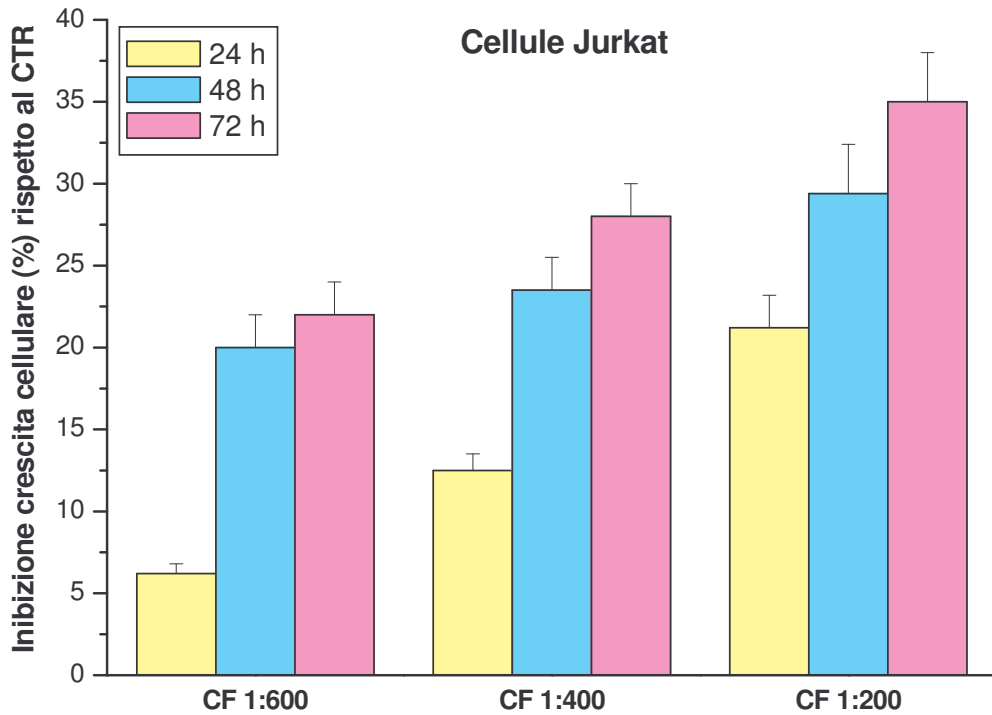
La crescita cellulare è stata valutata a ciascun tempo sperimentale mediante conta delle cellule al microscopio con il colorante tripan blu; contemporaneamente sono state quantificate le cellule metabolicamente attive e quindi vitali mediante il reagente WST-1 (che quantifica l'attività delle deidrogenasi mitocondriali) e lettura spettrofotometrica a 450 nm.

Al fine di investigare gli effetti di CF sul metabolismo energetico cellulare, a ciascun tempo sperimentale è stata valutata spettrofotometricamente l'attività dei principali enzimi citosolici coinvolti nella glicolisi, quali esochinasi, piruvato chinasi e lattato deidrogenasi; allo stesso tempo, nel terreno di coltura è stato valutato il rilascio di lattato prodotto dalla cellula durante il metabolismo glicolitico del glucosio.

Infine, per investigare i meccanismi molecolari alla base dell'azione antiproliferativa di CF, nelle cellule incubate in assenza ed in presenza di CF è stata valutata mediante elettroforesi la frammentazione del DNA nucleare (il cosiddetto laddering), che rappresenta una caratteristica della morte cellulare per apoptosi.

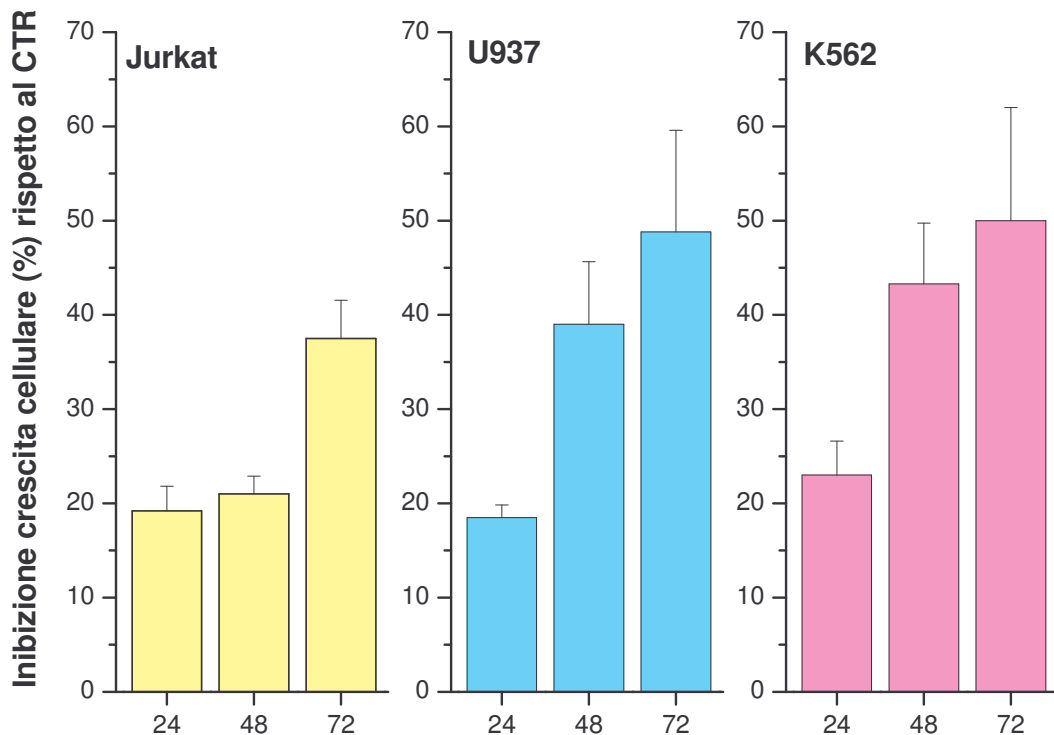
## **RISULTATI**

I primi esperimenti sono stati eseguiti sulle cellule Jurkat al fine di valutare quale diluizione di CF fosse più efficace nella riduzione della crescita cellulare senza causare tossicità (e quindi necrosi) dovuta alla propria acidità. In Figura 2 si può osservare che ai tre tempi sperimentali (24, 48 e 72 ore) CF causa una riduzione della crescita cellulare in maniera dose-dipendente. L'inibizione maggiore si ha con la diluizione 1:200 (cioè 5  $\mu\text{l/ml}$ ), la quale è efficace nel ridurre la crescita senza causare tossicità (infatti non si osservano cellule morte per necrosi al microscopio).



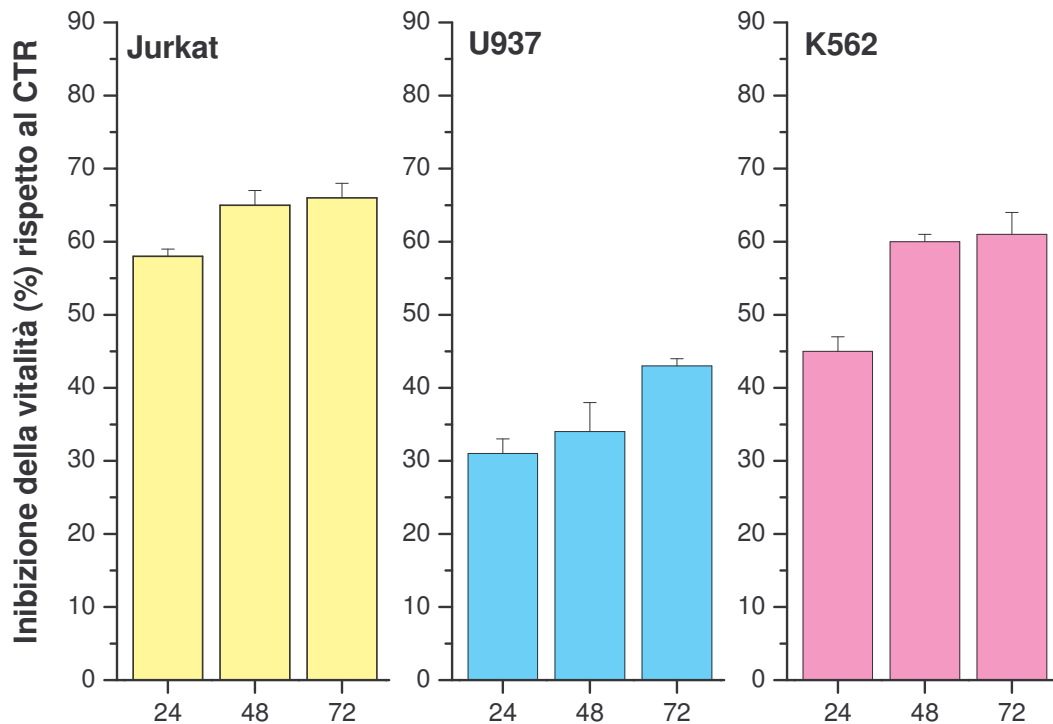
*Figura 2*

Una volta stabilito che la diluizione di CF più efficace è la 1:200, le prove sono state ripetute su tutte e tre le linee cellulari leucemiche dopo 24, 48 e 72 ore di incubazione con CF 1:200. Mediante conta al microscopio, l'inibizione massima della crescita cellulare si osserva a 72 ore, raggiungendo il 50% di inibizione - rispetto al CTR non trattato con CF - nelle U937 e nelle K562.



*Figura 3*

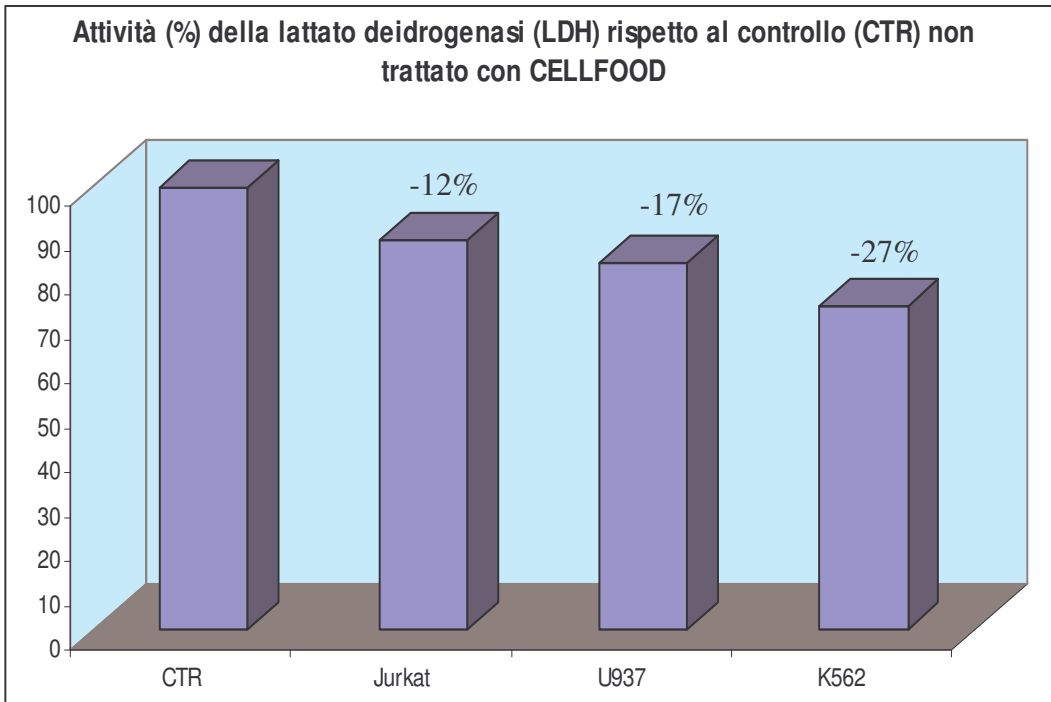
Gli effetti di CF sulla vitalità cellulare sono stati valutati anche mediante reagente WST-1 il quale quantifica le cellule metabolicamente attive misurando l'attività degli enzimi mitocondriali deidrogenasi. Come mostrato in Figura 4, l'incubazione con CF 1:200 causa una riduzione della vitalità cellulare e delle cellule metabolicamente attive in tutte e tre le linee leucemiche.



**Figura 4**

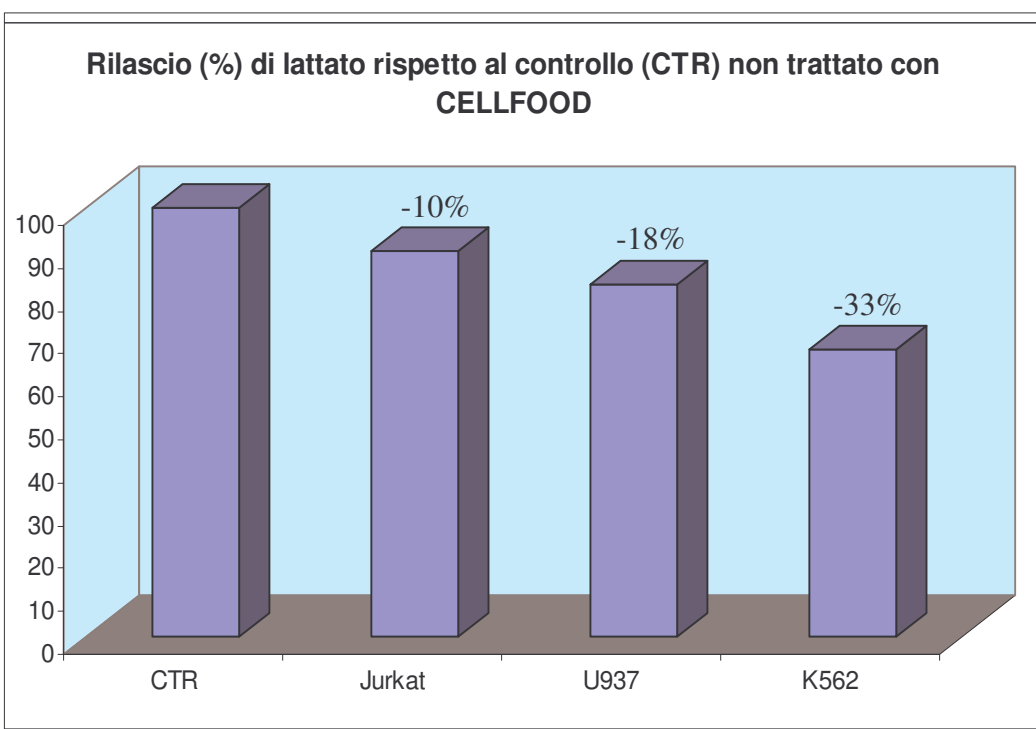
Gli effetti di CF sul metabolismo energetico cellulare sono stati valutati mediante misurazione dell'attività dei principali enzimi cellulari coinvolti nella via glicolitica in cui sia ha la conversione del glucosio in piruvato e produzione di lattato. Come mostrato in Figura 5, dopo 72 ore di incubazione delle cellule con CF 1:200, si osserva una riduzione dell'attività dell'enzima lattato deidrogenasi (responsabile della trasformazione del piruvato in lattato). La riduzione è massima nelle K562 con un calo del 27% rispetto al CTR non trattato con CF.

Le prove riguardanti l'attività degli enzimi glicolitici esokinasi e piruvato kinasi sono in corso di esecuzione.



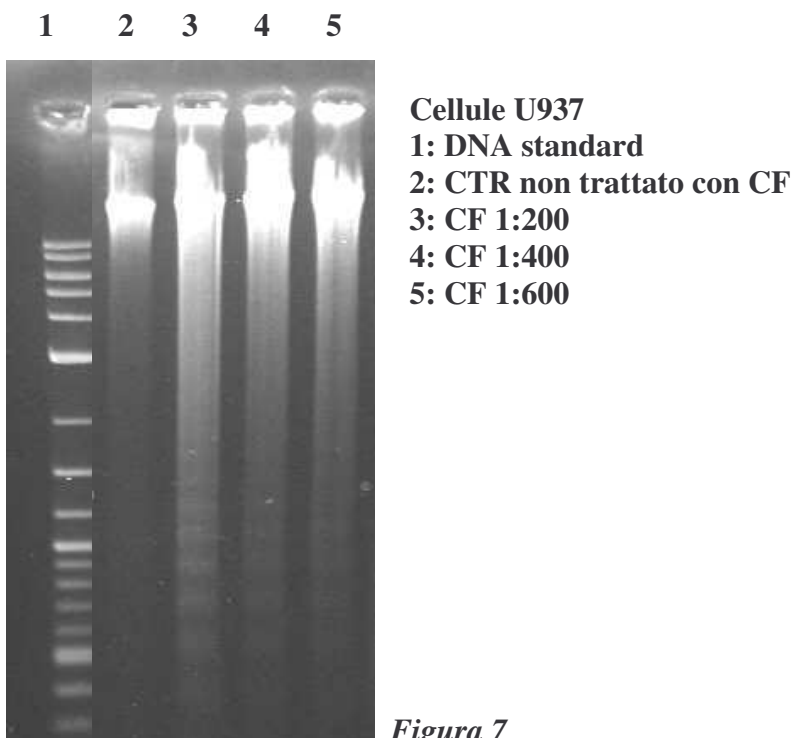
**Figura 5**

A conferma della perturbazione della glicolisi in presenza di CF, la misurazione del rilascio del lattato cellulare evidenzia che dopo 72 ore di incubazione delle cellule con CF 1:200 si ha una riduzione della concentrazione del lattato prodotto con la via glicolitica. La riduzione è massima nelle K562 con un calo del 33% rispetto al CTR non trattato con CF.



**Figura 6**

Infine, per confermare che l'effetto antiproliferativo di CF è dovuto a induzione di morte cellulare per apoptosi, nelle tre linee leucemiche è stata valutata la frammentazione del DNA nucleare. La Figura 7 dimostra che nelle cellule U937 dopo 72 ore di incubazione con CF si ha frammentazione (laddering) del DNA nucleare con tutte e tre le diluizioni testate. La frammentazione è massima con la diluizione 1:200 (lane 3), mentre nel controllo non trattato con CF (lane 2) il DNA nucleare è intatto e non si osserva frammentazione. Anche per le Jurkat e le K562 si sono ottenuti gli stessi risultati.



*Figura 7*

## CONCLUSIONI

Nel loro insieme queste prove sperimentali dimostrano che CF riduce la proliferazione di cellule tumorali in coltura attraverso un meccanismo apoptotico, non vi è dunque morte cellulare per tossicità e necrosi. L'induzione dell'apoptosi da parte di CF è legata alla perturbazione del metabolismo energetico della cellula tumorale, infatti in presenza di CF si ha una riduzione dell'attività dell'enzima glicolitico lattato deidrogenasi e della produzione di lattato cellulare. Poiché l'apoptosi è un processo legato alla produzione di energia mitocondriale, è possibile ipotizzare che la presenza di CF favorisca la riattivazione della fosforilazione ossidativa mitocondriale, rendendo in questo modo la cellula tumorale suscettibile all'apoptosi. Poiché molti farmaci antitumorali agiscono a vari livelli per ripristinare la via energetica mitocondriale e indurre apoptosi, nella pratica clinica CF può essere considerato un valido supporto al trattamento antineoplastico e/o come chemopreventivo.