

# Effetto degli integratori nella prevenzione delle patologie degenerative

Uno studio *in vitro* su cellule tumorali in coltura mette in luce le proprietà antiproliferative dell'integratore nutrizionale Cellfood®

Simona Catalani, Serena Benedetti, Franco Canestrari, Serafina Battistelli, Francesco Palma, Barbara Nuvoli\*, Rossella Galati\*

La modulazione del metabolismo tumorale, dei pathway di sopravvivenza cellulare e dei meccanismi apoptotici rappresenta una nuova opportunità nella prevenzione e nel trattamento dei tumori [1, 2]. Dal punto di vista metabolico, circa il 60-90% dei tumori dipende dalla glicolisi come principale fonte di energia (ATP). A tal fine, le cellule tumorali, attraverso il fattore ipossico HIF-1 $\alpha$ , up-regolano i trasportatori del glucosio (GLUT-1) e convertono il piruvato (prodotto finale della glicolisi) in lattato, anziché ossidarlo nei mitocondri [2]. Lo spostamento del metabolismo energetico dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale alla glicolisi citoplasmatica favorisce la crescita della cellula tumorale rendendola resistente all'apoptosi (morte cellulare programmata). Anche la chinasi Akt svolge una funzione critica nella proliferazione cellulare [1]: tale proteina risulta infatti attivata in numerosi tipi di cancro e promuove la sopravvivenza della cellula tumorale attraverso l'inibizione del meccanismo apoptotico. Nell'ambito delle strategie mirate alla prevenzione e al trattamento dei tumori, un ruolo sempre più rilevante è svolto dai composti nutraceutici [1], come anche documentato da studi scientifici sull'integratore naturale Cellfood.

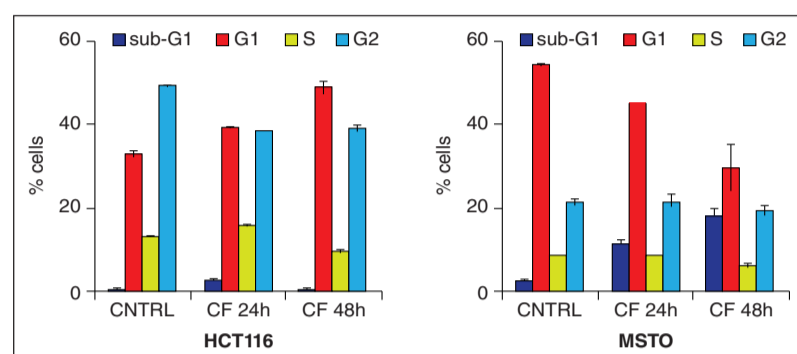
## Cellfood, formulazione complessa

Cellfood (CF) (Eurodream, La Spezia, Italia) è una formulazione complessa contenente dispersi in forma colloidale amminoacidi, enzimi, oligoelementi e solfato di deuterio in tracce. Studi precedenti hanno dimostrato sia i suoi effetti protettivi nei confronti del danno ossidativo a biomolecole e cellule [3] che la sua capacità di migliorare il metabolismo respiratorio mitocondriale e la produzione di ATP [4]. La sua azione antiossidante lo rende un valido integratore nella prevenzione e nel trattamento di condizioni fisiopatologiche legate allo stress ossidativo: dall'invecchiamento cellulare al rischio cardiovascolare, dai disordini neurodegenerativi al cancro. In questo contesto, recenti studi *in vitro* hanno dimostrato che CF presenta un'efficace azione antiproliferativa sia in cellule leucemiche in coltura [5] sia in cellule di mesotelioma e di tumore del colon-retto [6].

## Proprietà antiproliferative di Cellfood in cellule leucemiche [5]

Dallo studio condotto sulle linee leucemiche Jurkat (leucemia linfoblastica acuta), U937 (leucemia mieloide acuta) e K562 (leucemia mieloide cronica), è emerso che la somministrazione di CF (5  $\mu$ l/ml) è in grado di indurre una significativa riduzione della proliferazione cellulare, senza tuttavia influenzare la crescita di linfociti sani, dimostrando quindi una specificità d'azione nei confronti della cellula tumorale (Figura 1). Dalla valutazione dei meccanismi molecolari alla base di tale effetto ipoproliferativo, è stato evidenziato che CF promuove l'attivazione della caspasi-3 (il più importante effettore dell'apoptosi) e la frammentazione del DNA nucleare (caratteristica delle cellule in fase avanzata di apoptosi), indicando quindi che CF inibisce la crescita della cellula tumorale attraverso induzione di apoptosi. Anche le indagini microscopiche sulla morfologia cellulare hanno confermato la morte cellulare per apoptosi dopo somministrazione di CF (Figura 2). Andando ad investigare le modificazioni metaboliche all'interno della cellula tumorale, si è osservato che CF riduce significativamente la concentrazione di HIF-1 $\alpha$ , il fattore di trascrizione responsabile dello shift metabolico dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale alla glicolisi citoplasmatica [2]. Come conseguenza della deregolazione di HIF-1 $\alpha$ , in presenza di CF si sono evidenziate anche una riduzione dell'espressione del recettore di membrana GLUT-1 (responsabile dell'uptake di glucosio per la produzione di ATP attraverso la glicolisi) ed una significativa diminuzione dell'attività dell'enzima lattato deidrogenasi

Figura 4 - Analisi del ciclo cellulare nelle cellule HCT-116 e MSTO dopo somministrazione di CF per 24 e 48 ore rispetto alle cellule di controllo non trattate (CNTRL)



(LDH), responsabile della conversione del piruvato in lattato [2]. In accordo, la quantità di lattato rilasciata nell'ambiente extracellulare è risultata essere diminuita nelle cellule trattate con CF. Nel loro insieme, le prove sperimentali hanno chiaramente evidenziato un significativo effetto antiproliferativo di CF in linee cellulari leucemiche inducendo morte cellulare per apoptosi e alterando il metabolismo cellulare attraverso la regolazione di HIF-1 $\alpha$  e GLUT-1.

## Proprietà antiproliferative di Cellfood® in cellule di mesotelioma e di colon-carcinoma [6]

L'effetto di CF è stato testato anche in una linea cellulare di carcinoma del colon (HCT-116) e di mesotelioma (MSTO). Dallo studio è emerso che la somministrazione di CF (5  $\mu$ l/ml) induce una riduzione significativa del numero di cellule tumorali; al contrario, nessun effetto antiproliferativo è stato osservato nelle linee non tumorali di fibroblasti (HFF) e mesotelioma (Met5A), indicando che l'azione antiproliferativa di CF è specifica solo per le cellule tumorali (Figura 3). L'azione di CF è stata valutata anche mediante test clonogenico (semina di cellule a basse concentrazioni e osservazione delle colonie formatesi dopo 10-15 giorni di incubazione). In presenza di CF, la capacità delle cellule tumorali (HCT-116 e MSTO) di formare colonie è risultata ridotta, mentre la capacità di formare colonie delle cellule sane (HFF e Met5A) è risultata pressoché inalterata. Le cellule HCT-116 e MSTO trattate con CF sono state inoltre sottoposte ad analisi del ciclo cellulare (Figura 4), da cui è emerso un aumento della fase sub-G1 e una diminuzione della fase G1 nella linea di mesotelioma MSTO e un arresto del ciclo in G1 nelle cellule di colon-carcinoma HCT-116, suggerendo la capacità di CF di indurre morte per apoptosi. L'attivazione della caspasi-3 (proteina effettrice dell'apoptosi) e il taglio di PARP (proteina coinvolta nella riparazione del DNA), hanno confermato l'induzione del pathway apoptotico. Ulteriori indagini molecolari eseguite tramite western blot, hanno rilevato un aumento dell'espressione di p53 (proteina proapoptotica), p21 e p27 (proteine che promuovono l'arresto del ciclo cellulare in G1), una riduzione di c-myc e Bcl-2 (proteine antiapoptotiche), e una inibizione dell'attivazione di Akt (proteina che promuove la sopravvivenza cellulare) in seguito a trattamento delle cellule MSTO e HCT-116 con CF. Alla luce di questi risultati si può quindi affermare che CF agisce come un importante regolatore dei meccanismi di crescita cellulare.

## Conclusioni

Le ricerche fino ad oggi condotte su cellule tumorali in coltura suggeriscono che Cellfood, grazie alle sue proprietà pro-apoptotiche (dipendenti probabilmente più dall'intera formulazione che da uno o più componenti specifici), può essere un nutraceutico di grande utilità clinica sia come supporto al trattamento antineoplastico che come chemopreventivo. Inoltre, date le sue proprietà nutrizionali, CF può intervenire anche migliorando la qualità della vita del paziente oncologico sottoposto a terapia antineoplastica. In particolare, CF potrebbe essere un valido supporto clinico nell'ambito della radioterapia; infatti è stato documentato che la modulazione del fattore HIF-1 $\alpha$  e del metabolismo glicolitico tumorale permette di migliorare l'efficacia della terapia stessa e di aumentare la sensibilità del tumore all'irradiazione [7]. In tale contesto, studi preclinici su linee cellulari tumorali e modelli animali sperimentali sono attualmente in corso presso l'Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena" di Roma.

Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sezione di Biochimica Clinica e Biologia Cellulare, Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"; \*Area di Medicina Molecolare, Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena", Roma

## Bibliografia

- Shanmugam MK, Kannaiyan R, Sethi G (2011). Targeting Cell Signaling and Apoptotic Pathways by Dietary Agents: Role in the Prevention and Treatment of Cancer, *Nutr Cancer* 63, 161-173.
- Teicher BA1, Linehan WM, Helman LJ (2012). Targeting cancer metabolism, *Clin Cancer Res* 18, 5537-5545.
- Benedetti S, Catalani S, Palma F, Canestrari F (2011). The antioxidant protection of CELLFOOD against oxidative damage in vitro, *Food Chem Toxicol* 49, 2292-2298.
- Ferrero E, Fulgenzi A, Belloni D, Foglieni C, Ferrero ME (2011). Cellfood™ improves respiratory metabolism of endothelial cells and inhibits hypoxia-induced reactive oxygen species (ROS) generation, *J Physiol Pharmacol* 62, 287-293.
- Catalani S, Carbonaro V, Palma F, Arshakyan M, Galati R, Nuvoli B, Battistelli S, Canestrari F, Benedetti S (2013). Metabolism modifications and apoptosis induction after Cellfood™ administration to leukemia cell lines, *J Exp Clin Cancer Res* 32 (1), 63.
- Nuvoli B, Santoro R, Catalani S, Battistelli S, Benedetti S, Canestrari F, Galati R (2014). CELLFOOD™ induces apoptosis in human mesothelioma and colorectal cancer cells by modulating p53, c-myc and pAkt signaling pathways, *J Exp Clin Cancer Res* 5 (33), 24.
- Meijer TW, Kaanders JH, Span PN, Bussink J (2012). Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy. *Clin Cancer Res* 18(20), 5585-5594.

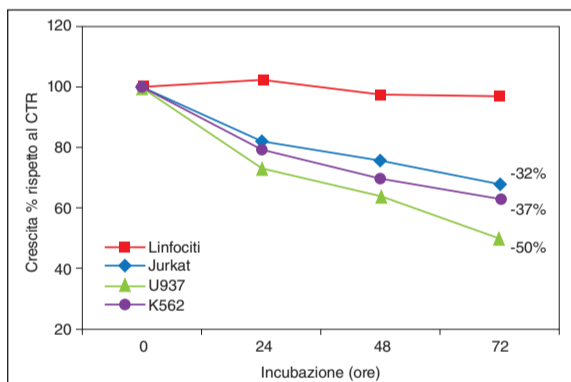


Figura 1 - Riduzione della crescita cellulare dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento con CF rispetto al controllo non trattato (CTR; crescita pari al 100%). Valutazione mediante conta delle cellule al microscopio ottico con il colorante trypan blue

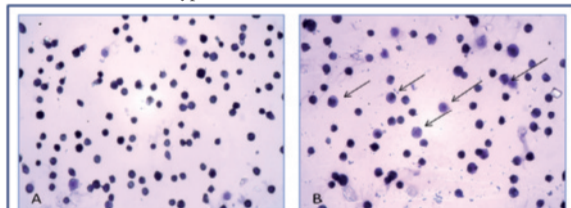


Figura 2 - Modificazioni morfologiche tipiche dell'apoptosi, come formazione di estroflessioni citoplasmatiche (blebbing) indicate con le frecce, in cellule Jurkat trattate con CF (B) rispetto a cellule di controllo non trattate (A). Valutazione mediante microscopio ottico in seguito a colorazione con May-Grunwald Giemsa

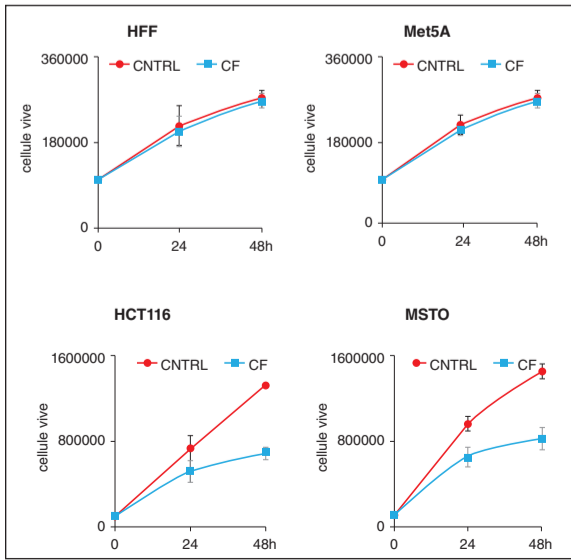


Figura 3 - Curve di proliferazione cellulare di due linee non tumorali (HFF, Met5A) e due linee tumorali (HCT-116, MSTO) trattate e non (CNTRL) con CF