

Titolo: L'effetto citotossico selettivo dei carotenoidi e dell' α -tocoferolo su linee cellulari tumorali umane in vitro - The Selective Cytotoxic Effect of Carotenoids and α -tocopherol on Human Cancer Cell Lines In Vitro.

Codice: RET012

Autore: Schwartz e Shklar

Data: 1992

Rivista: *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* 50:367-373

Argomento: Retinoidi

Accesso libero: si

DOI: [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(92\)90400-T](https://doi.org/10.1016/0278-2391(92)90400-T)

URL: [https://www.joms.org/article/0278-2391\(92\)90400-T/fulltext](https://www.joms.org/article/0278-2391(92)90400-T/fulltext)

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2023/12/02/ret012-schwartz-e-shklar-1992/>

Parole chiave: carcinoma, β -carotene, α -tocoferolo, proliferazione, vitalità cellulare, stato ossidativo

Tumore: carcinoma orale, mammario, polmonare, melanoma

Traduzione: Le sezioni dell'articolo "Riassunto", "Introduzione", "Discussione" sono state tradotte in modo fedele all'originale. Le sezioni "Materiali e Metodi" e "Risultati" sono riportate in modo molto semplificato e sintetico.

Punti di interesse: Le proprietà antitumorali di β -carotene, cantaxantina, α -tocoferolo e glutazione ridotto sono stati analizzate in sette diverse linee cellulari tumorali maligne umane: carcinoma orale (due linee cellulari), mammario (due linee cellulari), polmonare (due linee cellulari) e melanoma maligno. Come controllo sono stati usati: cheratinociti umani normali, cheratinociti della pelle del seno, cellule mammarie umane normali. Le cellule sono state trattate con β -carotene, cantaxantina, α -tocoferolo e glutazione ridotto. Dopo il trattamento con le opportune tecniche sono stati verificati i seguenti parametri: vitalità, vitalità dei mitocondri (livello di deidrogenasi succinica), proliferazione cellulare, produzione proteica mediante elettroforesi su gel. I risultati indicano che il trattamento con le sostanze testate porta nelle cellule tumorali, ma non in quelle normali, ad una diminuzione della vitalità, riduzione della succinico deidrogenasi e quindi della vitalità dei mitocondri, ridotta proliferazione cellulare, espressione di una proteina da 70 kD legata allo stress, cambiamenti morfologici e perdita di aderenza per diminuzione di sintesi di fibronectina. L'attività antitumorale di carotenoidi e vitamina E sarebbe legata allo stato dell'ossigeno nelle cellule, e determinata da una riduzione dell'attività della superossido dismutasi e della glutazione-S-transferasi e livelli più bassi di sulfidril non proteici. Queste riduzioni comportano la perdita di protezione dai metaboliti reattivi dell'ossigeno che sono in grado di danneggiare il DNA e la sintesi proteica delle cellule tumorali.

Traduzione articolo

Riassunto

Questo studio confronta gli effetti tossici dei carotenoidi, beta-carotene e cantaxantina, e dell'alfa-tocoferolo (vitamina E) sulle cellule tumorali umane e sulle loro controparti normali

in vitro. Sono state esaminate sette diverse linee cellulari maligne: carcinoma orale (due linee cellulari), mammario (due linee cellulari), polmonare (due linee cellulari) e melanoma maligno. I saggi di coltura cellulare in vitro hanno mostrato un cambiamento morfologico consistente nelle cellule tumorali dopo il trattamento con carotenoidi o vitamina E. Sono stati osservati un arrotondamento delle cellule tumorali e un eventuale sollevamento dalla piastra di coltura del tessuto. Questi cambiamenti erano evidenti dopo 1-5 ore di trattamento, a seconda della linea cellulare tumorale. A questi cambiamenti cellulari osservabili si sono associate riduzioni quantitative della proliferazione (proliferazione con 3H-timidina) e dell'attività della succinico deidrogenasi (saggio MTT). Inoltre, si è verificato un notevole cambiamento nell'espressione proteica, con un aumento dell'espressione di una proteina di 70-kD in seguito al trattamento con beta-carotene. Questa proteina era associata a cellule tumorali che mostravano una diminuzione della proliferazione (carcinoma orale, melanoma maligno) ma non a cheratinociti o melanociti normali. Questi studi confermano un effetto citotossico selettivo sulla crescita delle cellule tumorali umane da parte dei carotenoidi e dell'alfa-tocoferolo in vitro, e possono fornire una spiegazione dell'attività terapeutica di questi agenti e del loro possibile utilizzo nel trattamento della premalignità o del carcinoma orale precoce.

Introduzione

Precedenti studi in vivo hanno dimostrato che i carotenoidi, beta carotene (β -carotene), cantaxantina e α -carotene inibiscono la crescita delle cellule tumorali (1-6). Questo laboratorio ha ripetutamente dimostrato che questi agenti prevengono e inibiscono la carcinogenesi orale e regrediscono il carcinoma invasivo orale accertato utilizzando un modello di tumore della tasca buccale di criceto (7-11). Tali studi indicano che questi agenti possono agire direttamente sulle cellule tumorali. L'esame istopatologico di sezioni della mucosa orale, alcune contenenti carcinoma orale e altre esenti da tumore, non hanno mai mostrato un effetto tossico dei carotenoidi o dell' α -tocoferolo sulla mucosa orale. Al contrario, è stato dimostrato che la somministrazione di acido retinoico 13-cis, un analogo della vitamina A, promuove la crescita del carcinoma orale (11) e possibilmente danneggia la mucosa orale, mentre è stata osservata una reazione ertirodermica nei controlli di mucosa buccale non portatori di tumore (osservazione non pubblicata).

L'attività antitumorale del β -carotene può essere aumentata se combinato con ciclofosfamide o radiazioni, aumentando la sopravvivenza dei topi con adenocarcinoma mammario (12,13). Il β -carotene e l' α -tocoferolo possono anche aumentare l'attività antitumorale di agenti chemioterapici come Melfalan (Sigma Chemical, St Louis, MO) e cisplatino verso le cellule di carcinoma orale umano in vitro (14). Particolarmente degna di nota è stata una diminuzione di 1000 volte della capacità clonogenica delle cellule del carcinoma in seguito al trattamento combinato di β -carotene e Melfalan (14). Abbiamo anche dimostrato che sia il β -carotene che l' α -tocoferolo riducono la proliferazione e l'attività della succinico deidrogenasi nel carcinoma orale umano e a cellule squamose del polmone in vitro (15), inibendo al contempo la crescita del carcinoma orale invasivo stabilito nel criceto quando somministrato per via orale (10). Questi cambiamenti nell'attività cellulare dopo il trattamento con β -carotene erano associati all'espressione di una proteina da 70 kD nelle cellule tumorali trattate (15).

I dati qui presentati mostrano che i carotenoidi, come il β -carotene e la cantaxantina e l' α -tocoferolo, possono esercitare un effetto debilitante simile e selettivo sulla crescita delle cellule tumorali indipendentemente dall'origine originale della cellula tumorale. Inoltre, è stato dimostrato che questa riduzione nella crescita delle cellule tumorali in vitro non è evidente nei normali tipi di cellule umane. È stato inoltre dimostrato che una proteina da 70 kD è espressa nelle cellule di carcinoma orale umano e di melanoma maligno e non nei cheratinociti o melanociti normali. Questa proteina viene osservata quando le cellule tumorali vengono stressate dal riscaldamento (15),

indicando la possibilità che anche la proteina da 70 kD derivi dalla famiglia delle proteine dello stress. Presi insieme, questi dati forniscono una maggiore comprensione dell'attività terapeutica dei carotenoidi o dell' α -tocoferolo verso diversi tumori umani.

Materiali e metodi

In questi studi sono state utilizzate sette cellule maligne: due linee cellulari di carcinoma orale, due linee cellulari mammarie, due carcinomi polmonari e un melanoma maligno. Come controllo sono stati usati cheratinociti umani normali, cheratinociti della pelle del seno, cellule mammarie umane normali. Le cellule sono state trattate con β -carotene, cantaxantina, succinato acido α -tocoferolo o glutazione ridotto (70 PM). Sono state analizzate: variazione della vitalità, dosaggio del tetrazolio (MTT) per quantificare il livello di deidrogenasi succinica, un determinante della vitalità dei mitocondri, la proliferazione cellulare tramite il test di incorporazione di timidina, e un'analisi proteica mediante elettroforesi su gel.

Risultati

a) Diminuzione della vitalità delle linee cellulari tumorali trattate con carotenoidi e tocoferolo rispetto alle cellule tumorali non trattate.

b) riduzione della succinico deidrogenasi è stato notevolmente ridotto dal trattamento con β -carotene e cantaxantina, mentre è stato osservato un effetto inferiore con α -tocoferolo e un piccolo cambiamento con il glutatione (ridotto) rispetto alle cellule di controllo. Non è stata osservata alcuna diminuzione significativa dell'attività della succinico deidrogenasi nei cheratinociti o melanociti normali con nessuno degli agenti.

c) Il livello di incorporazione della timidina ha confermato una ridotta proliferazione della crescita cellulare, con il β -carotene che ha prodotto la maggiore riduzione complessiva della crescita delle cellule tumorali, seguito dalla cantaxantina e poi dall' α -tocoferolo e dal glutatione. Ancora una volta questa inibizione della proliferazione non è stata osservata con le cellule normali.

d) il β -carotene determina l'espressione di una proteina da 70 kD nelle cellule di carcinoma orale e nel melanoma maligno, ma non nei cheratinociti o melanociti normali.

e) Il trattamento con β -carotene è stato associato all'arrotondamento e alla perdita di aderenza di alcune cellule in alcune piastre di coltura dei tessuti. Dopo 5 ore alcune cellule apparivano rigonfie o rimpicciolite e non erano vitali.

Discussione

I dati hanno indicato che i carotenoidi e l' α -tocoferolo potrebbero alterare selettivamente lo stato cellulare delle cellule tumorali umane provenienti da diversi siti anatomici. La prova di questa affermazione è la risposta osservata dopo l'incubazione con i vari agenti (Fig. 1, 2), la quantificazione del livello di succinico deidrogenasi (Tabella I), la determinazione dell'incorporazione di timidina (saggio di proliferazione) (Fig 3) e l'analisi della sintesi proteica delle cellule tumorali e delle loro controparti normali (Fig 4). La riduzione della crescita delle cellule tumorali e dell'espressione di una proteina da 70 kD non è stata associata ad un cambiamento osservabile nella differenziazione delle cellule tumorali.

Studi precedenti hanno indicato che i carotenoidi come il β -carotene e l' α -carotene potrebbero ridurre la crescita delle cellule di neuroblastoma umano inibendo le cellule nelle fasi G_0 - G_1 del ciclo cellulare (20). Abbiamo anche osservato che le cellule di carcinoma orale e mammario si accumulano a questo punto dopo il trattamento con β -carotene e α -tocoferolo. L'accumulo di queste

cellule a questo punto del ciclo cellulare può spiegare la diminuzione delle cellule tumorali nella fase S (Fig 3).

Il cambiamento nell'adesione delle cellule tumorali può essere correlato alla ridotta espressione della fibronectina, una proteina di adesione extracellulare. Utilizzando la citometria a flusso, abbiamo osservato e quantificato la riduzione della fibronectina per le cellule di carcinoma orale e mammario (dati non pubblicati).

L'attuale meccanismo dell'attività antitumorale del carotenoide β -carotene deriva dall'analisi dello stato dell'ossigeno delle cellule di carcinoma orale. I dati hanno indicato una riduzione dell'attività della superossido dismutasi e della glutatione-S-transferasi e livelli più bassi di sulfidrili non proteici. Queste riduzioni comportano la perdita di protezione dai metaboliti reattivi dell'ossigeno che potrebbero danneggiare il DNA e la sintesi proteica delle cellule tumorali. Il cambiamento nella protezione dell'ossigeno potrebbe comportare l'induzione dello stress ossidativo (21).

Lo stato dell'ossigeno della cellula tumorale orale altererà direttamente la capacità del β -carotene o dell' α -tocoferolo di inibire la risposta clonogenica delle cellule tumorali. Abbiamo dimostrato che la cellula tumorale ossigenata trattata con β -carotene mostrerà una risposta clonogenica ridotta rispetto alla cellula tumorale ipossica. Per ridurre la crescita clonogenica delle cellule tumorali orali in una condizione ipossica, il β -carotene doveva essere combinato con l' α -tocoferolo (14,22). Questi risultati supportano risultati precedenti che indicavano che il β -carotene potrebbe funzionare come una molecola proossidante ad alte pressioni parziali di ossigeno, mentre l' α -tocoferolo richiederebbe una pressione parziale di ossigeno inferiore (23). Le forme proossidanti del β -carotene e dell' α -tocoferolo potrebbero essere reattive e alterare lo stato metabolico delle cellule tumorali.

È importante riconoscere che l'induzione dello stress ossidativo è stata associata ad un'aumentata espressione delle proteine dello stress, come la proteina da 70 kD mostrata qui (24). La colorazione immunofluorescente della mucosa orale umana e di criceto ha dimostrato che i carcinomi orali hanno un'espressione ridotta di proteine dello stress rispetto alla mucosa non portatrice di tumore (dati non pubblicati). Significativamente, il trattamento con β -carotene della mucosa orale di criceto ha inibito la formazione di carcinoma orale invasivo e ha aumentato l'espressione delle proteine dello stress.

Inoltre, la colorazione immunofluorescente in vitro, il Western immunoblotting e l'immunoprecipitazione di estratti proteici solfatati e fosforilati da cellule tumorali umane e di criceto hanno anche confermato l'identità e l'espressione delle proteine dello stress (70 e 90 kD) indotte dal β -carotene (dati non mostrati). Sono attualmente in corso studi che descrivono in dettaglio la capacità delle proteine dello stress di controllare l'espressione di proto-oncogeni e forme mutate. Il completamento di questi studi potrebbe stabilire un nuovo percorso per l'attivazione della soppressione del tumore. L'importanza di questo percorso di soppressione del tumore è la consapevolezza che i nutrienti facilmente disponibili possono innescare l'inibizione della crescita di vari tumori. Un recente studio clinico ha indicato che la somministrazione orale di β -carotene inverte la leucoplachia orale (25).