



ACIDO FOLIOTICO: EFFETTO IN CELLULE METASTATICHE DI MELANOMA CUTANEO

Giovanni Marino

Relatore: Prof.ssa Alessandra Russo

Correlatore: Prof.ssa Venera Cardile

*Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche,
Dipartimento di Scienze del Farmaco e della Salute, Università degli Studi di Catania*

Riassunto di TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

Anno Accademico 2023/2024

Introduzione. Il melanoma cutaneo è una neoplasia maligna dei melanociti la cui incidenza e mortalità sono in progressivo aumento in tutto il mondo. Si origina per interazione tra fattori esogeni (es. radiazione ultravioletta) e fattori endogeni (es. mutazione genetica) e si sviluppa attraverso una serie di meccanismi patogenetici diversi. È noto che le poliammine naturali come putrescina, spermidina, spermina sono coinvolte nella patogenesi del cancro. Si tratta di policationi organici caratterizzati da uno scheletro carbonioso e da più gruppi amminici alifatici, i cui azoti basici sono carichi positivamente a pH fisiologico. Sono essenziali per la crescita cellulare e svolgono un ruolo importante nella differenziazione, nella proliferazione e nella sopravvivenza; tuttavia, per espletare queste funzioni biologiche, devono avere un'adeguata concentrazione intracellulare e mantenerla costante nel tempo attraverso una stretta regolazione del metabolismo. Poiché un loro aumento è associato alla proliferazione e alla sopravvivenza cellulare, le poliammine possono influenzare lo sviluppo del melanoma cutaneo e degli altri tumori solidi e rappresentare potenziali target farmacologici per il trattamento del cancro. A tal proposito, gli analoghi sintetici delle poliammine sono strutturalmente simili a putrescina, spermidina e spermina ma agiscono come (i) poliammine-mimetici, se spostano le poliammine naturali dai siti di legame ed impediscono le loro funzioni biologiche, (ii) poliammine-antimetaboliti, se si accumulano nel citoplasma e abbassano il contenuto delle poliammine naturali; in entrambi i casi, l'effetto finale è il blocco della crescita cellulare (effetto citostatico) o la morte cellulare (effetto citotossico). Evidenze sperimentali mostrano che alcuni analoghi delle poliammine, come la N¹,N¹¹-diethylspermina, sono molto attivi nelle cellule di melanoma cutaneo, le quali sono sempre più resistenti alla radio e alla chemioterapia. Pertanto, l'applicazione di terapie complementari (anche di origine naturale) può essere utile per supportare le terapie convenzionali e migliorare la qualità di vita del paziente oncologico. I funghi medicinali, per esempio, contengono una varietà di metaboliti secondari che, essendo in grado di influenzare le vie di segnalazione cellulari della proliferazione e dell'apoptosi, potrebbero avere successo contro il cancro. L'acido foliotico {(2R)-2-[(S)-3-idrossi-3-metilglutarilossi] putrescina dicinnammide} è un analogo della putrescina (in figura) ed è prodotto dal fungo *Cileno Pholiota spumosa* (Fr.) Singer (Strophariaceae). Esso si è dimostrato molto attivo nelle cellule tumorali di prostata umana, quindi lo scopo del nostro studio è stato (i) valutare se fosse in grado di inibire anche la crescita in vitro delle cellule metastatiche di melanoma cutaneo e, eventualmente, (ii) chiarire il suo meccanismo d'azione antitumorale.

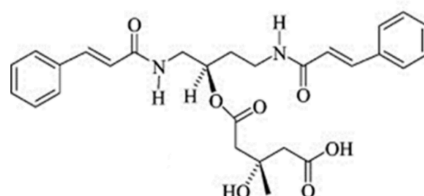


Figura. Struttura chimica dell'acido foliotico

Materiali e metodi. L'acido foliotico è stato isolato dai corpi fruttiferi del fungo ed usato a diverse concentrazioni (6,25-50 μM) per trattare le cellule metastatiche di melanoma cutaneo umano (M14 e A2058) e le cellule di fibroblasti normali umani, precedentemente piastrate ad una densità costante e incubate per 24 ore a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% di CO_2 . Dopo incubazione per altre 72 ore nelle medesime condizioni sperimentali, sono stati eseguiti il saggio MTT (vitalità cellulare), il saggio LDH (integrità della membrana plasmatica), il saggio CASP-3 (apoptosi), l'analisi del DNA nucleare mediante il saggio Comet (apoptosi), l'analisi delle proteine PTEN, CASP-9 e CASP-3, Hsp-70, Bcl-2 e Bax mediante la tecnica Western Blot e il saggio ROS (stress ossidativo).

Risultati. L'acido foliotico ha ridotto la vitalità in entrambe le cellule di melanoma cutaneo. Non è stato osservato alcun aumento significativo del rilascio di LDH (enzima citoplasmatico), il contrario per l'attività di CASP-3. È stata evidenziata un'alta frammentazione del DNA, oltre che una maggiore espressione di PTEN (fosfatasi della via AKT), CASP-9 e CASP-3 (proteasi delle vie apoptotiche), Bax (proteina pro-apoptotica) e una minore espressione di Bcl-2 (proteina anti-apoptotica) e Hsp-70 (chaperon molecolare). Infine, è stata rilevato un aumento di ROS (radicali liberi a base di ossigeno) correlabile a una minore espressione di SOD (enzima antiossidante); tuttavia, il trattamento con acido foliotico e NAC (sostanza antiossidante) ha ripristinato in parte la vitalità cellulare e ridotto i livelli di ROS, la frammentazione del DNA e l'attività di CASP-3 in entrambe le linee cellulari.

Discussione. L'acido foliotico è strutturalmente simile alla putrescina e la sua potenziale attività antiproliferativa (evidenziata da una riduzione della vitalità in entrambe le cellule di melanoma cutaneo) si esplica probabilmente attraverso lo stesso meccanismo molecolare degli analoghi delle poliammine; in particolare, l'acido foliotico potrebbe causare una deplezione delle poliammine naturali ma, a motivo del cross-talk tra il loro metabolismo e le vie di segnalazione cellulari, potrebbe anche aumentare l'espressione di PTEN, arrestando così la crescita delle cellule tumorali (effetto citostatico). Il rilascio non significativo di LDH indica che l'acido foliotico non determina la loro morte per necrosi mentre l'alta frammentazione del DNA nucleare, insieme all'aumento dell'attività della CASP-3 e all'aumento dell'espressione della CASP-3 e della CASP-9, indicano che potrebbe determinare la loro morte per apoptosi (effetto citotossico); per di più, la sovra-regolazione di Bax e la sotto-regolazione di Bcl-2 indicano la sua potenziale capacità di attivare la via intrinseca dell'apoptosi, ulteriormente confermata dalla sotto-regolazione di Hsp-70. Infine, l'aumento dei ROS è associato alla diminuzione dell'espressione di SOD ed è correlabile all'aumento della degradazione delle poliammine; il trattamento con acido foliotico e NAC riduce i ROS e ripristina parzialmente la vitalità cellulare, suggerendo che anche lo stress ossidativo potrebbe essere coinvolto nella morte di entrambe le cellule metastatiche di melanoma cutaneo.

Conclusioni. L'acido foliotico è un potenziale agente antitumorale per il melanoma cutaneo e rappresenta un possibile supporto integrativo alle terapie convenzionali, consentendo così il miglioramento della loro efficacia e il superamento della resistenza.