

* Istituto Internazionale Barco, Ricerche e Cure ossidative, Pisa, Italia.

** National Research Council of Italy, C.N.R., Institute of Chemistry of Organo Metallic Compounds-ICCOM, Pisa, Italy.

*** Hematology Unit, Department of Oncology, University of Pisa, Pisa, Italy.

**** Azienda Ospedaliera San Giuseppe Moscati - Avellino

UNA MISCELA COSTITUITA DA OPL-ROS E GALLOFLAVINA COME EFFICACE INIBITORE DELLE VIE ENERGETICHE NELLE CELLULE NEOPLASTICHE

G. BARCO*, M. ONOR**, E. BENEDETTI***, E. BRAMANTI**, A. MASUCCI****

Sintesi

Otto Warburg¹, nei primi anni del secolo scorso, osservò che la maggior parte delle cellule tumorali, mostrava contestualmente ad una ridotta attività respiratoria mitocondriale, un elevato consumo di glucosio e un'alta produzione di acido lattico, si tratta di un fenotipo metabolico espresso dalle cellule anaerobiche, ma che si manifesta in condizioni di pressioni parziali normali di ossigeno, fenomeno per questo definito glicolisi aerobica e conosciuto in biochimica come *effetto Warburg*. La glicolisi aerobica non si osserva solo nelle cellule neoplastiche ma anche nelle cellule normali in rapida crescita, perché fonte di metaboliti necessari per la produzione delle cellule figlie. Per alcuni anni la soppressione della glicolisi aerobica è stata considerata una possibile strategia terapeutica nella lotta ai tumori, tuttavia recenti studi hanno evidenziato che l'ablazione genetica della sola glicolisi aerobica, in particolari linee di cellule tumorali, non determina la auspicata soppressione della moltiplicazione cellulare in risposta alla netta riduzione di produzione di acido lattico². In questo studio è

stata analizzata la risposta di una linea cellulare di epatocarcinoma indifferenziato, caratterizzata dal fenotipo glicolitico aerobico e coltivata in presenza di una miscela acquosa satura di ROS, indicata con l'acronimo OPL (Ossigeno Poliatomico Liquido), contenente un inibitore non competitivo della lattico deidrogenasi, la galloflavina. L'inibitore blocca l'azione della lattico deidrogenasi e i ROS dell'OPL bloccano la respirazione mitocondriale. L'effetto combinato porta a inibire le vie energetiche delle cellule neoplastiche indirizzandole verso l'apoptosi.

Ipotesi

Il termine cancro definisce una condizione biochimica cellulare caratterizzata e sostenuta da alterazioni genetiche che conducono alla trasformazione neoplastica³. Si tratta di un'instabilità genomica che comporta una compromissione dell'efficienza della respirazione cellulare⁴ e una riprogrammazione metabolica conosciuta come glicolisi aerobica, una via energetica caratterizzata da una velocità molto più alta rispetto alla glicolisi espressa dalle cellule dotate di una catena respiratoria mitocondriale normale⁵. È sempre la stessa glicolisi aerobica espressa dalle cellule neoplastiche a rappresentare un ulteriore fattore di esaltazione dell'instabilità genomica⁶, causando la comparsa di mutazioni di geni che codificano non solo enzimi coinvolti nella riparazione del DNA⁷, ma anche particolari proteine implicate sia nel trasporto di membrana del glucosio sia nella attivazione della proliferazione cellulare. Molto studiato è il caso di mutazioni che coinvolgono la via metabolica PI3/AKT⁸, una proteina citoplasmatica, la cui attivazione induce non solo la crescita cellulare, ma anche la comparsa della glicolisi aerobica.

Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di un rapporto diretto tra mutazioni genetiche su base ossidativa, attività della proteina p53⁹ e apoptosi, una importante via di segnalazione cellulare che può essere sfruttata per la messa a punto di nuovi presidi terapeutici nella lotta contro i tumori¹⁰. Le Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) e i loro prodotti, rappresentano specifici indici di danno metabolico cellulare, responsabili della trasformazione neoplastica, ma rimane ancora inspiegabile come qualsiasi approccio terapeutico di contrasto ai ROS, come dosi massicce di antiossidanti, non abbia ancora portato

agli sperati successi terapeutici, anzi la storia della terapia antitumorale con antiossidanti è tuttora costellata di risultati contraddittori. Molti dati fanno pensare che il fallimento della strategia antiossidante nel cancro, possa essere attribuita al doppio ruolo dei ROS, uno che porta verso proliferazione cellulare, e l'altro nella direzione opposta, cioè verso l'attivazione dell'apoptosi, al punto che è possibile passare da una strategia terapeutica anticancro mediante antiossidanti¹¹ a quella con i ROS, allo scopo di indirizzare le cellule tumorali verso l'apoptosi piuttosto che verso la loro proliferazione¹². Obiettivo di questo lavoro è dimostrare che le colture cellulari di epatocarcinoma indifferenziato quando sono incubate in presenza di ROS e di galloflavina, un inibitore non competitivo della lattico deidrogenasi (LDH), inibiscono la glicolisi aerobica e interferiscono sulla respirazione mitocondriale, indirizzandole verso la apoptosi¹⁶, suggerendo nuove possibili strategie terapeutiche contro i tumori primitivi del fegato.

Introduzione

Nelle cellule dotate di una efficiente respirazione mitocondriale, più del 90% dell'ossigeno molecolare è trasformato in acqua, mentre il restante è ridotto in anione superossido libero, che attiverà la cascata generazionale di Specie Reattive dell'Ossigeno^{13 14}; tra queste si trovano lo ione superossido, il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossile ($OH\cdot$) e l'ossido nitrico ($NO\cdot$). La produzione endogena, ma anche la loro diversa distribuzione intracellulare, fanno dei ROS un possibile "*gas controllers*" di importanti vie di segnalazione, che inducono alla proliferazione ma anche all'apoptosi cellulare¹⁶. Nelle cellule neoplastiche, la maggior parte dei mitocondri sono incapaci di utilizzare al meglio la molecola di ossigeno; gli elettroni della fosforilazione ossidativa vengono deviati verso un'aumentata produzione di ioni superossido, amplificando così lo stress ossidativo¹⁷ respiratorio, inducendo in tal modo mutazioni che porteranno la proteina p53 ad indirizzare le cellule neoplastiche verso l'apoptosi. A tal proposito, Molti studi hanno evidenziato nel sangue e nelle urine di malati di cancro alti livelli di purine e pirimidine ossidate, un grave indice di danno ossidativo degli acidi nucleici¹⁸; tuttavia resta ancora inspiegabile, come qualsiasi approccio terapeutico di contrasto ai ROS, attraverso somministrazioni di dosi massicce di antiossidanti, non

abbiano ancora portato agli sperati successi terapeutici. Anzi, si può affermare con certezza che la storia della terapia antitumorale con antiossidanti è costellata più da dati contraddittori che coerenti¹⁹. Molti dati fanno pensare che il fallimento della strategia antiossidante nel cancro può essere attribuita al doppio ruolo dei ROS, uno che porta verso proliferazione cellulare, e l'altro nella direzione opposta, verso l'attivazione dell'apoptosi, al punto che è possibile passare da una strategia terapeutica anticancro mediante antiossidanti a quella con i ROS^{20 21 22}.

L'instabilità genomica che è alla base della trasformazione neoplastica è dovuta a danni ossidativi²³ causati

soprattutto da ioni ossidrilici, che oltre ad interessare le proteine della cromatina, coinvolgono soprattutto le purine e in particolar modo la guanina; un danno ossidativo documentato soprattutto dal rilascio nel sangue e nelle urine di 8-oxoguanine (8-oxoG) nei soggetti affetti da tumore²⁴. È stato anche osservato che una delle cause dell'instabilità genomica, che porta alla trasformazione neoplastica, è la presenza di mutazioni che interessano il gene TP53. Il gene TP53 codifica per la fosfoproteina tp53, un fattore di trascrizione in grado di regolare il ciclo cellulare in presenza di ROS^{25, 26}. Nelle fasi iniziali della trasformazione neoplastica, la proteina tp53 è in grado di prevenire le mutazioni del DNA operata dai ROS, riducendone l'instabilità, sopprimendo i tumori nelle loro fasi iniziali. Nelle fasi tardive della trasformazione neoplastica, quando le mutazioni del DNA sono gravi al punto che non è più possibile una sua effettiva riparazione, la proteina è in grado di indirizzare la cellula neoplastica verso la apoptosi²⁷. Altra importante funzione di soppressione tumorale dei ROS attraverso l'azione della fosfoproteina tp53 è quella di inibire l'angiogenesi²⁸.

Alcune osservazioni, indicano un possibile rapporto tra la glicolisi aerobia delle cellule neoplastiche e lo stato ossidativo tissutale²⁹. Le cellule neoplastiche generalmente esprimono un metabolismo anaerobico, nonostante la presenza di normali pressioni parziali di ossigeno, ed è per questo che è chiamata "glicolisi aerobia"³⁰. Si tratta della fermentazione omolattica che, benché sia caratterizzata da una bassa resa energetica, nelle cellule neoplastiche è altamente potenziata da un alto livello di enzimi glicolitici³¹, al punto da presentare una velocità circa cento volte maggiore della glicolisi normale, conferendo alle cellule tumorali una più alta resistenza, anche in condizioni di scarsa

o incompleta ossigenazione, come spesso avviene nei tumori solidi³². Inoltre la glicolisi aerobia è particolarmente vantaggiosa per le cellule in attiva replicazione, comprese quelle tumorali, in quanto i suoi metaboliti intermedi costituiscono i precursori necessari sia per la duplicazione degli acidi nucleici, sia per le strutture che costituiranno le nuove cellule figlie, attraverso la via metabolica del pentosio fosfato³³. La presenza della glicolisi aerobia nelle cellule tumorali, causa un abbondante produzione di acido lattico che induce una acidificazione del microambiente, rappresentando un importante fattore facilitante l'invasione tumorale, sia per la degradazione acida della matrice extracellulare, sia per la forte induzione che l'acidosi extracellulare svolge sul fenomeno dell'angiogenesi.

Le cellule che compongono una massa tumorale si possono trovare in due condizioni di metabolismo: una detta "condizione aerobica", caratterizzata da un ambiente con normali pressioni parziali di ossigeno, in cui il piruvato è completamente ossidato a CO₂ e H₂O tramite il ciclo dell'acido citrico e la catena di trasporto degli elettroni; l'altra, più frequente, definita "glicolisi aerobia", costituita da una riprogrammazione metabolica energetica operata da cellule che, in condizioni ambientali caratterizzate da adeguati pressioni parziali di ossigeno, esprimono la fermentazione omolattica³⁴.

Enzima centrale della glicolisi aerobica è la Lattico deidrogenasi (LDH), che converte il piruvato prodotto dalla glicolisi in acido lattico, riossidando il NADH ottenuto dalla Glicer aldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), sostenendo così il continuo flusso della glicolisi, che richiede un costante apporto di NAD ossidato come accettore di elettroni³⁵. Il risultato dell'attività enzimatica della Lattico Deidrogenasi è una elevata produzione e accumulo di acido lattico associata ad una elevata acidosi. La lattico deidrogenasi (LDH) è un enzima ubiquitariamente presente in quasi tutti gli esseri viventi, compreso l'uomo, nel quale sono riconoscibili 5 diverse isoforme, tutte tetrameriche e formate dalla combinazioni di due differenti tipi di subunità, M e H, codificate da due diversi geni *ldh-a* e *ldh-b*. E' la diversa combinazione di questi monomeri a formare due isoforme omotetrameriche chiamate LDH-A (M₄) e LDH-B (H₄) e tre isoforme eterotetrameriche LDH-2 (M₁H₃), LDH-3 (M₂H₂), LDH-4 (M₃H₁)³⁶. Sempre nell'uomo si riconosce una diversa isoforma LDH-X (C₄), il cui monomero è codificato dal gene *ldhc* ed è fenotipicamente espressa principalmente nei testicoli e negli spermatozoi. Le cinque isoforme della LDH oltre a

presentare una differente distribuzione tissutale³⁷, hanno anche una diversa compartimentazione intracellulare e si differenziano sia nella cinetica enzimatica, che nella loro regolazione^{38 39}. I tessuti caratterizzati da un intenso metabolismo aerobico, come quelli del cervello e cuore, esprimono isoforme costituite per la maggior parte da subunità H, come la LDH-B (o LDH-1)⁴⁰ e la LDH-2, mentre le isoforme composte principalmente da subunità M (LDH-A o LDH-5 e la LDH-4) sono espresse specialmente nei tessuti che vanno incontro spesso a condizioni di anaerobiosi, come tessuti tumorali oppure le cellule epatiche e muscolari scheletriche⁴¹. L'isoforma LDH-3 si trova espressa nei tessuti tumorali maligni e nei tessuti linfatici, mentre l'isoforma LDH-A è sovraespressa nelle cellule neoplastiche ad elevata velocità proliferativa; essa è associata ad un'alta velocità glicolitica aerobica e alla conseguente alta produzione di acido lattico.

Questo studio si propone di valutare *"in vitro"* una possibile strategia antitumorale attraverso l'uso di una miscela acquosa satura di ione superossido e altri ROS in tracce e della galloflavina, che inibisce la lattico deidrogenasi^{42 43}, senza però danneggiare le cellule sane, le quali con sufficiente apporto di ossigeno non necessitano di questo enzima⁴⁴. A supporto di questa ipotesi, vi è l'evidenza che cellule tumorali con ridotta attività di LDH, ottenuta mediante shRNA o siRNA, mostrano una riduzione della loro cancerogenicità.

Materiali e metodi

Ossigeno Poliatomico Liquido (OPL).

OPL, acronimo di Ossigeno Poliatomico Liquido è utilizzato per indicare una miscela acquosa bidistillata, sterile e apirogena, nella quale sono stati disciolti ROS alla molalità di un grammo/litro, ottenuti attraverso un generatore OPL-ROS a tecnologia sputtering, Dispositivo medico (DMe) n°000CO2017809000053 prodotto dalla Barcoline s.r.l. su licenza dell'Istituto Internazionale Barco S.p.A. La tecnologia di produzione OPL-ROS è coperta da brevetto. La tecnologia OPL si basa sulla diffusione di una miscela gassosa ricca di ROS, prodotta in sputtering, setacciata attraverso un filtro semipermeabile polimerico in polisulfone (PES), in controcorrente rispetto ad un

flusso di acqua sterile per preparazioni iniettabili. La membrana (PES) è un materiale a scambio non ionico, che permette di bloccare gli ioni positivi per mezzo dei gruppi solfonato mentre gli anioni ROS passano selettivamente nella soluzione acquosa bidistillata, costituendo una soluzione acquosa satura di ROS alla molalità 1g/L, tale da poter essere utilizzata, in immediato, durante la produzione della miscela, come fonte di specie reattive dell'ossigeno in fase acquosa. Le membrane per la produzione di OPL-ROS utilizzate in questo studio, sono state prodotte in modo da essere dotate di spiccata stabilità nei confronti degli agenti ossidanti, di un range di resistenza al pH compresa tra 3 e 12 e dalla capacità di inibire qualsiasi proliferazione batterica. Usando i metodi analitici e le sonde successivamente elencate, è stato dimostrato che l'OPL è una soluzione satura di ROS contenente: anione superossido ($O_2^{\bullet-}$), radicali OH, radicali NO e ossigeno singoletto. Con le stesse metodiche analitiche è stata valutato il decadimento della capacità ossidativa della miscela OPL-ROS, che corrisponde ad una emivita di circa 6 ore, emivita che dipende sia dalla temperatura, dal pH e dalla purezza dell'acqua bidistillata.

L'ossigeno singoletto è stato rivelato mediante una sonda specifica (S36002-Life Technologies). Tale sonda non mostra alcuna risposta apprezzabile al radicale ossidrilico o al superossido. Questo indicatore inizialmente mostra una fluorescenza blu debole, ma in presenza di ossigeno singoletto, emette una fluorescenza verde ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$) simile a quella della fluoresceina.

L'anione superossido ($O_2^{\bullet-}$) è stato rilevato utilizzando il ferricitocromo c (da cuore di cavallo C7752, Sigma-Aldrich Milano Italia) come sonda. L'anione superossido reagisce riducendo il ferricitocromo a ferrocitocromo e questa reazione è seguita mediante spettroscopia di assorbimento a 550 nm. L'anione superossido è stato rivelato anche in UV a 258 nm ($\epsilon = 1010 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 240 nm).

L'ossido nitrico è stato determinato utilizzando la sonda DAF-2 (4,5-diamminofluoresceina-2, D224 Sigma Aldrich Milano, Italia). In presenza di NO la DAF-2 diventa DAF-2T ed aumenta l'emissione a 515 nm ($\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$).

L'acido tereftalico (THA 185361 Aldrich) è stato impiegato come sonda specifica per i radicali idrossilici. I radicali OH convertono l'acido tereftalico in acido 2-idrossitereftalico (HTA) [12, 13]. L'HTA è stata rilevata mediante misurazione della fluorescenza ($\lambda_{exc} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 425 \text{ nm}$).

Sintesi della Galloflavina (CAS 586-80-9)

La galloflavina è una molecola che inibisce la glicolisi aerobica attraverso un blocco non competitivo per il piruvato delle LDH-A e LDH-B⁴⁵. Inoltre la galloflavina ha anche la capacità di ridurre la produzione di ATP, senza interferire con la respirazione cellulare. La galloflavina oltre presenta una buona capacità di penetrazione nelle cellule di epatocarcinoma indifferenziato ottenuto da una lesione neoplastica primitiva dal lobo VIII di un soggetto di sesso maschile^{46 47}. Non essendo reperibile in commercio, la galloflavina è stata sintetizzata seguendo la procedura di sintesi dell'acido gallico attraverso l'ossidazione in ambiente alcalino (KOH) (pH >10) in soluzione idroalcolica⁴⁵, mentre la purezza della galloflavina è stata determinata al 99.5% mediante sistema HPLC-DAD-TOF (ESI+ ed ESI-).

Metodo di Misurazione delle variazioni di acido lattico nelle colture cellulari

L'acido fosforico per l'analisi HPLC è stato preparato a partire da sodio fosfato monobasico monoidrato (BDH Laboratory Supplies, Poole, Inghilterra) e acido fosforico (V800287 VETEC ≥85%). Il metanolo per misure di cromatografia a fase inversa (RP-HPLC) è stato acquistato da Carlo Erba (Rodano, MI, Italia). La preparazione / diluizione di campioni e soluzioni è stata eseguita gravimetricamente con acqua ultrapura (MilliQ, 18,2 MΩ cm⁻¹ a 25 ° C, Millipore, Bedford, MA, USA).

Analisi del lattato mediante RP-HPLC con rilevamento UV

Per l'analisi del lattato è stato utilizzato un sistema HPLC (1260 Infinity Agilent Technologies) dotato di autocampionatore, degaser meccanico e rivelatore UV / vis diode array a 210 nm (volume iniettato 10 µL). Le separazioni sono state effettuate mediante una colonna RP HPLC Hydra RP C18 (Phenomenex) 250 x 4,6 mm (dimensione della particella di silice 4 µm) in eluizione isocratica in acido fosforico 0,1% e flusso 0,8 ml min⁻¹. La corsa cromatografica è completa in 15 minuti.

Misurazione delle variazioni di ossigeno nelle colture cellulari

In questo studio è stata valutata la respirazione mitocondriale mediante il consumo di ossigeno nelle 24 ore, in colture cellulari di epatocarcinoma indifferenziato, quando queste sono incubate in assenza di galloflavina e OPL-ROS (grafico 1, controllo), in presenza di 50 μM di OPL-ROS (grafico 2), in presenza di 200 μM di galloflavina (grafico 3) e in presenza di 50 μM di OPL-ROS e 200 μM di galloflavina (grafico 4).

Le variazioni di ossigeno sono state misurate con PeriFlux Sistem 5000 (Perimed), sensore Tc electrode E5280-tcpO₂/tcpCO₂ (REF-945-377) RADIOMETER. Anello di fissaggio dell'elettrodo TC550 Perimed. Software PSW ExM.

Misurazione di ATP nelle colture cellulari

Per la misurazione della produzione di ATP si è ricorsi a un Kit di dosaggio fluorometrico MAK190- Adenosine triphosphato Assay Kit (Sigma-Aldrich), costituito da: ATP Assay Buffer 25 ml, ATP Probe, in DMSO 0.2 mL, ATP Converter 1 vl, Developer Mix 1 vl, ATP standard 1.0 mmole 1 vl.

Coltura cellulare di cellule di epatocarcinoma indifferenziato

Le cellule di epatocarcinoma indifferenziato sono state ottenute da una lesione primitiva posta nel lobo VIII epatico e prelevate attraverso un ago di 15 G. Le cellule sono state in seguito separate con tripsinizzazione e sospese mediante centrifugazione e lavaggio in PBS. Sono state messe in coltura con DMEM e/o 25 mM di glucosio. Tutti i terreni di crescita cellulare sono stati integrati con 10% di FBS, amminoacidi non essenziali, 100 U/mL di penicillina G e 100 $\mu\text{g/mL}$ di streptomycin e L-glutamina 2mM. Le cellule sono state coltivate a 37 °C in un incubatore a 5% di CO₂ umidificato. Le cellule sono state seminate in piastre di 75 cm² e usate durante la loro fase di crescita esponenziale. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti su cellule dopo 24 ore dalla loro semina.

Misurazione del contenuto intracellulare di OPL-ROS

I ROS-OPL intracellulari sono stati misurati attraverso sonde fluorescenti sensibili all'ossidazione, DHE e DCFH-DA, dopo che le cellule di epatocarcinoma indifferenziato sono state seminate in piastre multipozzetto da 6 alla concentrazione di 2×10^6 per pozzetto. La sonda DHE rileva la presenza dello anione superossido. La sonda DHE è stata aggiunta al buio in tempi diversi fino a raggiungere la concentrazione finale di $10 \mu\text{M}$ per poi dopo 30 minuti aggiungere i $50 \mu\text{M}$ di OPL-ROS. Sempre al buio la sonda DCFH-DA è stata aggiunta alla concentrazione finale di $10 \mu\text{M}$, 30 minuti prima della fine dell'incubazione con i $50 \mu\text{M}$ di OPL-ROS. Le cellule prelevate, sono state lavate con PBS e messe in sospensione in $500 \mu\text{L}$ di PBS per poi essere sottoposte a misurazione dei contenuti di ROS-OPL mediante analisi fluorimetrica con spettrofotometro a fluorescenza. Per la sonda DHE è stata utilizzata la lunghezza d'onda di eccitazione di 392 nm, mentre quella di emissione di 538 nm. Sia per la sonda DHE che DCFH-DA le finestre di eccitazione e emissione sono impostate a 10 nm. L'uso di queste due sonde, ha evidenziato un incremento prolungato dell'intensità di fluorescenza solo nelle cellule trattate con la miscela OPL-ROS.

Determinazione dell'espressione PUMA mediante Western Blotting

Il test-PUMA⁴⁸ permette di distinguere se l'inibizione della crescita di una coltura cellulare di carcinoma epatocellulare indifferenziato, sia dovuta ad un effetto citostatico o alla morte cellulare della miscela galloflavina-OPL-ROS.

A tale scopo sono state utilizzate fiasche da 75 cm^2 seminate con 2×10^6 di cellule di epatocarcinoma indifferenziato coltivate con DMEM e/o 25 mM di glucosio. Tutti i terreni di crescita cellulare sono stati integrati con 10% di FBS, amminoacidi non essenziali, 100 U/mL di penicillina, 100 g/ml di streptomycin, glutammina 2mM. Le cellule sono state coltivate a 37°C in un incubatore a 5% di CO_2 umidificato.

Per il test PUMA sono state allestite:

- 2×10^6 cellule di colture cellulari di carcinoma epatocellulare indifferenziato seminate in fiasche da 75 cm^2 e trattate con 50 mM di ROS della miscela OPL (RosOPL)

- 2×10^6 cellule di colture cellulari di carcinoma epatocellulare indifferenziato seminate in fiasche da 75 cm^2 e trattate con $200 \text{ }\mu\text{M}$ di galloflavina.
- 2×10^6 cellule di colture cellulari di carcinoma epatocellulare indifferenziato sono seminate in fiasche da 75 cm^2 e trattate con $200 \text{ }\mu\text{M}$ di galloflavina e 50 mM di ROS della miscela OPL (Galloflavina-RosOPL)
- Il controllo viene effettuato con 2×10^6 cellule di colture cellulari di carcinoma epatocellulare indifferenziato seminate in fiasche da 75 cm^2 e $10 \text{ }\mu\text{M}$ di miscela OPL senza ROS e senza galloflavina.

Ogni giorno e per quattro giorni le cellule trattate e le cellule di controllo sono lisate con $100 \text{ }\mu\text{L}$ di tampone di potassio fosfato (100 mmol/L), a pH 7,5, contenente 1% di NP40 ed inibitori di proteasi. Ottenuto l'omogenato di cellule, viene centrifugato per 15 minuti dopo averlo lasciato riposare per 30 minuti nel ghiaccio. Con il metodo di Lowry si misurano $20 \text{ }\mu\text{g}$ di centrifugato proteico e caricati sul gel al 12% di poliacrilammide si sottopongono ad elettroforesi. Terminata la corsa le proteine, attraverso un campo elettrico di 300 mA per 2 ore, vengono trasferite su una membrana di PVDF a bassa fluorescenza. Una volta immobilizzato il tutto con BSA al 5% in TBS Tween, la membrana è incubata con un anticorpo policlonale di coniglio anti-PUMA, l'avvenuto legame proteina-anticorpo sarà evidenziato da un anticorpo secondario marcato con il fluoroforo Cy5 (A. Biosciences).

Determinazione dell'apoptosi

L'apoptosi delle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato è stato valutata attraverso lo studio citofluorimetrico dei nuclei a contenuto di DNA ipodiploide.

Le cellule di epatocarcinoma indifferenziato sono incubate in piastre multipozzetto da 96 alla concentrazione di 1×10^4 cellule per pozzetto e successivamente, sono incubate per 24 ore rispettivamente con $200 \text{ }\mu\text{M}$ di galloflavina, con la miscela OPL-ROS alla dose di $50 \text{ }\mu\text{M}$, con la miscela di $200 \text{ }\mu\text{M}$ di galloflavina associata a $50 \text{ }\mu\text{M}$ di OPL-ROS e per controllo solo cellule senza alcun trattamento. In seguito le cellule sono staccate mediante tripsinizzazione e sospese mediante centrifuga e lavaggio in PBS. Il pellet ottenuto viene risospeso in una soluzione per lisi ipoto-

nica contenente 50 µg/mL di ioduro di propidio. Dopo incubazione a 4°C per 30' le cellule sono sottoposte ad analisi citofluorimetrica per valutare la presenza di nuclei contenenti DNA ipodiploide.

Analisi statistica

La significatività dei dati è stata analizzata attraverso il test *t* di Student e one-way Anova seguita dai post- test di Bofferoni.

RISULTATI

Allo scopo di valutare l'azione inibitoria della galloflavina sull'attività enzimatica della lattico deidrogenasi, in questo studio sono state analizzate le variazioni di produzione di lattato, quando cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato⁴⁴ dotate di fenotipo aerobico sono incubate con questo inibitore. La lattico deidrogenasi (LDH), rappresenta un enzima chiave della glicolisi aerobica, in quanto garantisce il necessario NAD⁺ per il suo mantenimento, riossidando il NADH attraverso la riduzione del piruvato in acido lattico. In questo studio, le cellule di carcinoma epatocellulare, incubate per 24 ore con una concentrazione di 200

µM di galloflavina, hanno espresso una netta riduzione della produzione di acido lattico, evidenziandone, in linea con i dati reperibili in letteratura, la forte funzione inibitoria sulla lattico deidrogenasi, bloccando la glicolisi aerobica delle cellule neoplastiche.

Nello stesso studio è stata verificata anche l'azione inibitoria sulla lattico deidrogenasi, della miscela acquosa OPL-ROS satura di ROS alla molalità di 1000 mg/litro. Le colture cellulari di carcinoma epatocellulare indifferenziato, sono state incubate per 24 ore, con 50 µM di OPL-ROS verificando l'attività sintetica della lattico deidrogenasi attraverso la quantificazione di acido lattico sintetizzato in coltura. La sintesi di acido lattico espressa dalle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato, non è stata influenzata dalla presenza di OPL-ROS, al punto da poter affermare che la lattico deidrogenasi non è inibita dai ROS. (*Figura 1*)

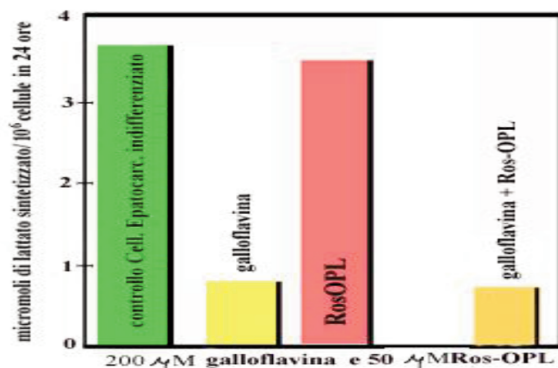


Figura 1 - In questo studio i risultati ottenuti dimostrano una netta azione inibitoria della galloflavina sulla lattico deidrogenasi, quando le cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato capaci di esprimere il fenotipo glicolitico aerobico è incubato per 24 ore con 200 μ M di galloflavina. Sempre le stesse colture cellulari quando sono incubate con 50 μ M di una soluzione acquosa satura di OPL-ROS, non sono inibite nella sintesi della lattico deidrogenasi. Sempre nello stesso studio è stato evidenziato che non esiste nessuna azione sinergica verso la lattico deidrogenasi, quando le cellule neoplastiche sono incubate con la stessa quantità di OPL- ROS e galloflavina.

Per verificare se la galloflavina oltre a svolgere un'azione di blocco sulla glicolisi aerobica è anche in grado di interferire sulla respirazione mitocondriale, sono stati misurati sia il consumo di ossigeno che la produzione di ATP nelle colture di cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato, quando incubate con 200 μ M di galloflavina. La misurazione del consumo di ossigeno è stata effettuata sulle quattro colture cellulari, compresa la coltura di controllo costituita da sole cellule di epatocarcinoma indifferenziato, durante un incubazione durata 24 ore. Attraverso una sonda è stato possibile misurare in continuo il consumo di ossigeno delle cellule, allo scopo di valutare le possibili interferenze che la sola galloflavina, la sola miscela di OPL-ROS oppure la miscela galloflavina-OPL-ROS hanno sulla respirazione mitocondriale⁴⁵ (Figura 2).

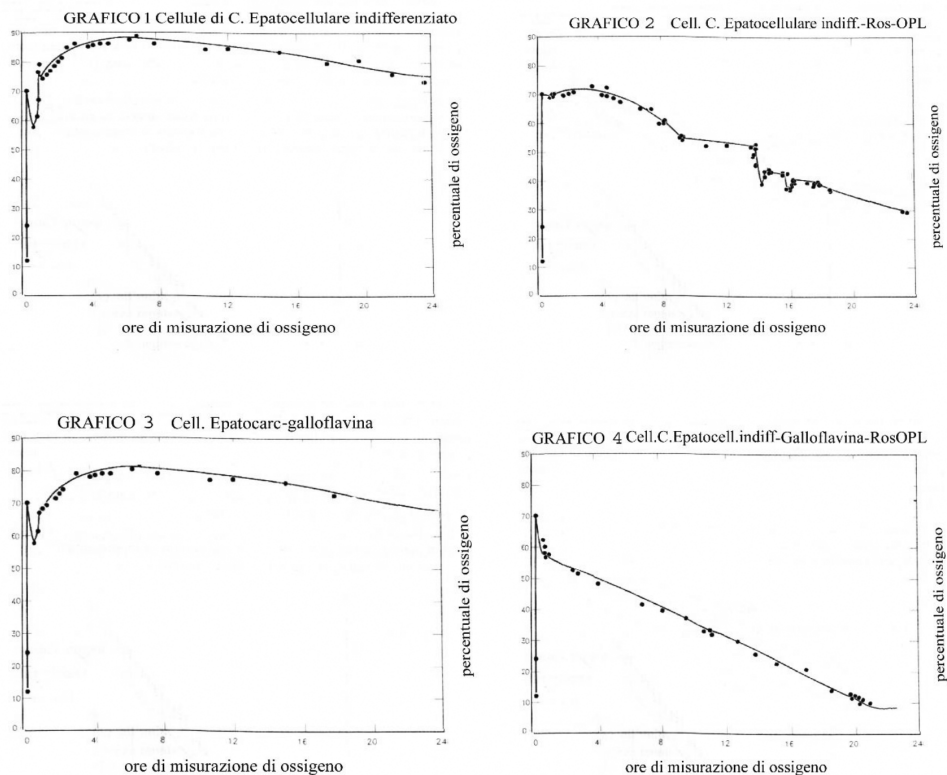


Figura 2 - Consumo di ossigeno nelle 24 ore. Grafico 1: Il controllo di cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato mostra un normale consumo di ossigeno. Grafico 2: incubando per 24 ore, colture di cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato, con 50 μM di ROS della miscela OPL-ROS, si osserva una regolare riduzione nel tempo del consumo di ossigeno. Grafico 3: incubando per 24 ore, colture di cellule di carcinoma epatocellulare, con la sola 200 μM di galloflavina non si osserva nessuno effetto sul consumo di ossigeno. Grafico 4: incubando per 24 ore, colture di cellule di carcinoma epatocellulare con 200 μM di galloflavina e 50 μM di ROS della miscela OPL-ROS, si osserva una graduale riduzione del consumo di ossigeno.

In questo caso, si è ritenuto utile ricorrere anche alla misurazione della produzione di ATP in coltura, in quanto la maggior parte della produzione di ATP cellulare, anche nelle cellule neoplastiche è dovuta alla attività ossidativa della respirazione mitocondriale. A tal proposito i dati stechiometrici indicano che per ogni molecola di glucosio ossidata nella sola glicolisi, si ha la produzione netta di sole due molecole di ATP, mentre, quando alla glicolisi si associa la respirazione mitocondriale, il guadagno netto per ogni molecola di glucosio sale a 36 molecole, delle quali 34 di ATP derivano dall'attività di respirazione mitocondriale. In questo studio, nelle colture di cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato, incubate con la sola galloflavina è stata misurata solo una lieve flessione di produzione di ATP, dato che indica che le cellule neoplastiche sono ancora capaci, di esprimere un metabolismo energetico ossidativo mitocondriale in grado di mantenerli in vita; perciò si dimostra che la galloflavina, pur se priva di effetti tossici sulle cellule normali, è tuttavia inefficace per la cura dei tumori a fenotipo aerobico (*figura 3*).

In questo studio è stata studiata l'inibizione della resa energetica della respirazione mitocondriale, attraverso la riduzione delle sintesi di ATP, quando le colture di cellule di carcinoma epatocellulare sono incubate per 24 ore con la sola miscela di OPL-ROS alla dose di 50 μ M. La flessione della produzione della sintesi di ATP, fa ritenere che i ROS contenuti nella miscela OPL-ROS sono in grado di interferire con le sintesi di ATP della respirazione mitocondriale, azione non espressa, come detto, dalla galloflavina (*Figura 4*).

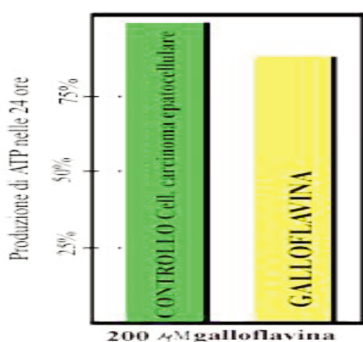


Figura 3 - Incubando per 24 ore colture di cellule di carcinoma epatocellulare con 200 μ M di galloflavina si osserva solo una lieve flessione della produzione di ATP.

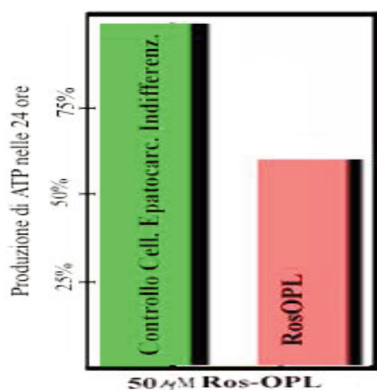


Figura 4 - Incubando per 24 ore colture di cellule di carcinoma epatocellulare con 50 μ M di ROS contenuti nella miscela OPL-ROS si osserva una efficace depressione delle sintesi di ATP.

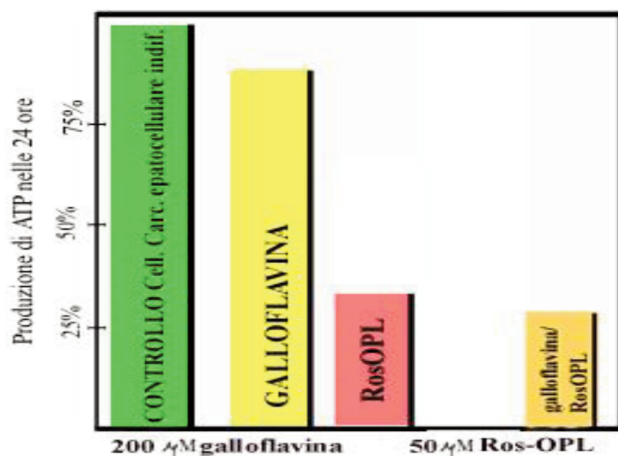


Figura 5 - Caduta delle sintesi di ATP, osservabile quando le cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato vengono incubate per 24 ore con 50 μ M di OPL-ROS e 200 μ M di Galloflavina, indicando un possibile blocco energetico cellulare, che può essere utilizzato per contrastare la proliferazione delle cellule neoplastiche.

Infine per verificare una possibile sinergia tra la galloflavina e i ROS è stata utilizzata una miscela costituita da 200 μ M galloflavina e 50 μ M di OPL-ROS allo scopo di inibire le sintesi energetiche delle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato, indirizzandole verso la morte cellulare (apoptosi e/o necrosi). I dati ottenuti, incubando le cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato con la miscela galloflavina- OPL-ROS e misurando la riduzione di sintesi di ATP nelle 24 ore, hanno confermato una possibile sinergia OPL-ROS-galloflavina nell'inibire le sintesi energetiche delle cellule neoplastiche che esprimono la glicolisi aerobica (Figura 5).

L'insperata azione inibitoria sinergica, della miscela OPL-ROS e galloflavina, nelle colture cellulari di carcinoma epatocellulare indifferenziato, sulle sintesi energetiche di ATP e sulla inibizione della crescita cellulare, ha permesso di proseguire gli studi col test-PUMA48, un'indagine di laboratorio che permette di distinguere se l'inibizione sulla crescita di una coltura cellulare, sia dovuta o ad un effetto citostatico oppure per morte cellulare. I risultati ottenuti hanno evidenziato un incremento dell'espressione PUMA di 3,6 volte per le cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato trattate con la soluzione galloflavina-OPL- ROS (*Figura 6*).

Effetto citotossico della galloflavina

Le alterazioni morfologiche indotte dalla incubazione per 24 ore con 200 μ M di galloflavina delle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato sono confrontate con una coltura di controllo costituita dalle stesse cellule ma non trattate con galloflavina. Le cellule di entrambe le colture, sono incubate con ioduro di propidio e analizzate mediante citofluorimetria.

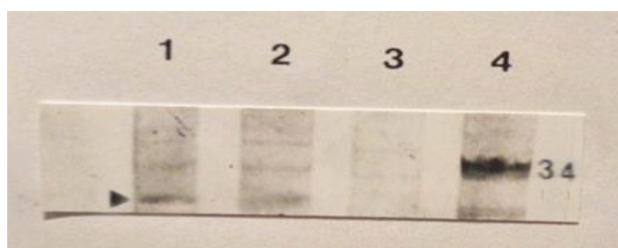


Figura 6 - I risultati ottenuti con le tecniche Western Blotting hanno evidenziato un incremento dell'espressione PUMA di 3,6 volte per le cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato trattate con la soluzione galloflavina-OPL-ROS (1), di 2,8 per le cellule trattate con la sola soluzione OPL-ROS (2) e di 1.8 per le cellule trattate con sola galloflavina (3). In questo caso l'indagine PUMA ha evidenziato che l'inibizione della crescita delle cellule trattate con la soluzione galloflavina a 200 μ M e 50 μ M di ROS contenuti nella miscela OPL-ROS è causata da morte cellulare e non da un effetto citostatico della soluzione.

L'analisi citofluorimetrica delle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato incubato per 24 ore con 200 μM di galloflavina, rispetto alle cellule della coltura di controllo ha mostrato un aumento del 43% del numero dei nuclei apoptotici.

Effetto citotossico della soluzione OPL-ROS

Le alterazioni morfologiche indotte sulle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato dalla incubazione per 24 ore con 50 μM di OPL-ROS sono confrontate con una coltura di controllo costituita dalle stesse cellule ma non trattate con OPL-ROS. Le cellule di entrambe le colture, sono incubate con ioduro di propidio e analizzate mediante citofluorimetria.

L'analisi citofluorimetrica delle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato incubato per 24 ore con 50 μM di OPL-ROS, rispetto alle cellule della coltura di controllo ha mostrato un aumento del 47% del numero dei nuclei apoptotici.

Effetto citotossico della soluzione Galloflavina-OPL-ROS

Le alterazioni morfologiche indotte sulle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato dalla incubazione per 24 ore con una miscela di 50 μM di OPL-ROS e 200 μM galloflavina, sono confrontate con una coltura di controllo costituita dalle stesse cellule ma non trattate con OPL-ROS. Le cellule di entrambe le colture, sono incubate con ioduro di propidio e analizzate mediante citofluorimetria.

L'analisi citofluorimetrica delle cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato incubato per 24 ore con una miscela di 50 μM di OPL-ROS e 200 μM galloflavina, rispetto alle cellule della coltura di controllo ha mostrato un aumento del 90% del numero dei nuclei apoptotici.

Discussione

I dati ottenuti in questo studio, confermano che le cellule di carcinoma epatocellulare indifferenziato sono dotate ancora di una respirazione mitocondriale efficiente, una delle principali cause per le qua-

li gli inibitori della lattico deidrogenasi, come la galloflavina, non sono sufficienti nella lotta contro i tumori. A conferma di questo dato, è stato riscontrato, che la galloflavina nelle cellule di carcinoma epatocellulare, pur provocando un blocco della glicolisi aerobica, dato confermato dalla documentata riduzione della produzione di lattato, non causa una significativa riduzione delle sintesi di ATP e tanto meno un evidente calo del consumo di ossigeno, indici di una attività respiratoria mitocondriale ancora in grado da supportare le cellule neoplastiche nelle loro vitali richieste energetiche. In questo studio, si è voluto superare questa importante limitazione degli inibitori della glicolisi aerobica, associando alla galloflavina una soluzione acquosa satura di ROS, indicata come Ossigeno Poliatomico Liquido (OPL), che interferendo con la respirazione mitocondriale delle cellule cancerose, è in grado di ridurre drasticamente i livelli intracellulari di ATP, indirizzando le cellule neoplastiche verso la morte per apoptosi.

Conclusioni

Questo studio dimostra che una efficace cura delle neoplasie, deve necessariamente procedere non solo attraverso il blocco della respirazione mitocondriale, dalla quale deriva la quasi totalità dell'energia cellulare, ma deve operare anche l'inibizione della glicolisi aerobica, che attraverso il ciclo dei pentosi, sostiene la sintesi del ribosio necessario per la produzione dei nucleotidi, indispensabili per sostenere una rapida proliferazione cellulare. A questo scopo l'associazione di un inibitore della glicolisi aerobica come la galloflavina con una miscela acquosa di OPL-ROS, potrebbe rappresentare un efficace trattamento antineoplastico, anche se è necessario approfondire ulteriormente le modalità di inibizione dei ROS sulla fosforilazione ossidativa, visto che possono danneggiare mitocondri isolati da cellule normali.

Bibliografia

- 1) Warburg O: *Über den Stoffwechsel der Tumoren*. Berlin, Springer, 1926. *The Metabolism of Tumours*. London, Constable, 1930.

- 2) Monique Cunha de Padua, Giulia Delodi, Milica Vučetić, Jérôme Durivault, Valérie Vial, Pascale Bayer, Guilhermina Rodrigues Noleto, Nathalie M. Mazure, Maša Ždraljević and Jacques Pouyssegur. Disrupting glucose-6-phosphate isomerase fully suppresses the “Warburg effect” and activates OXPHOS with minimal impact on tumor growth except in hypoxia. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No.50), pp: 87623-87637.
- 3) Theodor Boveri, Ueber die Abhängigkeit der Kerngröße und Zellenzahl der Seeigel-Larven von der Chromosomenzahl der Ausgangszellen”. “Zellen-Studien”.1905. Heft 5.
- 4) Veatch JR, McMurray MA, Nelson ZW, Gottschling DE. Mitochondrial dysfunction leads to nuclear genome instability via an iron-sulfur cluster defect. *Cell* 2009; 137(7): 1247-58.
- 5) Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 7:7.
- 6) Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancer have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004;4(11): 891-9.
- 7) Pellicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 2006; 25(34): 4633-46.
- 8) Robey RB, Hay N. Is Akt the “Warburg kinase”? – Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009; 19(1): 25-31.
- 9) Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11: 1306–1313, 2005. doi:10.1038/nm1320.
- 10) Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88: 593–602, 1997. doi:10.1016/S0092-8674 (00)81902-9.
- 11) Barco G. Un caso di Linfoma Non-Hodgkin non responsivo alle comuni terapie e trattato con terapia Ossigeno Poliatomico Liquido (OPL), somministrato in continuo per via venosa centrale e temozolomide. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia* 6: 157-162, 2007.
- 12) Dong Gil You, V. G. Deepagan, Wooram Um, Sangmin Jeon, Sejin Son, Hyeyoun Chang, Hwa In Yoon, Yong Woo Cho, Maggie Swierczewska, Seulki Lee, Martin G. Pomper, Ick Chan Kwon, Kwangmeyung Kim & Jae Hyung Park. ROS-generating TiO₂ nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer. WWWnature.com/scientificreport.

- 13) Assi M, Rébillard A. The Janus-faced role of antioxidants in cancer cachexia: new insights on the established concepts. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 9579868, 2016. doi:10.1155/2016/9579868.
- 14) Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J* 473: 805–825, 2016. doi:10.1042/BJ20151227.
- 15) Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* 12: 931–947, 2013. doi:10.1038/nrd4002.
- 16) Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320: 661–664, 2008. doi:10.1126/science.1156906.
- 17) Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(5): 2037-42.
- 18) Tudek B, Winczura A, Janik J, Siomek A, Foksinski M, Oliński R. Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *Am J Transl Res* 2: 254–284, 2010.
- 19) Somanah J, Ramsaha S, Verma S, Kumar A, Sharma P, Singh RK, Aruoma OI, Bourdon E, Bahorun T. Fermented papaya preparation modulates the progression of N-methyl-N-nitrosourea induced hepatocellular carcinoma in Balb/c mice. *Life Sci* 151: 330-338, 2016. doi:10.1016/j.lfs.2016.03.026.
- 20) Elena Piskounova, Michalis Agathocleous, Malea M. Murphy, Zeping Hu, Sara E. Huddlestun, Zhiyu Zhao, A. Marilyn Leitch, Timothy M. Johnson, Ralph J. DeBerardinis & Sean J. Morrison. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. Doi:10.1038/nature15726.
- 21) Barco G, Mameli M, Adamo C. A case of prostate adenocarcinoma with extracapsular extension treated with radical prostatectomy followed by therapy with Liquid Polyatomic Oxygen (LPO) and Procarbazine. *International Journal of Ozone Therapy* 7: 155-160, 2008.
- 22) Circu ML, Maloney RE, Aw TY. Disruption of pyridine nucleotide redox status during oxidative challenge at normal and low-glucose states: implications for cellular adenosine triphosphate, mitochondrial respiratory activity, and reducing capacity in colon epithelial cells. *Antioxid Redox Signal* 14: 2151-2162, 2011. doi:10.1089/ars.2010.3489.

- 23) Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 5: 14, 2006. doi:10.1186/1477-3163-5-14.
- 24) Mohamad Assi. The differential role of reactive oxygen species in early and late stage of cancer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 313: R646-R653, 2017. First published August 23, 2017; doi:10.1152/ajpregu.00247.2017.
- 25) Laurent A, Nicco C, Chéreau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Lévy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B, Batteux F. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer Res* 65: 948–956, 2005.
- 26) Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401: 1–11, 2007. doi:10.1042/BJ20061131.
- 27) Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136: 823–837, 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.02.024.
- 28) Ren Y, Zhou X, Liu X, Jia HH, Zhao XH, Wang QX, Han L, Song X, Zhu ZY, Sun T, Jiao HX, Tian WP, Yang YQ, Zhao XL, Zhang L, Mei M, Kang CS. Reprogramming carcinoma associated fibroblasts by AC1MMYR2 impedes tumor metastasis and improves chemotherapy efficacy. *Cancer Lett* 374: 96–106, 2016. doi:10.1016/j.canlet.2016.02.003.
- 29) Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(5): 2037–42.
- 30) Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 891–9.
- 31) Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science* 1987; 235(4795): 1492–5.
- 32) Papacostantinou J, Colowick SP. The role of glycolysis in the growth of tumor cells. II. The effect of oxamic acid on the growth of HeLa cells in tissue culture. *J Biol Chem* 1961; 236: 285–88.
- 33) Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 1129–34.

- 34) Krebs HA. The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays Biochem* 1972; 8:1-34.
- 35) Everse J, Kaplan NO. Lactate dehydrogenases: structure and function. *Adv Enzymol* 1973; 37: 61-133.
- 36) Barker SB, Summerson WH. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J Biol Chem* 1941; 138: 535-54.
- 37) Kaplan NO, Ciotti MM, Hamolsky M, Bieber RE. Molecular heterogeneity and evolution of enzymes. *Science* 1960; 131: 392-7.
- 38) Michael J. Bishop, Johannes Everse e Nathan O. Kaplan. Identification of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes by Rapid Kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972 luglio; 69 (7): 1761-1765.
- 39) Okumura N, Terasawa F, Ueno I, Oki K, Yamauchi K, Hidaka H, Tozuka M, Okura M, Katsuyama T. Genetic analyses in homozygous and heterozygous variants of lactate dehydrogenase-B (H) subunit-LD-B Matsumoto I and II (LD-B W323R). *Clin Chim Acta* 1999; 287(1-2): 163-71.
- 40) Kanno T, Sudo K, Maekawa M, Nishimura Y, Ukita M, Fukutake K. Lactate dehydrogenase M-subunit deficiency: a new type of hereditary exertional myopathy. *Clin. Chim. Acta* 1988; 173(1): 89-98.
- 41) Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 2006; 9(6): 425-34.
- 42) Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem* 2010; 17(7): 672-97.
- 43) Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(3): 985-93.
- 44) Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* 12: 931–947, 2013. doi:10.1038/nrd4002.
- 45) Manerba M, Sartini A, Vettraino M, Giacomini E, Fiume L, Buonfiglio R, Di Stefano G, Roberti M, e Recanatini M: Galloflavina (CAS 568-80-9): un nuovo Inibitore del lattato Deidrogenasi. *ChemMedChem* · Novembre 2011 DOI: 10.1002/cmdc.201100471 ·Fonte: PubMed.

- 46) Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907–17.
- 47) Toth A, Jeffers JR, Nickson P, Min JY, Morgan JP, Zambetti GP, Erhardt P. Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291(1): H52-60.