

# L'ACQUA ALCALINA MODULA L'ESPRESSIONE DEI GENI DELL'INFIAMMAZIONE: MODELLO IN VITRO PER LA PREVENZIONE DEL CANCRO



Andrea Del Buono<sup>1</sup>, Armando D'Orta<sup>1</sup>, Angela De Monaco<sup>1</sup>, Valentina Corato<sup>1</sup>, Giancarlo De Blasio<sup>2</sup>, Salvo Di Martino<sup>3</sup>

1. Fondazione DDclinic, Caserta, Italia

2. Laboratorio genetico, Centro di ricerca CETAC, Caserta, Italia

3. Associazione Italiana di Farmacogenomica e Diagnostica Molecolare, Caserta

Corrispondenza: Salvo Di Martino

D'Orta e Del Buono hanno ugualmente contribuito alla stesura.

## Abstract

Nel campo della nutrizione e della medicina, diverse ricerche focalizzano l'attenzione sul comportamento delle cellule a specifiche sostanze con potere alcalinizzante. Ogni sostanza che introduciamo con il cibo, così come l'acqua, ha un'attività specifica sulla regolazione dell'equilibrio acido-base dell'intero organismo.

Nel campo della nutrizione e della medicina, diverse ricerche focalizzano l'attenzione sul comportamento delle cellule in un ambiente con molecole riducenti. La composizione dei micronutrienti (sali minerali e molecole chimiche vegetali) che introduciamo con il cibo è uno dei fattori che contribuiscono al condizionamento dell'equilibrio elettrofilo (acido-base) dell'ambiente extracellulare (MEC) dell'intero organismo. Questa regolazione sistemica della matrice extracellulare partecipa alla modulazione dell'espressione dei geni (trascrittoma) e di conseguenza partecipa alla modulazione della risposta infiammatoria attraverso la regolazione di molecole di segnale cellulare come ROS e RNS. Alcuni componenti del sistema del complemento in condizioni acide della matrice mostrano, in alcuni pazienti, un aumento della produzione che potrebbe essere secondario alla diminuzione del pH extracellulare.

Questa regolazione sistemica modifica parzialmente le caratteristiche del microambiente cellulare e di conseguenza la risposta cellulare. L'attenzione si concentra sulla regolazione della risposta immunitaria di queste sostanze che possono essere causa o conseguenza di numerose altre malattie croniche come i tumori. L'acqua alcalina è l'acqua che è stata ionizzata, il che significa che il livello di pH dell'acqua è stato aumentato.

L'acqua alcalina è un argomento molto conosciuto nel settore della medicina complementare, che vanta diversi effetti tra cui la regolazione della crescita delle cellule neoplastiche.

AlkaCoffee® è un correttore di acidità, un prodotto alcalino utile per riequilibrare il pH di prodotti acidi come il caffè espresso. Abbiamo affrontato questa soluzione alcalinizzante, consapevoli che l'infiammazione a cui siamo stati abituati: tumore, calore, dolore, functio lesa, una delle quali manca in apparenza è l'acidosi tissutale, aspetto che condizionerà l'espressione dei geni, un aspetto che abbiamo deciso di studiare.

In questo studio, abbiamo studiato l'influenza delle soluzioni alcaline (AlkaWater® e AlkaCoffee®) su un aspetto dell'infiammazione in relazione all'espressione dei fattori di immunomodulazione fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ), interleuchina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuchina 6 (IL-6), cicloossigenasi-2 (COX-2) su colture cellulari Caco-2 (simili a enterociti e miR146).

## Introduzione

L'acqua alcalina è l'acqua leggermente basica. Contiene minerali basici come calcio, magnesio o bicarbonato. Questi composti si legano agli ioni idrogeno in soluzione, rendendo l'acqua più basica. Le fonti naturali di acqua alcalina sono generalmente sorgenti o un serbatoio di acqua naturale sotto la superficie terrestre. Le strutture rocciose che trattengono l'acqua possono contenere minerali di base, come calcio o calcare, che penetrano nell'acqua, aumentando il pH [1]. L'acqua può essere ionizzata anche utilizzando un integratore liquido alcalino concentrato ricco di minerali ed elementi come boro, molibdeno, selenio e magnesio e calcio, entrambi importanti per il mantenimento della salute delle ossa. Le acque alcaline sono state segnalate come tipi di acque funzionali che possono migliorare varie condizioni di malattia; i cluster d'acqua nell'acqua alcalina sono più piccoli e più facilmente assorbiti dalle cellule, che aiutano il corpo a reidratarsi rapidamente e aumentare l'immunità attraverso la neutralizzazione dell'acidità del corpo causata da una dieta sbagliata, stress e tossine ambientali. È noto che l'acqua alcalina esercita diversi effetti anti-cancro, oltre a eliminare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e ridurre i livelli di glucosio nel sangue [2]. AlkaCoffee® è un correttore di acidità, un prodotto alcalino utile per bilanciare le bevande. È composto da acqua distillata, acido ascorbico, acido citrico, cloruro di sodio, idrossido di potassio. È un prodotto antiossidante, studiato per correggere diete spesso composte da alimenti (in questo caso bevande) con un'alta percentuale di acidi come the, infusi, latte animale, latte vegetale, caffè. L'arricchimento di ioni negativi (elettroni) e idrogeno produce un forte effetto antiossidante.

La linea cellulare epiteliale umana Caco-2 è stata ampiamente utilizzata come modello della barriera epiteliale intestinale. La linea cellulare Caco-2 è originariamente derivata da un carcinoma del colon. Tuttavia, una delle sue proprietà più vantaggiose è la sua capacità di differenziarsi spontaneamente in un monostrato di cellule con molte proprietà tipiche degli enterociti assorbenti con strato di bordo a spazzola come si trovano nell'intestino tenue. In questo studio abbiamo valutato la proprietà della produzione di citochine (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) delle cellule Caco-2 e poiché le citochine proinfiammatorie sono responsabili di un livello superiore dell'enzima Cox-2 e come MiR-146a regola negativamente vie di trasduzione del segnale che portano all'attivazione di NF-KB, l'interruttore che attiva l'infiammazione [3]. I microRNA (miRNA) sono una famiglia in crescita di piccoli RNA non codificanti (19-25 nucleotidi) che regolano l'espressione genica legandosi alle 30 regioni non tradotte (3' UTR) di RNA messaggeri mirati (mRNA) per inibire la traduzione delle proteine o la degradazione degli mRNA. La disregolazione dei miRNA e il loro ruolo patogeno in varie malattie sono stati dimostrati da numerosi studi. Alterando

l'espressione genica, i miRNA regolano le attività cellulari come la proliferazione, l'apoptosi, la differenziazione e la migrazione in diversi tipi di malattie [4]. miRNA-146a è codificato sul cromosoma umano 5q33.315 ed è noto per svolgere un ruolo critico nelle risposte immunitarie. La conoscenza sulla funzione del miR-146a nel contesto umano è limitata, ma alcuni studi confermano il suo ruolo regolatorio nella risposta infiammatoria. Nelle risposte immunitarie innate all'attivazione di un recettore della superficie cellulare come TLR4, una cascata molecolare che include TRAF6 e IRAK1 porta alla fosforilazione e degradazione di I $\kappa$ B $\alpha$  e all'attivazione di NF- $\kappa$ B e alla traslocazione nucleare [5]. Diverse citochine e chemochine proinfiammatorie, come TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8, prodotte all'attivazione di NF- $\kappa$ B, sono associate allo sviluppo e alla progressione del tumore [6]. L'attivazione di NF- $\kappa$ B induce la trascrizione di molti geni, incluso primiR146a. Una volta traslocato nel citoplasma e caricato nel complesso RISC, il miR-146a maturo contribuisce ad attenuare la segnalazione del recettore attraverso la downmodulazione di IRAK1 e TRAF6 [3].

L'obiettivo di questo studio è determinare l'espressione di alcune molecole immunitarie in uno specifico tipo di cellula, Caco2, tipo enterocita umano, a seguito di trattamento con soluzioni alcalinizzanti. La distribuzione, la fisiologia e la polarizzazione di queste cellule sono simili alle cellule della mucosa dell'intestino tenue e si ritiene che la somministrazione di soluzioni in superficie sia paragonabile all'introduzione di sostanze nel lume intestinale. Le rese ottenute trattate con entrambe le soluzioni (AlkaCoffee<sup>®</sup> e AlkaWater<sup>®</sup>), secondo le concentrazioni indicate dai prodotti, mostrano un comportamento simile all'assunzione di cibo in un organismo. Il passo successivo è stato la valutazione dell'espressione di TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e COX-2, molecole regolatrici del processo infiammatorio; infine, miRNA-146a come possibile regolatore del TNF- $\alpha$ .

## Materiali e metodi

Integrazione con acqua alcalina (AWS1) L'integrazione con acqua alcalina (AWS2) è stata ottenuta aggiungendo 5 gocce di AlkaWater<sup>®</sup> in 250 ml di acqua di rubinetto, fino a pH 9,0. AlkaWater<sup>®</sup> è costituito da acido borico, acqua distillata, cloruro di potassio, cloruro di sodio, idrossido di potassio, molibdato di sodio diidrato, selenito di sodio.

AWS è stato ottenuto aggiungendo gocce di AlkaCoffee<sup>®</sup> nel caffè XXXX. AlkaCoffee<sup>®</sup> è costituito da acqua distillata, acido ascorbico, acido citrico, cloruro di sodio e idrossido di potassio.

Progettazione dello studio sperimentale. L'obiettivo del nostro studio era la valutazione degli effetti di AWS sulle citochine infiammatorie. Abbiamo trattato cellule Caco-2 simili a enterociti umani utilizzando la seguente procedura.

### Tab.1

Colture cellulari di Caco-2:

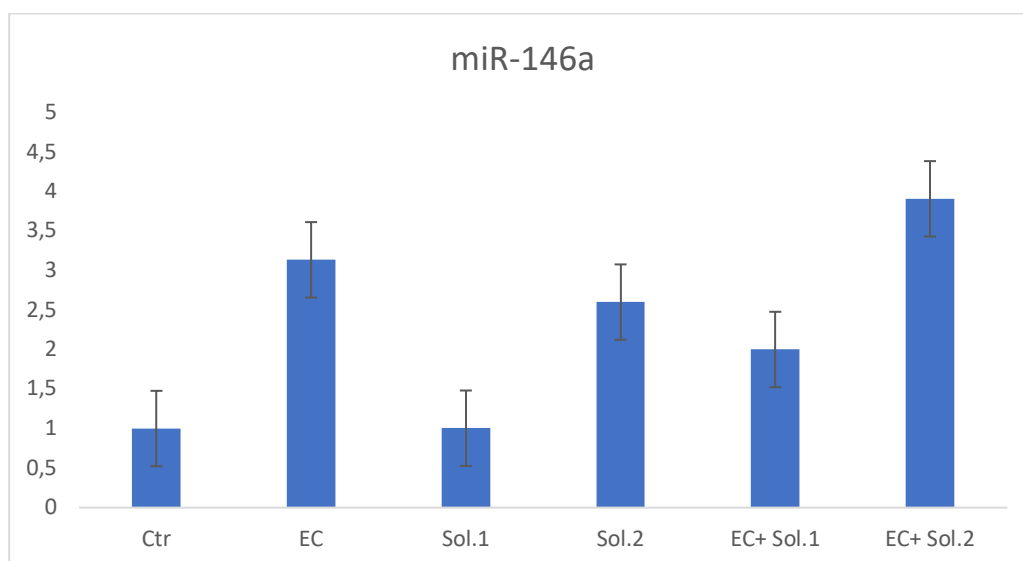
È stato studiato il trascrittoma di cellule Caco-2 in ambiente a pH controllato con una miscela di Sali alcalinizzanti: AlkaWater<sup>®</sup> e AlkaCoffee<sup>®</sup>.

Ctr	Caco-2: piastra di controllo.
EC	Caco-2 con pH 7,4-8,4 più AlkaCoffee <sup>®</sup> .

Sol1	Caco-2 con pH 7,4-8,4 più AlkaWater® (10µl in 1ml H <sub>2</sub> O milli-Q®)
Sol2	Caco-2 con AlkaCoffee® (100µl in 1ml H <sub>2</sub> O milli-Q®)
EC+Sol1	Caco-2 con AlkaWater® (10µl in 1ml H <sub>2</sub> O milli-Q®)
EC+Sol2	Caco-2 con AlkaCoffee® (100µl in 1ml H <sub>2</sub> O milli-Q®)

## Risultati

Abbiamo valutato gli effetti della Soluzione 1 (AlkaWater®, acqua alcalina) e della Soluzione 2 (AlkaCoffee®, correttore di acidità) da sole o in associazione con l'estratto di caffè sui livelli di mRNA di COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 misurati da qRT-PCR. Quando somministrate da sole, tutte le sostanze riducono i livelli di espressione dei quattro marcatori immunomodulatori nelle cellule CaCo-2 (Fig.) E sono stati osservati effetti ancora più pronunciati quando soluzioni alcaline ed estratto di caffè sono stati somministrati in combinazione. Quindi abbiamo valutato l'influenza delle soluzioni alcaline sull'espressione di miR-146a misurata sempre mediante qRT-PCR. Per lo più la Soluzione 2 aumenta l'espressione del gene miR-146a, mentre la combinazione di altre soluzioni ne diminuisce il livello. I risultati ottenuti in questi esperimenti mostrano che l'espressione di molecole pro-infiammatorie è ridotta nei campioni trattati con soluzioni alcalinizzanti. Questi risultati dimostrano un migliore controllo dell'omeostasi cellulare e dell'infiammazione, dopo il trattamento con soluzioni alcalinizzanti. Mediante l'analisi qRT-PCR è stata riscontrata una significativa diminuzione dei livelli di espressione delle citochine proinfiammatorie, dimostrando un effetto antinfiammatorio delle soluzioni alcalinizzanti (AlkaWater® e AlkaCoffee®).



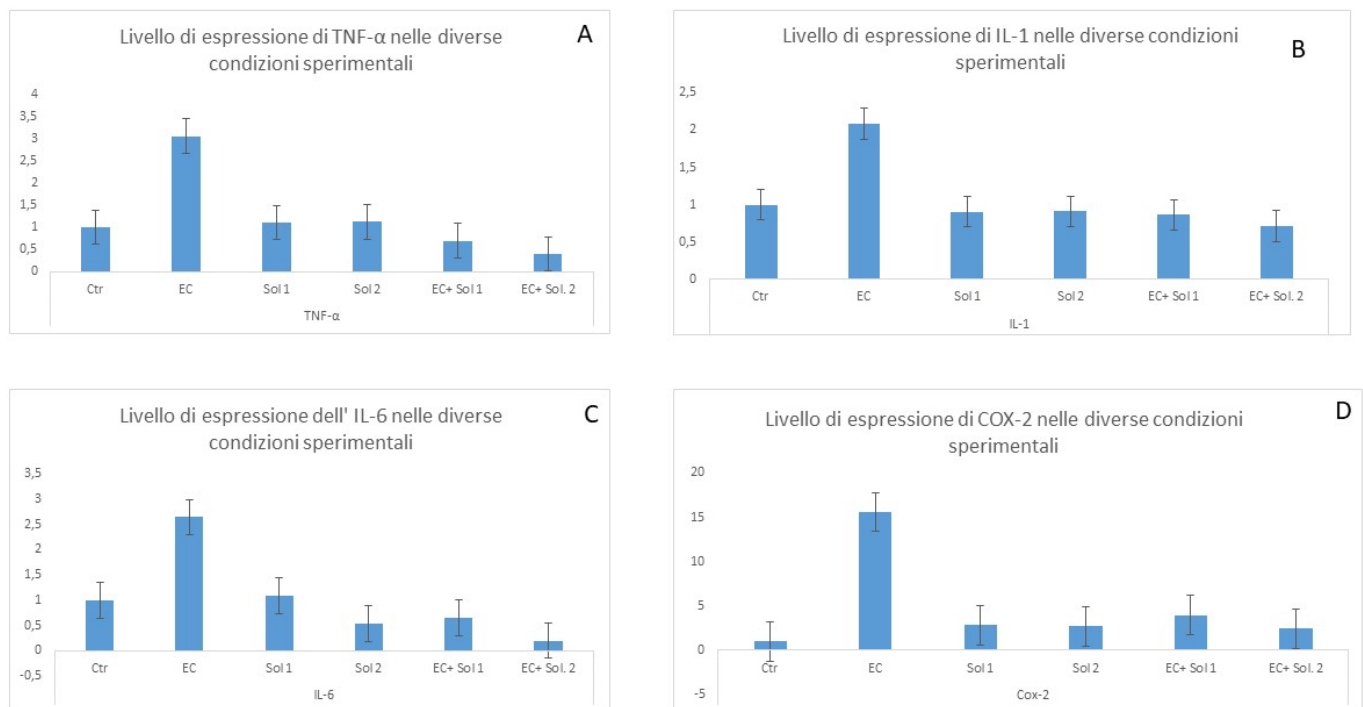


Figura 1. Effetto antinfiammatorio di AlkaWater® e AlkaCoffee® dopo trattamento con estratto di caffè sui livelli di espressione genica di TNF-a (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e COX-2 (D).

## Bibliografia

1. What is Alkaline Water? Definition, Benefits & Side Effects. Study.com 2016; [study.com/academy/lesson/what-is-alkaline-water-definition-benefits-side-effects.html](http://study.com/academy/lesson/what-is-alkaline-water-definition-benefits-side-effects.html)
2. Jin D, Ryu SH, Kim HW, Yang EJ, Lim SJ, Ryang YS, Chung CH, Park SK, Lee KJ. Anti-diabetic effect of alkaline-reduced water on OLETF rats. *Biosci Biotech Bioch* 2006; 70: 31-37.
3. Rusca N, Monticelli S. MiR-146a in immunity and disease. *Mol Biol Int* 2011; 2011: 1-7.
4. Chen BB, Li ZH, Gao S. Circulating miR-146a/b correlates with inflammatory cytokines in COPD and could predict the risk of acute exacerbation COPD. *Medicine* 2018; 97: e9820.
5. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 12481-12486.
6. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF- $\kappa$ B signaling. *J Mol Cell Biol* 2011; 3: 159-166.
7. Luo Y, Zheng SG. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Front Immunol* 2016; 7: 604.
8. Lea T. Caco-2 cell line. In the impact of food bioactives on health. Springer, Cham 2015; pp. 103-111.
9. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118: 503-508.
10. Gandhi J, Khera L, Gaur N, Paul C, Kaul R. Role of modulator of inflammation cyclooxygenase-2 in gamma herpesvirus mediated tumorigenesis. *Front Microbiol* 2017; 8: 538.