

EFFETTI CHEMIO-PREVENTIVI *IN VITRO* DI DIVERSI TIPI DI BIRRA  
(ANALCOLICA; LAGER; IPA; STOUT)Patrizia Rosignoli<sup>1</sup>, Giuseppe Italo Francesco Perretti<sup>2</sup>, Raffaella Fucelli<sup>1</sup>, Carla Emiliani<sup>1</sup>, Roberto Fabiani<sup>1</sup><sup>1</sup> Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università degli studi di Perugia<sup>2</sup> Centro di eccellenza per la ricerca sulla birra (CERB), Università degli studi di Perugia**Introduzione:**

Studi epidemiologici indicano che circa il 30% dei tumori potrebbe essere prevenuto modificando la dieta (1). La birra è la bevanda alcolica più consumata al mondo ed il suo ruolo come determinante di salute è stato investigato. Diversi studi di meta-analisi hanno evidenziato che un basso/moderato consumo di birra (12-24g etanolo/giorno) riduce il rischio di sviluppare sia le malattie cardiovascolari (2) che il cancro in diverse sedi come ad esempio stomaco (3), colon retto (4), rene (5) e linfomi (6). Molto spesso lo studio dei meccanismi molecolari alla base degli effetti chemio-preventivi di alcuni alimenti rappresenta un problema in quanto, per la maggior parte di essi, esiste una difficoltà pratica nel testarli direttamente *in vitro* sui sistemi cellulari. Conseguentemente, gli studi sono stati effettuati su singole molecole isolate dall'alimento o su estratti più o meno complessi. Sono state, così, rilevate importanti attività chemio-preventive (antiossidanti, anti-proliferative, anti-infiammatorie, anti-angiogeniche, pro-apoptotiche), evidenti però a dosi spesso elevate e difficilmente raggiungibili per via alimentare. La birra, grazie al suo stato liquido e alla sua idrofilia, è di fatto un alimento che supera le predette difficoltà. Si tratta di una bevanda la cui composizione chimica varia in base alle materie prime utilizzate ed al processo di produzione, si distinguono birre chiare, ambrate, scure a seconda del tipo di malto di partenza e di ulteriori ingredienti come il luppolo, il caramello e varie tipologie di spezie e frutta, recentemente impiegati dall'industria birraia come aromatizzanti, che rendono la birra fonte di molecole dalle interessanti attività biologiche. Da qui l'idea di investigare *in vitro* gli effetti di differenti tipologie di birra (analcolica, IPA-India Pale Ale, Lager, Stout) sulle diverse fasi del processo di cancerogenesi, con l'obiettivo di dare una spiegazione alle osservazioni epidemiologiche sopra elencate e di mettere in luce eventuali differenze tra le diverse formulazioni.

**Metodi:**

Gli effetti chemio-preventivi delle 4 birre sono stati valutati sia sulla iniziazione che sulla promozione/progressione tumorale.

- La prevenzione del danno al DNA indotto dal perossido di idrogeno ( $H_2O_2$  50 $\mu$ M) è stata valutata sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di donatori sani tramite il test delle comete (SCGE single-cell gel electrophoresis).

- Nelle cellule HL60 (linea cellulare derivata da una leucemia promielocitica umana) sono stati valutati gli effetti delle birre sia sulla proliferazione cellulare tramite tecnica colorimetrica di esclusione al tripan blu e conta al microscopio ottico, sia sull'apoptosi e ciclo cellulare tramite microscopia a fluorescenza e analisi citofluorimetrica (subG1 e fasi del ciclo cellulare) dopo colorazione del DNA con gli opportuni fluorocromi (Ioduro di Propidio ed Hoechst 33342).

**Risultati:**

- Il danno ossidativo al DNA dei PBMC risulta fortemente ridotto da tutte le birre (1% v/v) con valori percentuali molto simili tra loro (Figura 1). L'effetto non è mediato dall'etanolo.

- La proliferazione delle HL60 risulta fortemente inibita dalle birre IPA e Stout (10% v/v), lieve è l'effetto della Lager, mentre la birra analcolica e l'etanolo non mostrano un effetto significativo (Figura 2).

- Soltanto le birre IPA e Stout inducono il 50% di apoptosi nelle HL60 mentre le birre analcolica e Lager non hanno alcun effetto (Figura 3).

- L'analisi del ciclo cellulare mostra un accumulo delle cellule nella fase G0/G1 solo dopo trattamento con le birre IPA e Stout (Figura 4).

**Discussione:**

Questo studio suggerisce che la lieve riduzione del rischio di sviluppare il cancro osservata nei consumatori moderati di birra potrebbe essere attribuita agli effetti che tale bevanda esercita sulle varie fasi del processo di cancerogenesi. Come dimostrato, l'etanolo non è responsabile degli effetti evidenziati, mentre sembra importate il ruolo svolto da molecole bioattive derivanti dagli ingredienti di partenza oltre che dai vari processi di produzione. Se, da un lato, la prevenzione del danno al DNA osservata con tutte le birre suggerisce la presenza di molecole ad azione antiossidante comuni alle varie formulazioni, come ad esempio lo xantumolo, dalle ben note proprietà chemio-preventive (7), dall'altro, gli effetti sulle cellule tumorali indotti prevalentemente dalle birre IPA e Stout, suggeriscono l'intervento di molecole presenti soprattutto in queste formulazioni, come le melanoidine prodotte dalla tostatura del malto d'orzo e particolarmente abbondanti nelle birre ambrate e scure.

**Conclusioni:**

Fermo restando che un eccessivo consumo di alcol è nocivo per la salute umana, questo studio suggerisce che la birra contiene molecole bioattive con un ruolo preventivo sulla cancerogenesi. L'analisi della composizione chimica e la correlazione con gli effetti osservati permetterà di identificare queste molecole.

**Bibliografia:**

1) Willett W. C. 1995, Environ. Health Perspect. 103, 165-170. 2) de Gaetano G. et al. 2016, Nutr Metab Cardiovasc Dis. 26(6):443-67. 3) Wang PL. et al. 2017, Oncotarget. 8(58):99013-99023. 4) Zhang C. et al. 2015, Cancer Causes Control. 26(4):549-60. 5) Xu X. et al. 2015, Oncotarget. 6(15):13347-58. 6) Psaltopoulou T. et al. 2018, Int J Cancer. 1;143(3):486-495. 7) Jiang CH. et al. 2018, Front Pharmacol. 22;9:530.

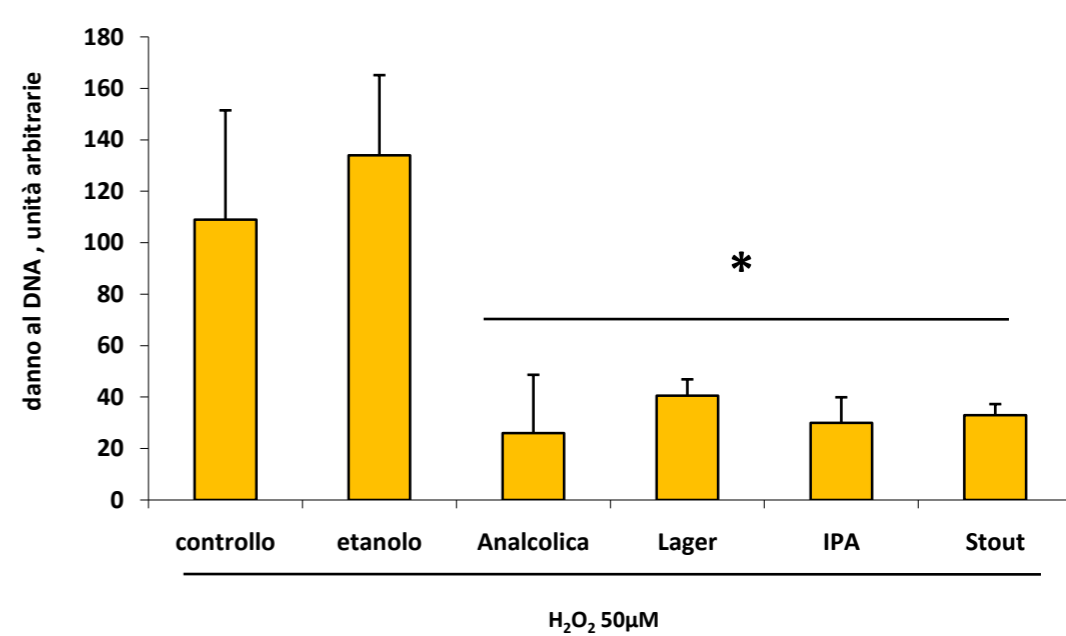


Figura 1: Danno al DNA di PBMC esposti a  $H_2O_2$  50 $\mu$ M in presenza delle 4 differenti tipologie di birra (1% v/v). I risultati riportati sono la media +/- ds di 3 esperimenti. \* $p < 0.05$  vs controllo.

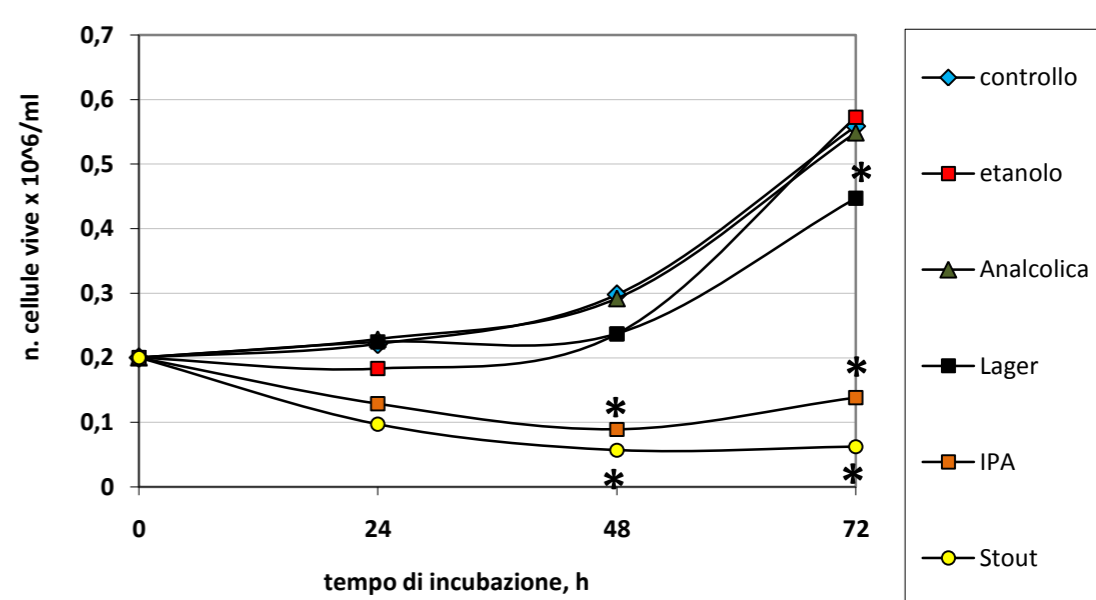


Figura 2: Curve di proliferazione della linea leucemica HL60 esposta alle 4 differenti tipologie di birra (10% v/v). I valori riportati sono la media +/- ds di 4 esperimenti. \* $p < 0.05$  vs tempo 0.

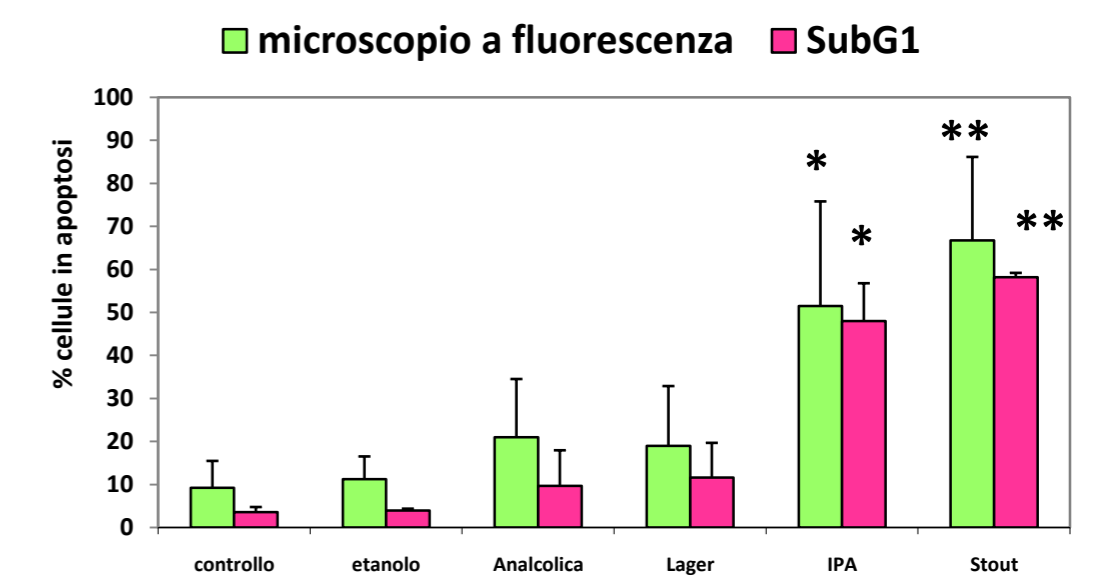


Figura 3: Percentuale di apoptosi in HL60 esposte per 48h alle 4 differenti tipologie di birra (10% v/v). I valori riportati sono la media +/- ds di 3 esperimenti. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  vs controllo.

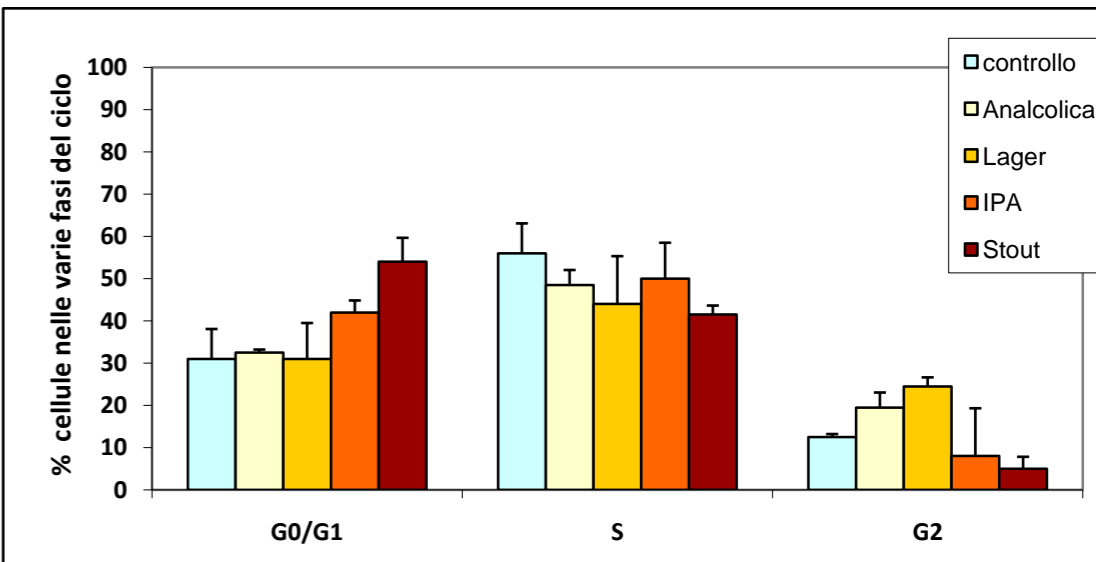


Figura 4: Distribuzione percentuale nelle diverse fasi del ciclo cellulare delle cellule HL60 esposte per 48h alle 4 differenti tipologie di birra (10% v/v). I risultati riportati sono la media +/- ds di 2 esperimenti.