

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



Bruna de Felice¹ Andrea Del Buono² Armando D'Orta², Angela De Monaco², Valentina Corato² e Giancarlo De Blasio³, Salvo Di Martino⁴

1. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche (DISTABIF), Università della Campania "L. Vanvitelli", Caserta.
 2. Fondazione DDclinic, Caserta, Italia
 3. Laboratorio genetico, Centro di ricerca CETAC, Caserta, Italia
 4. Associazione Italiana di Farmacogenomica e Diagnostica Molecolare, Caserta
- Corrispondenza: Salvo Di Martino

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

Riassunto

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 acidemiche 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 condiziona 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- α), interleuchina 1 β (IL-1 β), 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 di base 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 [3]. In questo studio abbiamo valutato la proprietà della produzione di citochine (IL-1, IL-6, TNF- α) 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 [4]. 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 [5]. 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 [6]. 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 κ B α e all'attivazione di NF-KB e alla traslocazione nucleare [7]. Diverse citochine e chemochine proinfiammatorie, come TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8, prodotte all'attivazione di NF- κ B, sono associate allo sviluppo e alla progressione del tumore [8]. L'attivazione di NF-KB induce la trascrizione di molti geni, incluso pri-miR146a. 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 [4].

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 e Alkawater), 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- α , IL-1, IL-6 e COX-2, molecole regolatrici del processo infiammatorio; infine, miRNA-146a come possibile regolatore del TNF- α .

Materiali e metodi

Integrazione con acqua alcalina (AWS1) L'integrazione con acqua alcalina (AWS2) è stata ottenuta aggiungendo 5 gocce di AlkaWater® in 250 ml di acqua di rubinetto, fino a pH 9,0. AlkaWater® 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® nel caffè XXXX. AlkaCoffee® 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:

E' stato studiato il trascrittoma di cellule Caco-2 in ambiente a Ph controllato con una miscela di Sali alcalinizzanti: AlkaWater® e AlkaCoffee®;

Ctr	Caco-2: piastra di controllo.
EC	Caco-2 con Ph 7,4-8,4 più Alkacoffee.
Sol1	Caco-2 con Ph 7,4-8,4 più AlkaWater® (10 μ l in 1ml H ₂ O milli-Q®)
Sol2	Caco-2 con AlkaCoffee® (100 μ l in 1ml H ₂ O milli-Q®)
EC+Sol1	Caco-2 con AlkaWater® (10 μ l in 1ml H ₂ O milli-Q®)
EC+Sol2	Caco-2 con AlkaCoffee® (100 μ l in 1ml H ₂ O milli-Q®)

Colture cellulari

Le cellule LS174T e Caco-2 sono state ottenute dall'ATCC (American Type Culture Collection, USA) e coltivate regolarmente in pallone da 75 cm². LS174T sono stati coltivati in un mezzo Eagle modificato avanzato (A-MEM, GIBCO) contenente 4,5 g / l di glucosio, integrato con il 10% di siero bovino fetale, 2 mM di L-glutamina, 100 U / ml di penicillina e 100 g / ml di streptomina (Sigma- Aldrich). Le cellule Caco-2 sono state coltivate nel mezzo Eagle modificato di Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, USA), contenente 4,5 g / l di glucosio, integrato con il 10% di siero bovino fetale, 1% di amminoacidi non essenziali, 2 mM di L-glutamina, 100 U / ml di penicillina e 100 g / ml di streptomina (Sigma-Aldrich, USA). Le cellule sono state mantenute in un'atmosfera di 5% CO₂ e 95% di aria a 37 ° C.

Determinazione fluorimetrica delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

La determinazione fluorimetrica dei livelli di ROS è stata determinata dalla sonda fluorogena sensibile alla membrana ROS 5,6-carbossi-2,7 dicloro fluoresceina diacetato, DCHF-DA (Molecular Probes, Leiden, Paesi Bassi). Le cellule LS174T e Caco-2 sono state coltivate fino alla semiconfluenza in 24 piastre multipozzetto e quindi incubate per 18 ore prima degli esperimenti in mezzo completo in presenza e in assenza di 100 μ M di α -glucani (AHCC), β -glucani e 25 μ M di vitamina C da solo o in combinazione (mix).

Le cellule sono state lavate due volte con PBS e incubate con 10 μ M di DCHFDA nel mezzo di coltura senza siero per 10 minuti a 37 ° C. Le cellule sono state lavate tre volte con PBS contenente 10 mM di glucosio, 1,2 mM MgCl₂ e 1,2 mM CaCl₂. La fluorescenza della dicloro fluoresceina (DCF) è stata misurata a diversi intervalli di tempo utilizzando il fluorometro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Electron Oy, Vantaa, Finlandia) e i dati sono stati analizzati dal software Ascent.

Estrazione dell'RNA dalla linea cellulare LS174T e Caco-2

Sono stati ottenuti dieci microgrammi di RNA totale dalle cellule LS174T e Caco-2. Il metodo Trizol (Invitrogen, no. 15596-026) è stato utilizzato per l'isolamento e la purificazione dell'RNA [10]. L'RNA è stato isolato includendo una fase di digestione con DNasi. Queste procedure di isolamento dell'RNA standardizzate garantiscono RNA di alta qualità. Utilizzando la piattaforma Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) i campioni di RNA sono stati sottoposti a controlli di qualità per documentare l'identificazione dei picchi di RNA ribosomiale (rRNA) 18-S e 28-S. Le rese erano 9-15 μ g e il RNA Integrity Number (RIN) era compreso tra 8,2 e 10.

PCR di trascrizione inversa quantitativa (RT-PCR in tempo reale)

Per confermare i pattern di espressione dei geni TNF- α , IL-1 β e COX-2, abbiamo eseguito una RT-PCR quantitativa utilizzando il metodo Ct comparativo. I livelli di trascrizione dei geni target sono stati normalizzati a G6PD (il controllo interno) dopo aver corretto le differenze nelle efficienze di amplificazione. Le reazioni qRT-PCR (n = 3) sono state eseguite per ciascun gene di interesse utilizzando un sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Tutti i geni studiati sono stati precedentemente identificati e le sequenze erano disponibili in GenBank. I primer per l'analisi qRT-PCR sono stati progettati utilizzando il programma Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Le reazioni finali di PCR contenevano: 0,4 μ M di ciascun primer; 0,25 \times SYBR Green (Invitrogen); 4 mM MgCl₂ e come template 5 ml di cDNA trascritto inversamente da una quantità standardizzata di RNA totale (0,3 μ g). La qRT-PCR è stata eseguita utilizzando Hotstart Taq polimerasi (Qiagen) in un volume finale di 20 μ l. Tutte le reazioni quantitative sono state sottoposte a: 95 ° C per 15 min seguiti da 45 cicli a 94 ° C per 15 s, 59 ° C 15 s e 72 ° C 15 s. L'analisi della curva di fusione è stata applicata a tutte le reazioni per garantire l'omogeneità del prodotto di reazione.

La potenziale contaminazione è stata valutata includendo RNA totale non trascritto inverso (contaminazione da DNA genomico) e controlli senza template, osservando l'assenza di prodotti in queste reazioni.

Per rilevare i modelli di espressione di miR-146a, abbiamo eseguito una RT-PCR quantitativa utilizzando il cDNA ottenuto utilizzando primer oligo-dT o primer della trascrittasi inversa (RT) stem-loop, rispettivamente. RNU6B è stato utilizzato come controlli per miRNA. La qPCR in tempo reale è stata eseguita nelle seguenti condizioni: 94 ° C per 4 min seguiti da 40 cicli a 94 ° C per 1 min, 56 ° C per 1 min e 72 ° C per 1 min. I livelli di espressione relativa di hsa-mir-5588-5p, hsa-mir-3658, hsa-mir-567 e hsa-mir-3908 sono stati calcolati utilizzando il metodo 2- $\Delta\Delta$ Ct.

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- α , IL-1 β 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).

Discussione

Enterocyte like - Caco 2 cells sono state coltivate in diverse condizioni sperimentali: con estratto di caffè, in presenza di acqua alcalina, in presenza di un correttore di acidità e in presenza di un'associazione di entrambe le soluzioni alcaline per valutare come viene modificato il livello di citochines. Abbiamo utilizzato questo tipo di coltura cellulare perché offriva preziose informazioni sull'assorbimento di farmaci e componenti dietetici e perché ha la proprietà di produzione di citochine [3]. Le citochine sono regolatrici delle risposte dell'ospite a infezioni, risposte immunitarie, infiammazioni e traumi. Alcune citochine agiscono per peggiorare la malattia (proinfiammatorie), mentre altre servono a ridurre l'infiammazione (antinfiammatorie). L'interleuchina (IL) -1 e il fattore di necrosi tumorale (TNF) sono citochine proinfiammatorie che producono febbre, infiammazione, distruzione dei tessuti e, in alcuni casi, shock e morte [9]. L'interleuchina-6 agisce sia come citochina pro-infiammatoria che come citochina anti-infiammatoria. IL-6 attiva i suoi recettori CD130 e CD126 per formare un complesso, avviando così una cascata di trasduzione del segnale attraverso determinati fattori di trascrizione come JAK e STAT [10]. COX-2 è un gene di risposta precoce inducibile e viene attivato in risposta a vari stimoli fisiologici extracellulari o intracellulari: lipopolisaccaride (LPS), interleuchina-1 (IL-1), fattore di necrosi tumorale (TNF) e altri [11]. Enterocyte like - Le cellule Caco 2 producono un livello basale di citochine proinfiammatorie, come possiamo vedere nel controllo non trattato, perché sono cellule di adenocarcinoma del colon-retto e gli stessi citochini sono responsabili dell'aumento di Cox-2. La presenza dell'estratto di caffè esacerba lo stato infiammatorio delle cellule e induce una maggiore espressione del gene codificante per l'isoforma inducibile della cicloossigenasi2.

L'aspetto più importante del lavoro è stato quello di dimostrare che le soluzioni alcaline migliorano lo stato infiammatorio con un abbassamento complessivo delle citochine e dell'enzima proinfiammatorio. Il blocco delle citochine provoca l'inibizione di diversi percorsi che normalmente innescano un aumento dell'espressione dei geni proinfiammatori. Un altro aspetto importante del lavoro è il ruolo del miR-146a. Le citochine attivano il fattore nucleare kappaB (NF-kB), che viene spesso rilevato nei tumori, attraverso TLR4, un recettore proteico. Questo recettore rileva le citochine e continua attraverso una singola via di trasduzione che utilizza IRAK1 e TRAF6, altri recettori proteici. Dopo aver attraversato il percorso di trasduzione, kB viene infine attivato. Quando kB è attivato, NF-kB rileva i geni che hanno un sito di legame complementare. Uno dei geni che ha un sito di legame per NF-kB è microRNA-146a. MicroRNA 146a quindi inibisce la traduzione di IRAK1 e TRAF6 come dimostrato nell'esperimento di Tagonov e del suo team che ha dimostrato una delezione mirata del gene miR-146a nei topi. Hanno scoperto che la delezione del gene miR-146a causava una diminuzione della concentrazione di miR-146a nella milza, nel midollo osseo e nel timo. Ciò ha causato l'aumento delle citochine infiammatorie (IL-6). Tagonov e il suo team hanno concluso che la delezione di miR-146a potrebbe causare una risposta eccessiva agli stimoli infiammatori o una risposta estesa allo stimolo infiammatorio. Una diminuzione della presenza di miR-146a nella cellula, potrebbe portare a stati infiammatori cronici e crescita tumorale [12]. I nostri risultati sono in accordo con Tagonov e il suo team, perché un abbassamento dello stato infiammatorio dovuto alla presenza di soluzioni alcaline riduce l'attivazione della via NF-kB da parte delle citochine pro-infiammatorie e quindi ci sarà una minore espressione del gene che codifica per miR-146a. In generale, le risposte infiammatorie sono il modo in cui le cellule combattono i patogeni. Tuttavia, la risposta infiammatoria incontrollata interrompe la funzione naturale delle cellule e la loro omeostasi. In conclusione, le soluzioni alcaline sono state pensate come coadiuvanti di una dieta equilibrata ricca di cibi acidemici.

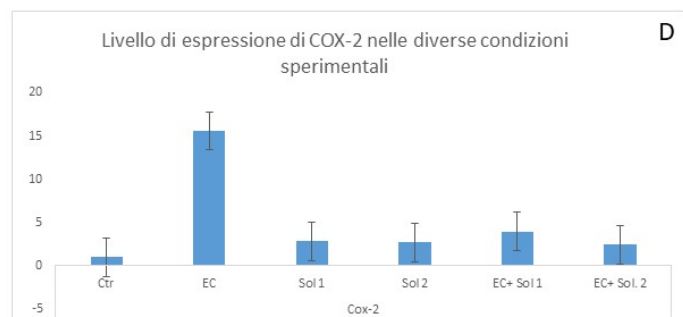
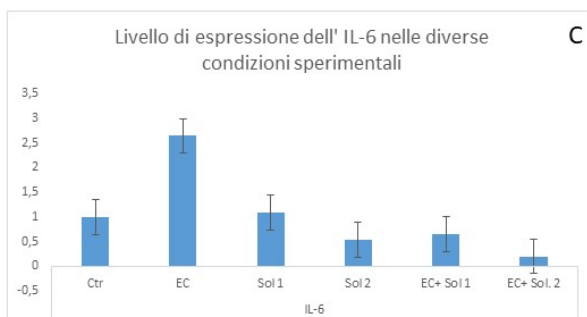
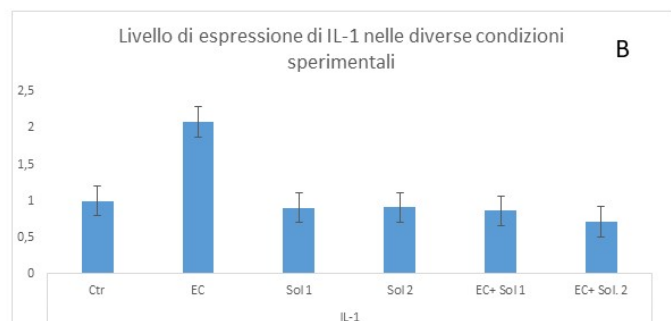
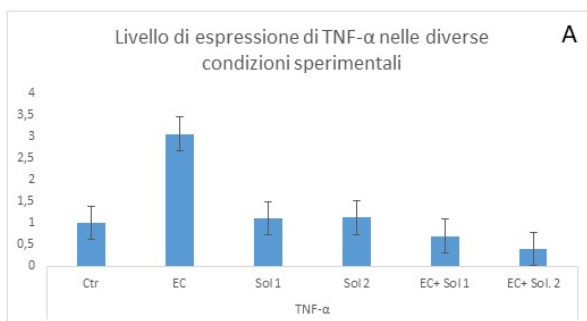
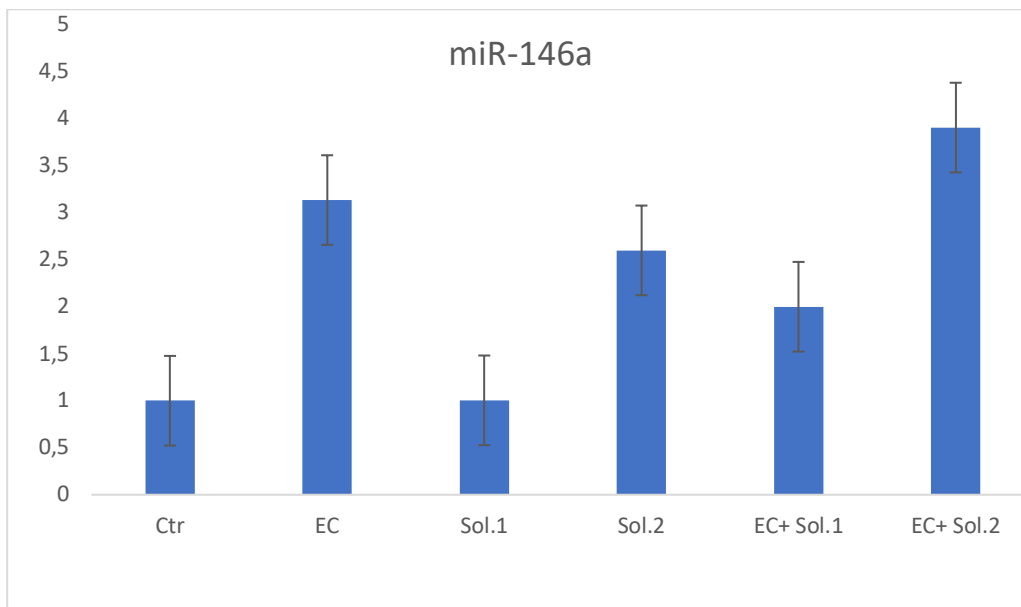


Figura 1. Effetto antiinfiammatorio di Alkawater e Alkacoffee dopo trattamento con estratto di caffè sui livelli di espressione genica di TNF- α (A), IL-1 (B), IL-6 (C) e COX-2 (D)

Bibliografia

1. Che cos'è l'acqua alcalina? Definizione, vantaggi ed effetti collaterali. "Study.com, 19 novembre 2016, study.com/academy/lesson/what-is-alkaline-water-definition-benefits-side-effects.html.
2. Dan JIN, Sung Hoon RYU, Hyun Won KIM, Eun Ju YANG, Soo Jung LIM, Yong Suk RYANG, Choon Hee CHUNG, Seung Kyu PARK e Kyu Jae LEE (2006) Effetto anti-diabetico dell'acqua alcalina ridotta su OLETF Ratti, bioscienza, biotecnologia e biochimica.
3. Capitolo Caco-2 Cell Line The Impact of Food Bioactives on Health, 2015 ISBN: 978-3-319-15791-7.
4. Rusca, Nicole & Monticelli, Silvia. (2011). MiR-146a in Immunità e malattia. *Biologia molecolare internazionale*. 2011.
5. Chen BB, Li ZH, Gao S. Circulating miR-146a / b correla con citochine infiammatorie nella BPCO e potrebbe predire il rischio di esacerbazione acuta della BPCO. *Medicina (Baltimora)*. 2018 febbraio;
6. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. & Baltimore, D. Induzione dipendente da NF-kappaB di microRNA miR-146, un inibitore mirato alle proteine di segnalazione delle risposte immunitarie innate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006).

7. KD Taganov, MP Boldin, KJ Chang e D. Baltimore, "Induzione NF- κ B-dipendente del microRNA miR-146, un inibitore mirato alle proteine di segnalazione delle risposte immunitarie innate", *Atti della National Academy of Sciences of the Stati Uniti d'America*, vol. 103, n. 33, pagg. 12481–12486, 2006
8. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNA nella segnalazione NF-kappaB. *J Mol Cell Biol.* 2011; 3 (3): 159–166. doi: 10.1093 / jmcb / mjr007
9. Proinfiammatory Cytokines Dinarello, Charles A. *CHEST*, Volume 118, Issue 2, 503 - 508.
10. Luo Yang, Zheng Song Guo Hall of Fame tra le citochine pro-infiammatorie: il gene dell'interleuchina-6 e le sue frontiere dei meccanismi di regolazione trascrizionale in immunologia *VOL 7*, 2016 DOI = 10.3389 / fimmu.2016.00604 ISSN = 1664-3224.
11. Gandhi Jaya, Khera Lohit, Gaur Nivedita, Paul Catherine, Kaul Rajeev Role of Modulator of Inflammation Cyclooxygenase-2 in Gammaherpesvirus Mediated Tumorigenesis, *Frontiers in Microbiology Vol.8* 2017 DOI = 10.3389 / fmicb.2017.00538 ISSN = 1664-302X.
12. [12] Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, et al. miR-146a è un freno significativo all'autoimmunità, alla mieloproliferazione e al cancro nei topi. *J Exp Med.* 2011; 208 (6): 1189–1201. doi: 10.1084 / jem.20101823.
13. Hoffmann G, Nyhan W, Zschocke J, Kahler S, Mayatepek E. *Eredited Metabolic Disease Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins* 2002; 309-11.
14. Kliegman R, Stanton B, Geme J, Schor N, Behrman R. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 19a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2011; 720.
15. Raby RB, Ward JC, Herrod HG. Acidemia propionica e immunodeficienza. *J Inherit Metab Dis*1994; (17): 250-1.
16. Church JA, Koch R, Shaw KN, Nye CA, Donnell GN. Immune functions in methylmalonic aciduria. *J Inherit Metab Dis* 1984; 7 (1): 12-4.
17. Nakamura M, Tokura Y. Aciduria metilmalonica che presenta- zioni ricorrenti multiple di mollusco contagioso. *Dermatoendocrinol* 2010; 2 (2): 60-1.
18. Okano M, Kishiyama K, Satake N, Kubo S, Ishikawa N. Un caso di ectima gangrenoso fulminante associato a infezione da *Pseudomonas aeruginosa* in un paziente con acidemia metilmalonica. *Scand J Infect Dis* 1994; 26 (1): 107-8.
19. Lardner A. Gli effetti del PH extracellulare sulla funzione immunitaria. *J Leukoc Biol* 2001; 69 (4): 522-30.
20. Alizadeh Najjarbashi F, Mesdaghi M, Alaei M, Shakiba M, Jami A, Ghadimi F. Uno studio sul sistema immunitario umorale e complementare dei pazienti con acidemia organica. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2015. 14 (6): 638-641.