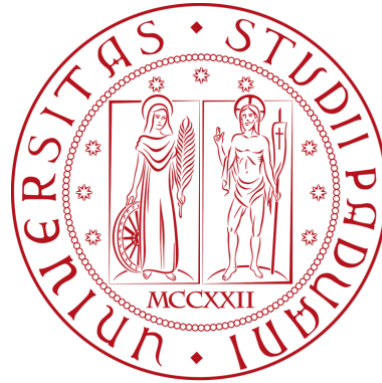


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**La dieta chetogenica modula la via AMPK-mTOR
nel tumore al seno**

Tutor : Prof. Luigi Leanza

Dipartimento di Biologia

Co-tutor : Dott.ssa Michela Rossini

Dipartimento di Biologia

Laureanda : Bari Veronica

Matricola 2100955

ANNO ACCADEMICO 2025/2026

INDICE

Capitolo 1: Introduzione	5
1.1: Incidenza, epidemiologia, fattori di rischio del tumore al seno e classificazione	5
1.2: Effetto Warburg	7
1.3: Dieta chetogenica: definizione, benefici e applicazioni	9
1.4: Meccanismi metabolici coinvolti nella dieta chetogenica	10
1.5: Via di segnalazione AMPK-mTOR nel metabolismo tumorale.	11
Capitolo 2: Approccio sperimentale	13
2.1: Materiali	13
<i>2.1.1: Campioni in vitro e restrizione del glucosio</i>	<i>13</i>
<i>2.1.2: Modelli in vivo e dieta chetogenica</i>	<i>13</i>
2.2: Metodi	14
<i>2.2.1: Analisi Western Blot</i>	<i>14</i>
<i>2.2.2: Test di migrazione e vitalità cellulare</i>	<i>15</i>
<i>2.2.3: Misurazione dei ROS intracellulari</i>	<i>16</i>
<i>2.2.4: Immunoistochimica e colorazione H&E</i>	<i>17</i>
Capitolo 3: Risultati	19
3.1: Effetti della dieta chetogenica sui parametri fisiologici nei topi	19
3.2: Regolazione dell'asse AMPK-mTOR da parte della dieta chetogenica in vivo	20
3.3: Effetti della restrizione di glucosio in vitro	22
<i>3.3.1: Effetti sulla migrazione e proliferazione cellulare</i>	<i>22</i>
<i>3.3.2: Effetti sui livelli intracellulari di ROS</i>	<i>23</i>
<i>3.3.3: Effetti sui mediatori di attivazione di AMPK e regolazione di espressione di mTOR da parte di AMPK</i>	<i>24</i>
Capitolo 4: Discussioni e conclusioni	27
Capitolo 5: Bibliografia	32

ABSTRACT

Il tumore al seno (BC) è uno dei tumori maligni più diffusi tra le donne nel mondo. Questa patologia, altamente complessa, mostra un'elevata mortalità, dimostrando quindi una minaccia per i pazienti colpiti. In particolare, la forma più aggressiva è il carcinoma mammario triplo negativo (TNBC). La dieta chetogenica (KD), povera di carboidrati e ricca di grassi, rappresenta una potenziale strategia terapeutica adiuvante per i malati di tumore al seno, e il seguente lavoro mira ad osservarne gli effetti nell'ambito del TNBC in cellule 4T1. In particolare, topi portatori di tumore al seno, sviluppato dopo iniezione di cellule 4T1, mostrano una riduzione della crescita tumorale e la locale attivazione dell'asse AMPK-mTOR, dopo essere stati trattati con KD.

Dati *in vitro* riportano che cellule 4T1 sottoposte a deprivazione di glucosio, mostrano un AMPK attivato, grazie a un aumento intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

I risultati confermano il ruolo della dieta chetogenica nell'inibire la crescita del TNBC modulando la regolazione dei ROS sulla via di segnale AMPK/mTOR, ricoprendo quindi un potenziale ruolo terapeutico antitumorale.

Capitolo 1: Introduzione

1.1: Incidenza, epidemiologia, fattori di rischio del tumore al seno e classificazione

Il tumore al seno rappresenta la neoplasia più frequente tra le donne a livello globale. Secondo l'organizzazione mondiale della sanità (OMS), nel 2020 sono stati diagnosticati 2,3 milioni di nuovi casi pari a circa il 29% di tutte le diagnosi oncologiche femminili. I tassi di incidenza sono più elevati nei Paesi sviluppati, mentre la mortalità è maggiore nei Paesi in via di sviluppo o in transizione, verosimilmente a causa di minore accesso a programmi di screening e trattamenti efficaci. Negli ultimi anni si è osservato un incremento sia dell'incidenza del tumore al seno, sia della sua mortalità, attribuibile da un lato al miglioramento delle tecniche diagnostiche e dall'altro alle modificazioni dei fattori di rischio. I fattori di rischio possono essere distinti in non modificabili e modificabili. Tra i primi, il sesso femminile rappresenta il principale determinante, poiché le cellule mammarie sono altamente sensibili a ormoni sessuali, in particolare estrogeni e androgeni. Eventi fisiologici come menarca, gravidanza, allattamento e menopausa, nonché la loro durata, influenzano significativamente il rischio individuale. L'età costituisce un ulteriore fattore determinante: il rischio di sviluppare carcinoma aumenta progressivamente con l'avanzare degli anni, passando da circa l'1,5% a 40 anni al 4% a 70 anni. Tuttavia, le pazienti più giovani tendono a sviluppare forme più aggressive. Un ruolo rilevante è svolto dalla familiarità e dalle mutazioni genetiche ereditarie. Il rischio aumenta in presenza di parenti affetti, soprattutto se la diagnosi avviene prima dei 50 anni. I principali geni coinvolti sono BRCA1 e BRCA2, generalmente trasmessi tramite modalità autosomica dominante, sebbene possano verificarsi anche mutazioni sporadiche. I fattori di rischio modificabili comprendono invece elementi legati allo stile di vita e all'esposizione ambientale. In particolare, l'obesità è associata a un aumento significativo del rischio, mentre uno stile di vita attivo svolge un ruolo protettivo. Il fumo invece, contribuisce all'esposizione a sostanze cancerogene che possono indurre mutazioni in oncogeni e geni oncosoppressori (Lukasiewicz et al., 2021). Dal punto di vista biologico, i carcinomi mammari invasivi costituiscono un gruppo eterogeneo di neoplasie che differiscono per caratteristiche cliniche, morfologiche e molecolari. Nella pratica

clinica, la classificazione dei diversi tipi di carcinoma mammario si basa sulle caratteristiche molecolari e istologiche della neoplasia, oppure sull'analisi immunoistochimica. La classificazione istologica distingue le lesioni in pre-invasive ed invasive. Tra le forme pre-invasive si riconosce il carcinoma duttale in situ (DCIS), caratterizzato dalla proliferazione di cellule neoplastiche confinata all'interno dei dotti mammari, senza invasione dei tessuti circostanti. Quando le cellule tumorali acquisiscono la capacità di superare la membrana basale e infiltrare il tessuto mammario, la lesione evolve in carcinoma duttale invasivo, che può metastatizzare e diffondersi tramite il sangue e la linfa. Un'altra lesione pre-invasiva è il carcinoma lobulare in situ (LCIS), che origina nei lobuli mammari e viene considerato principalmente un indice di aumento del rischio di sviluppare un carcinoma invasivo. La forma invasiva corrispondente, il carcinoma lobulare invasivo, è spesso associata alla perdita dell'espressione della proteina E-caderina, codificata dal gene CDH1. La classificazione molecolare deriva dall'analisi dell'espressione di circa cinquanta geni. I principali sottotipi comprendono il Luminal A, caratterizzato da un'elevata espressione dei recettori ormonali e una bassa attività proliferativa, e il Luminal B, che mantiene la positività per i recettori ormonali ma presenta una maggior proliferazione cellulare e una prognosi sfavorevole. Il sottotipo HER2-enriched è caratterizzato da amplificazione e maggiore espressione del gene HER2 e quindi dei suoi recettori. Il sottotipo Basal-like, molto aggressivo e spesso associato a mutazioni dei geni BRCA1, presenta elevate capacità proliferative. Il sottotipo Claudin-low mostra una ridotta espressione delle proteine Claudine, coinvolte nelle giunzioni cellulari. Infine il sottotipo Normal-like presenta un profilo di espressione genica simile a quello del tessuto mammario normale, sebbene il suo significato biologico e clinico sia ancora poco definito. Poiché le analisi di espressione genica non sono sempre disponibili nella pratica clinica, viene comunemente utilizzata una classificazione surrogata immunoistochimica, basata sulla valutazione di quattro marcatori: ER (recettore estrogenico), PR (recettore del progesterone), HER2 e Ki67 (indice proliferativo). Il sottotipo Luminal A-like è caratterizzato da positività per ER e PR, negatività per HER2 e bassi livelli di ki67. Il Luminal-B-like HER2 negativo presenta positività per ER, negatività per HER2 e un elevato indice proliferativo. Il sottotipo luminal B-like HER2 positivo esprime sia i recettori per ER sia HER2. Il sottotipo HER2-

enriched è negativo per i recettori ER e PR, mentre è positivo per HER2. Infine, il carcinoma triplo negativo (TNBC), è definito dall'assenza di espressione di ER, PR e HER2; esso rappresenta una delle forme più aggressive di carcinoma mammario ed è spesso associato a elevati livelli di ki67. Dal punto di vista terapeutico, il trattamento può variare in base al sottotipo e alle condizioni del paziente. In particolare, l'intervento può riguardare la chemioterapia, a volte l'immunoterapia oppure gli inibitori PARP nei tumori BRCA-mutati. Negli ultimi anni, i progressi nelle terapie oncologiche hanno migliorato la risposta iniziale al trattamento di molti tumori. Tuttavia, l'elevata eterogeneità tumorale favorisce la resistenza terapeutica, permettendo ad alcuni gruppi cellulari resistenti di adattarsi e sopravvivere. Questo, nel tempo contribuisce alla progressione e alla recidiva della malattia (Mubin et al.,2026).

Le caratteristiche epidemiologiche e molecolari del carcinoma mammario evidenziano una malattia fortemente eterogenea, la cui insorgenza è associata a molteplici fattori di rischio genetici e ormonali, mentre la progressione tumorale dipende da alterazioni metaboliche delle cellule neoplastiche, tra cui l'effetto Warburg, che verrà analizzato nel capitolo successivo.

1.2: Effetto Warburg

Per quanto riguarda il metabolismo delle cellule tumorali, Otto Warburg osservò già nel 1924 che, a differenza delle cellule normali, le cellule neoplastiche tendono ad utilizzare il glucosio convertendolo rapidamente in lattato anche in presenza di ossigeno. Questo fenomeno ora è noto come effetto Warburg o glicolisi aerobica e rappresenta una delle principali caratteristiche della riprogrammazione metabolica tumorale. L'energia, sottoforma di ATP (adenosintrifosfato), è prodotta prevalentemente attraverso la fosforilazione ossidativa a livello mitocondriale. L'effetto Warburg risulta apparentemente inefficiente dal punto di vista energetico, poiché la glicolisi aerobica produce quantità inferiori di ATP rispetto alla fosforilazione ossidativa mitocondriale (come evidenziato dalla figura 1). Tuttavia, nell'effetto Warburg la velocità del flusso che trasforma glucosio in lattato è fino a cento volte superiore rispetto a quella del ciclo di Krebs. Di conseguenza, la produzione complessiva di ATP nell'unità di tempo può risultare comparabile tra i due processi. La preferenza per la glicolisi aerobica è strettamente correlata alle

esigenze proliferative delle cellule tumorali. Infatti, questa via metabolica consente di deviare intermedi glicolitici verso vie anaboliche, fornendo precursori essenziali per la sintesi di nucleotidi, acidi grassi e amminoacidi, necessari per la crescita e la produzione di biomassa cellulare. Un ulteriore vantaggio della glicolisi aerobica riguarda le capacità delle cellule tumorali di sopravvivere in condizioni che normalmente condurrebbero all'apoptosi. In particolare, l'anoikis, una forma di morte cellulare programmata che si verifica quando le cellule perdono il contatto con la matrice extracellulare, è associata all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tuttavia, le cellule tumorali metastatiche sono in grado di aggirare questo meccanismo riducendo lo stress ossidativo tramite l'azione di sistemi antiossidanti e il riadattamento del proprio metabolismo energetico. In questo modo limitano l'accumulo di ROS, evitano l'attivazione delle vie apoptotiche e sopravvivono anche in assenza di adesione alla matrice extracellulare, acquisendo la capacità di diffondere e colonizzare tessuti distanti. Attualmente, è noto che la riprogrammazione metabolica delle cellule tumorali è regolata da oncogeni e geni oncosoppressori. Tra gli oncogeni maggiormente coinvolti, si annoverano AKT e mTOR, i quali promuovono l'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor). In condizioni fisiologiche, HIF-1 α viene attivato in risposta a stati di ipossia, promuovendo un aumento della glicolisi e una riduzione della fosforilazione ossidativa. Nelle cellule tumorali, tuttavia, questo fattore risulta attivo anche in presenza di ossigeno, determinando un incremento dell'assorbimento di glucosio, una maggiore produzione di lattato e di conseguenza, una promozione della proliferazione cellulare (Bose et al.,2021).

Considerando la riprogrammazione metabolica tipica delle cellule tumorali, descritta dall'effetto Warburg, la dieta chetogenica emerge come possibile soluzione volta a modulare il metabolismo energetico neoplastico, riducendo l'apporto glucidico e promuovendo l'utilizzo di corpi chetonici come fonte energetica alternativa.

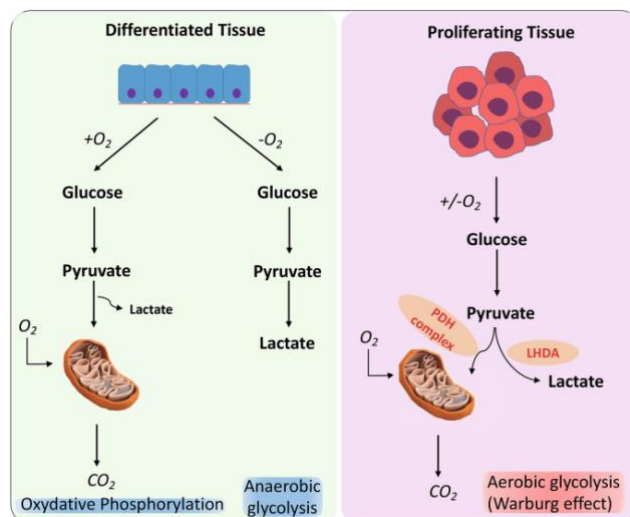


Fig. 1: *Da Bose et al.,2021. Confronto tra il metabolismo ossidativo fisiologico e la glicolisi aerobica (effetto Warburg) nelle cellule proliferanti.*

1.3: Dieta chetogenica: definizione, benefici e applicazioni

La dieta chetogenica è un regime alimentare costituito da un elevato apporto di lipidi, un adeguato contenuto di proteine e una ridotta quantità di carboidrati, generalmente limitati a circa 50 grammi al giorno, pari al 5-10% dell'apporto calorico totale. Le proporzioni dei macronutrienti possono variare a seconda degli obiettivi specifici, ma l'elemento distintivo rimane la restrizione glucidica. L'obiettivo principale di questo regime dietetico è l'induzione della chetosi, uno stato metabolico in cui l'organismo utilizza prevalentemente acidi grassi e corpi chetonici, piuttosto che glucosio, come fonte energetica. La riduzione dell'apporto di carboidrati comporta una diminuzione dei livelli plasmatici di insulina, favorendo così la lipolisi, l'ossidazione degli acidi grassi e la produzione epatica di corpi chetonici. Tra gli innumerevoli benefici associati alla dieta chetogenica, particolare rilevanza è attribuita agli effetti antinfiammatori. Studi comparativi indicano una riduzione dei principali marcatori dell'infiammazione, quali TNF- α e IL-6. Tali effetti sono attribuiti a diversi fattori, tra cui l'eliminazione degli zuccheri semplici, la riduzione dell'apporto totale di carboidrati, che induce uno stato di chetosi, e un maggior introito di acidi grassi omega-3. In questo contesto, il β -idrossibutirrato (BHB), uno dei principali corpi chetonici, svolge un ruolo chiave, in grado di inibire l'inflammasoma NLRP3, coinvolto nei processi infiammatori (Dyńska et al.,2025).

La dieta chetogenica trova varie applicazioni nell'ambito clinico, tra cui il trattamento dell'obesità, dell'insufficienza cardiaca e di patologie neurologiche, in particolare l'epilessia, nonché di malattie neurodegenerative. Inoltre, essa sta acquisendo crescente interesse in ambito oncologico, dove lo studio del metabolismo dei corpi chetonici potrebbe contribuire allo sviluppo di strategie terapeutiche nutrizionali mirate. (Puchalska e Crawford, 2017). In particolare, la via dei corpi chetonici rappresenta una strategia interessante in ambito oncologico perché consente di contrastare il problema dell'effetto Warburg, tipicamente sfruttato dalle cellule neoplastiche per la loro crescita e proliferazione.

1.4: Meccanismi metabolici coinvolti nella dieta chetogenica

I corpi chetonici rappresentano una fonte energetica alternativa in grado di sostenere le funzioni di diversi organi, incluso il cervello, in determinate condizioni metaboliche; inoltre, svolgono ruoli protettivi, ad esempio nei confronti dei processi infiammatori. Nei mammiferi, essi vengono prodotti principalmente a livello epatico, a partire dall'acetil-CoA (Acetil-Coenzima A) e successivamente trasportati a tessuti extraepatici, dove vengono ossidati per la produzione di energia. La chetogenesi si verifica in condizioni caratterizzate da un eccesso di Acetil-CoA, derivante dall'ossidazione degli acidi grassi, associato a una ridotta disponibilità di ossalacetato. In questo contesto metabolico, l'Acetil-CoA non può essere completamente indirizzato verso il ciclo di Krebs e viene quindi utilizzato per la sintesi dei corpi chetonici attraverso una serie di reazioni enzimatiche. I principali corpi chetonici prodotti sono acetoacetato (AcAc) e β -idrossibutirrato, i quali vengono trasportati nei tessuti periferici tramite specifici trasportatori di monocarbossilati, quali MCT1 (Monocarboxylate Transporter 1) e MCT2 (Monocarboxylate Transporter 2). Una volta all'interno delle cellule extraepatiche, il β -idrossibutirrato viene ossidato ad acetoacetato (AcAc), successivamente convertito in Acetoacetil-CoA dall'enzima Succinil-CoA-3-ossiacido CoA transferasi (SCOT). L'acetoacetil-CoA è quindi scisso dalla tiolasi mitocondriale in due molecole di Acetil-CoA, che entrano nel ciclo di Krebs contribuendo alla produzione di ATP.

In condizioni di ridotto apporto glucidico, il fegato utilizza prevalentemente i grassi come substrato per la produzione di corpi chetonici, mentre i glucidi disponibili

vengono destinati verso reazioni anaplerotiche, volte al mantenimento degli intermedi del ciclo di Krebs (Puchalska e Crawford, 2017).

La dieta chetogenica rappresenta uno schema dietetico in cui la ridotta quantità di carboidrati, induce l'organismo a utilizzare i corpi chetonici come principale fonte energetica. Allo stesso modo però, tale condizione metabolica può determinare un incremento dello stress ossidativo e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste ultime agiscono come regolatori positivi di AMPK, contribuendo alla sua attivazione in risposta allo stress cellulare. Nel capitolo successivo verranno approfonditi i principali meccanismi molecolari coinvolti nella via di segnalazione AMPK-mTOR in ambito oncologico.

1.5: Via di segnalazione AMPK-mTOR nel metabolismo tumorale.

L'omeostasi cellulare dipende dalla disponibilità di energia e nutrienti entro un intervallo ottimale, necessario al mantenimento delle normali funzioni cellulari. Quando enzimi e proteine vengono fosforilati, si verifica un consumo di ATP con conseguente aumento dei livelli di ADP e AMP. In condizioni in cui la produzione di ATP risulta insufficiente rispetto al fabbisogno cellulare, l'incremento dei rapporti ADP/ATP e AMP/ATP determina l'attivazione della AMP-activated protein kinase (AMPK) secondo la via "canonica" (Phillips, 2026). Oltre a questo meccanismo, esiste una modalità di attivazione "non canonica", mediata dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In particolare, uno studio condotto nel 2009, ha dimostrato che lo stress ossidativo indotto da condizioni di ipossia, è in grado di attivare AMPK anche in assenza di un aumento del rapporto AMP/ATP. Inoltre, lo stress ossidativo mitocondriale, frequentemente associato a condizioni patologiche come il cancro, può promuovere l'attivazione di AMPK indipendentemente dallo stato energetico cellulare (Emerling et al., 2009).

Una volta attivata, AMPK agisce come regolatore centrale del metabolismo cellulare, inibendo processi anabolici ad elevato consumo energetico, tra cui la via mediata da mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) e promuovendo processi catabolici finalizzati alla produzione di ATP. Questo regola anche la crescita delle cellule tumorali, l'apoptosi e la chemioresistenza.(Ke et al., 2017).

In particolare, AMPK favorisce l'aumento dell'internalizzazione di glucosio attraverso i trasportatori GLUT1 e GLUT4 e favorisce l'ingresso degli acidi grassi

nei mitocondri, fornendo substrati utili alla produzione di energia in condizioni di carenza nutrizionale.

AMPK e mTOR agiscono in modo opposto a livello del metabolismo cellulare. A differenza di AMPK, mTOR viene attivato in condizioni di abbondanza di nutrienti, energia e fattori di crescita, favorendo la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. mTOR forma due complessi multiproteici distinti: mTORC1 e mTORC2. Il complesso mTORC1 è sensibile alla disponibilità di nutrienti e integra segnali provenienti da ossigeno, fattori di crescita, aminoacidi e stato energetico cellulare, stimolando la sintesi di lipidi, nucleotidi, proteine e l'aumento della produzione di ATP. Alcuni amminoacidi come la leucina, rappresentano importanti attivatori di mTORC1, mentre condizioni di ipossia e stress cellulare, inclusi elevati livelli di ROS, ne inibiscono l'attività. Il complesso mTORC2, invece, è regolato principalmente dalla via PI3K ed è coinvolto nella regolazione della migrazione cellulare, proliferazione e sopravvivenza cellulare (Phillips, 2026).

In condizioni di ipossia, l'attivazione di AMPK può determinare l'inibizione di mTOR e l'induzione dell'autofagia, preparando la cellula a una potenziale carenza di nutrienti. (Emerling et al., 2009).

In tale contesto, la carenza glucidica può modulare l'espressione della via di segnalazione AMPK/mTOR, inducendo un aumento dei livelli intracellulari di ROS. L'attivazione di questo meccanismo molecolare contribuisce a ridurre la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali e a promuoverne l'apoptosi, evidenziando il potenziale ruolo della dieta chetogenica come strategia terapeutica adiuvante nel trattamento del carcinoma mammario.

Alla luce di tali informazioni, la seguente tesi si propone di illustrare i risultati dello studio condotto da Luo et al. (2026). In tale lavoro, vengono elucidati gli effetti soppressivi della dieta chetogenica e della deprivazione di glucosio, sul carcinoma mammario, con particolare focus sulla regolazione della via cellulare ROS-AMPK-mTOR.

Capitolo 2: Approccio sperimentale

In questo capitolo verranno analizzate le varie procedure pratiche utilizzate nello studio in esame.

2.1: Materiali

2.1.1: Campioni *in vitro* e restrizione del glucosio

Per la creazione di campioni *in vitro*, sono state utilizzate cellule della linea 4T1 di carcinoma mammario triplo negativo (TNBC), note per la capacità di crescita e metastatizzazione nei topi e considerata un modello rappresentativo dello stadio IV del carcinoma mammario nell'uomo. Le cellule 4T1 sono state coltivate in un terreno supplementato con siero fetale bovino e l'1% di soluzione di penicillina-streptomicina, in modo che possano proliferare e sopravvivere. Le colture sono state mantenute in un incubatore umidificato a 37°C con il 5% di anidride carbonica. Al fine di riprodurre un modello *in vitro* sottoposto a stress metabolico indotto dalla restrizione di glucosio, analogamente a come avverrebbe *in vivo*, al terreno di coltura sono state aggiunte diverse concentrazioni di glucosio. Per comprendere come varia la risposta nei vari test svolti al variare della concentrazione glucidica, sono stati creati 4 gruppi sperimentali: il gruppo di controllo è stato mantenuto a una concentrazione fisiologica di 11mM di glucosio, mentre i restanti gruppi sono stati esposti a concentrazioni pari a 2,5 mM, 5,5mM (dosi associate a restrizione glucidica) e 25mM (situazione di iperglicemia).

2.1.2: Modelli *in vivo* e dieta chetogenica

Un totale di 24 topi femmina BALB/c (un modello con caratteristiche standard, utilizzato in modo da ridurre al minimo le variazioni genetiche) è stato suddiviso casualmente in tre gruppi sperimentali, ciascuno composto da 8 topi: un gruppo di controllo sano, un gruppo modello caratterizzato da tumore e un gruppo sottoposto a dieta chetogenica (KD). I gruppi di controllo sano e modello sono stati alimentati con una dieta standard, mentre al gruppo KD è stata somministrata una dieta chetogenica. Per indurre il tumore, ai topi appartenenti al gruppo modello e al gruppo KD sono stati inoculate cellule tumorali 4T1 nella seconda ghiandola mammaria sinistra alla dose di 2×10^5 cellule per animale. Il gruppo di controllo

sano, invece, non è stato sottoposto ad inoculazione. La dieta chetogenica impiegata utilizzava un rapporto 90:9:1 rispettivamente di grassi, proteine e carboidrati. Tale formulazione consente di indurre e mantenere uno stato di chetosi nutrizionale, garantendo al contempo un adeguato apporto proteico per prevenire la perdita di massa muscolare e permettendo di riprodurre gli effetti metabolici e antitumorali osservati in diversi modelli oncologici.

Il numero di campioni di topi utilizzati è stato mantenuto al minimo necessario per garantire la significatività statistica, nel rispetto dei principi etici e del benessere animale. L'esperimento è stato interrotto al raggiungimento di un diametro tumorale pari a 1,5 cm.

2.2: Metodi

2.2.1: Analisi Western Blot

L'analisi Western Blot (WB) rappresenta una tecnica di laboratorio fondamentale per l'identificazione e la quantificazione di specifiche proteine nel campione di interesse (in questo caso la massa tumorale). Nell'analisi WB vengono seguiti tre passaggi principali: dopo l'estrazione delle proteine, avviene la loro separazione tramite elettroforesi su gel di agarosio, in modo da suddividerle in base al loro peso molecolare. Successivamente vengono trasferite su una membrana e infine avviene il loro rilevamento selettivo tramite anticorpi specifici. Le proteine sono state estratte tramite un tampone di lisi RIPA, integrato con inibitori delle proteasi e delle fosfatasi, al fine di preservarne l'integrità e lo stato di fosforilazione. Mediante un test chiamato BCA assay, sono state determinate le concentrazioni delle proteine estratte, misurando l'intensità di colore. Il test si basa su due passaggi principali: la riduzione del Rame (la cui quantità è proporzionale a quella delle proteine presenti) e l'aggiunta di acido bicinconinico (BCA) che consente il viraggio al viola intenso. I campioni proteici ottenuti in seguito all'estrazione, sono stati separati con elettroforesi su gel SDS-PAGE al 10% e al 6% in modo da essere distinguibili in base al peso molecolare e successivamente sono stati trasferiti su membrane in PVDF (polivinilidenfluoruro) per consentire l'immobilizzazione delle proteine. Le membrane sono state immerse in una soluzione di latte scremato al 5% in modo da saturare i siti di legame non specifici, e sono state incubate con anticorpi primari a 4°C tutta la notte. Questi sono selettivi nei confronti delle proteine target, tra cui

AMPK, p-AMPK α 1 (utilizzato per verificare lo stato di fosforilazione, e quindi di attivazione di AMPK), mTOR e P-mTOR (impiegato per determinare lo stato di fosforilazione e di attivazione di mTOR). Dopo tre lavaggi con tampone TBST, necessari per rimuovere eventuali legami aspecifici e migliorare la specificità del segnale immunologico, le membrane sono state incubate un ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari coniugati con perossidasi di rafano (HRP). Gli anticorpi secondari includono IgG di capra anti-coniglio coniugata con HRP e IgG di capra anti-topo coniugata con HRP. Questi sono in grado di legarsi a quelli primari, in modo che quando verrà aggiunto un reagente chimico, l'enzima HRP produrrà luce. Infine, per verificare il ruolo dei ROS nella via di segnalazione AMPK/mTOR, è stata impiegata l'N-acetilcisteina (NAC), una molecola in grado di ridurre i livelli di ROS intracellulari, svolgendo un'azione antiossidante. L'utilizzo di NAC ha permesso di valutare se le specie reattive dell'ossigeno (ROS) fossero coinvolte nell'attivazione di AMPK nelle cellule 4T1 in condizioni di deprivazione di glucosio. Inoltre, per comprendere la relazione funzionale tra AMPK e mTOR, è stato utilizzato il Compound C, un inibitore farmacologico di AMPK. Tale approccio ha consentito di verificare se l'inibizione di AMPK fosse in grado di ripristinare l'attivazione di mTOR, chiarendo quindi il rapporto di dipendenza funzionale tra queste due vie di segnalazione.

2.2.2: Test di migrazione e vitalità cellulare

Per valutare la capacità migratoria delle cellule tumorali in relazione alle diverse concentrazioni di glucosio, i ricercatori hanno utilizzato il metodo "scratch assay". Questo saggio risulta utile per comprendere la velocità con cui le cellule sono in grado di migrare per ripristinare un taglio o colmare uno spazio, e nel contesto tumorale, quanto le cellule siano "aggressive" nell'invasione di altri tessuti. Inizialmente, questo test prevede una crescita uniforme per la formazione di un'area omogenea di cellule all'interno di piccoli inserti di plastica. Successivamente, gli inserti sono stati rimossi tramite delle pinzette per creare uno spazio vuoto con una zona di "gap" priva di cellule. Hanno quindi suddiviso le cellule in vari gruppi, nutrendole con le diverse soluzioni glucidiche. A questo punto, le cellule ai lati hanno iniziato a spostarsi per sopperire alla zona priva di cellule. Infine, tramite un

software, hanno scattato varie immagini e le hanno confrontate per calcolare la quantità di area rimasta vuota.

Per verificare che i risultati ottenuti non dipendono dalla moltiplicazione delle singole cellule ma si tratti del loro effettivo spostamento utilizzano anche un altro test, il saggio di vitalità cellulare. Le cellule 4T1 nella fase di crescita logaritmica sono state raccolte mediante digestione con 0,25% di tripsina-EDTA. Il saggio di vitalità cellulare (CCK-8) è stato eseguito utilizzando piastre a 96 pozzetti. In ciascun pozzetto sono state seminate 2×10^3 cellule, in seguito sono state incubate per consentire l'adesione cellulare. Il terreno di coltura è stato sostituito da terreni contenenti diverse concentrazioni di glucosio (quello di controllo con 11mM di glucosio e quelli sperimentali con 2,5, 5,5 e 25 mM di glucosio). Dopo 24h di incubazione, sono stati aggiunti 10 μ l di soluzione di CCK-8. Questo liquido reagisce con le cellule vive; infatti, gli enzimi contenuti nelle cellule sane trasformano questo reattivo facendolo virare a un colore giallo. Terminata l'ultima ora di incubazione, è stata misurata l'assorbanza di ciascun pozzetto: più le cellule sono attive, più il liquido contenente CCK-8 assumerà un colore intenso.

Attraverso questi due saggi, i ricercatori possono valutare se una dose elevata di glucosio aumenti la capacità migratoria delle cellule oppure se ne stimoli semplicemente la proliferazione.

2.2.3: Misurazione dei ROS intracellulari

La cellula in condizioni di stress, come per esempio quello indotto dalla restrizione glucidica, inizia a produrre le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Queste, come descritto in precedenza, potrebbero essere coinvolte nella via di segnalazione AMPK-mTOR. Inoltre, un accumulo intracellulare di ROS è associato all'aumento dell'apoptosi. Per indagare la produzione intracellulare di ROS in condizioni di carenza glucidica, è stata impiegata la sonda fluorescente DCFH-DA. Questa molecola è in grado di attraversare la membrana cellulare e, pur non essendo inizialmente fluorescente, viene ossidata in presenza di ROS, trasformandosi in un composto fluorescente. Una volta aggiunta la sonda diluita direttamente sulle cellule contenute in provetta, queste sono state incubate al buio per circa 20 minuti, al fine di evitare che la luce interferisca sul segnale fluorescente. Durante questo tempo di incubazione, gli enzimi cellulari scindono questa sonda trasformandola in

DCFH, in modo che rimanga intrappolata all'interno della cellula. Terminata l'incubazione, sono stati effettuati cinque lavaggi (tre con il terreno di coltura e due con una soluzione salina chiamata PBS) per eliminare l'eccesso di sonda presente a livello extracellulare. Se all'interno della cellula sono presenti i ROS, questi reagiscono con DCFH convertendolo in DCF, una sostanza altamente fluorescente. Infine, è stata utilizzata la citometria a flusso che consente la quantificazione del segnale tramite la fluorescenza trasmessa da ogni singola cellula. Le cellule vengono fatte scorrere all'interno del citometro a flusso che consente la lettura di ogni singola cellula tramite un raggio laser. L'intensità della fluorescenza risulta direttamente proporzionale ai livelli intracellulari di ROS: un aumento del segnale indica un maggiore stato di stress ossidativo cellulare e quindi una maggior produzione di ROS.

2.2.4: Immunoistochimica e colorazione H&E

Questi esperimenti sono stati condotti con l'obiettivo di analizzare il tessuto tumorale al microscopio, al fine di comprenderne l'organizzazione strutturale, di valutare la proliferazione delle cellule neoplastiche e identificare le proteine biologicamente attive. A tale scopo, sono state utilizzate due tecniche: l'immunoistochimica, una tecnica che sfrutta gli anticorpi per identificare ed evidenziare le proteine nel tessuto tumorale, e la colorazione ematossilina ed eosina, che sfrutta la diversa acidità e basicità delle strutture cellulari per metterne in evidenza le componenti principali. I ricercatori hanno preparato i campioni di tessuto tumorale da analizzare, mediante fissazione delle cellule in paraformaldeide, per mantenerle integre impedendo la decomposizione, e successivamente hanno immerso il tessuto tramite inclusione in paraffina in modo da stabilizzarlo. I campioni, dopo la solidificazione della paraffina, sono stati sezionati in fette sottili di 5 micrometri di spessore e montati su vetrini per l'osservazione al microscopio. Successivamente, sono state eseguite le due diverse colorazioni in due campioni distinti: la colorazione H&E e l'analisi immunoistochimica. Tra le proteine ricercate tramite immunoistochimica sono presenti AMPK, attivata in condizioni di deprivazione glucidica e di stress energetico cellulare; mTOR, associata a stati di attiva proliferazione cellulare; le forme fosforilate p-AMPK e p-mTOR, che rappresentano le rispettive forme attive;

ki-67 una proteina indice della velocità di proliferazione delle cellule tumorali; e infine HER2, recettore sovraespresso nel sottotipo tumorale HER2-enriched. La colorazione con ematossilina-eosina (H&E) è stata eseguita per osservare la morfologia del tessuto tumorale, valutandone l'organizzazione cellulare e l'eventuale presenza di anomalie istologiche. Infine, i ricercatori hanno valutato i vetrini al microscopio identificando le proteine tramite le zone di colore marrone. Tramite uno specifico software, è stata valutata l'intensità del colore per determinare la quantità di specifiche proteine, prodotte dal tumore (Luo et al.,2026).

Capitolo 3: Risultati

Nel presente capitolo verranno analizzati i dati ottenuti e gli effetti osservati nei diversi esperimenti *in vivo* e *in vitro* nel lavoro pubblicato.

3.1: Effetti della dieta chetogenica sui parametri fisiologici nei topi

Lo studio si è proposto di valutare l'efficacia e gli effetti fisiologici e terapeutici della dieta chetogenica (KD) in un modello animale, analizzando nello specifico la sua capacità di indurre la chetosi nutrizionale, regolare l'omeostasi glicemica e inibire lo sviluppo di masse tumorali. L'esperimento è stato condotto confrontando tre diversi gruppi di topi: due gruppi di topi iniettati con cellule di tumore mammario sottoposti a dieta chetogenica (gruppo KD), o con una dieta standard (gruppo di controllo) e un gruppo di topi non iniettati. Nel corso dello studio sono stati monitorati diversi parametri fisiologici: il peso corporeo, la concentrazione ematica di corpi chetonici e i livelli di glicemia. Infine, sono stati rimossi e quantificati i tumori per valutarne la massa e il volume. Il tasso di inibizione tumorale è stato calcolato mediante la seguente formula: "Tasso di inibizione tumorale = $(1 - \text{peso del tumore del gruppo trattato} / \text{peso del tumore del gruppo di controllo}) \times 100\%$ ". I risultati ottenuti, mostrano che il gruppo KD presenta concentrazioni ematiche di corpi chetonici più elevate rispetto al gruppo modello e al gruppo di topi sani (figura 2B). Tale incremento è stato osservato fin dalle fasi iniziali dell'esperimento, confermando che la chetogenica ha effettivamente indotto uno stato di chetosi nutrizionale, determinando uno spostamento metabolico verso l'utilizzo di corpi chetonici come principale fonte energetica. Un parametro di particolare interesse è rappresentato inoltre dalle variazioni della glicemia nei diversi gruppi sperimentali nel corso dello studio. È stato osservato che, nella fase intermedia dell'esperimento, i livelli di glucosio ematico nel gruppo KD risultavano significativamente inferiori rispetto a quelli rilevati negli altri gruppi (rappresentato in figura 2C). Questo dato suggerisce che la dieta chetogenica sia in grado di modulare in maniera più efficace la glicemia, mantenendo i livelli di glucosio relativamente bassi e stabili. Infine, particolare rilevanza assumono i parametri correlati alla crescita tumorale. Sono state riscontrate differenze significative sia nel volume sia nel peso del tumore tra il gruppo KD e il gruppo modello (come

evidenziato in figura 2A). I risultati hanno evidenziato che nel gruppo KD, il tasso di inibizione tumorale ha raggiunto il 50,73%.

Complessivamente, questi dati confermano che la dieta chetogenica esercita un potente effetto inibitorio sulla crescita tumorale.

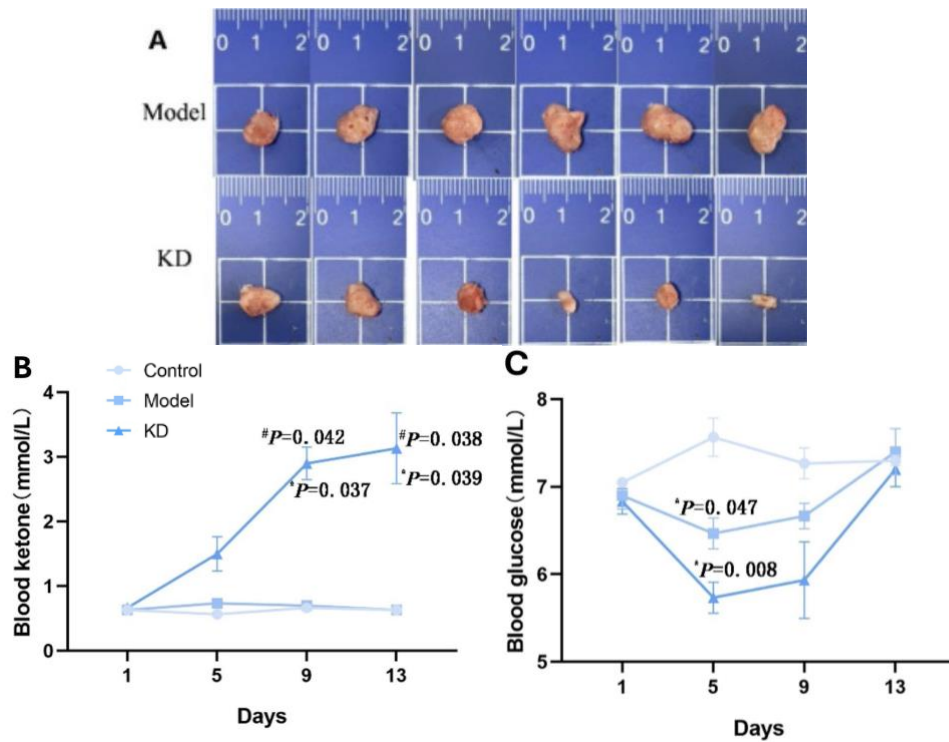


Fig 2: Da Luo et al.,2026. Monitoraggio degli effetti della KD sui topi durante il periodo sperimentale. A) Effetto inibitorio della KD sulla crescita tumorale nei topi. Differenze dimensionali dei tumori isolati dai topi KD e modello. B) Aumento dei corpi chetonici nel sangue dei topi a cui è stata somministrata la KD. C) Differenze di livelli di glicemia nei topi sperimentali.

3.2: Regolazione dell'asse AMPK-mTOR da parte della dieta chetogenica in vivo

Altre analisi effettuate si sono poste l'obiettivo di indagare i meccanismi molecolari e strutturali alla base degli effetti tissutali della dieta chetogenica, verificando se l'intervento dietetico fosse in grado di modulare la via di segnalazione cellulare dell'asse AMPK-mTOR. A tal scopo sono state utilizzate tre diverse tecniche sperimentali: la colorazione ematossilina ed eosina, impiegata per esaminare e confrontare i cambiamenti morfologici e l'organizzazione strutturale dei tessuti, l'analisi immunoistochimica, utile nel localizzare e quantificare la presenza e la distribuzione del contenuto proteico nei campioni (figura 3B), e infine l'analisi

Western Blot per misurare i livelli di attivazione ed espressione delle proteine chiave della via di segnalazione (AMPK ed mTOR).

La colorazione H&E ha evidenziato differenze morfologiche tra i tessuti dei topi appartenenti al gruppo KD e quelli del gruppo di controllo, verosimilmente associato alla modulazione della via di segnalazione AMPK-mTOR (come evidenziato in figura 3A e 3C). L'analisi Western Blot ha confermato che tale alterazione morfologica è associata a una precisa modulazione dell'asse AMPK-mTOR. Infatti, nei topi alimentati con dieta chetogenica è stato riscontrato un incremento significativo dell'attività di AMPK (l'aumento di p-AMPK è rappresentato in figura 4D) e, parallelamente, una riduzione dell'espressione di mTOR (quantificata in figura 4A). I risultati biochimici e strutturali dimostrano che la dieta chetogenica agisce *in vivo* come un efficace modulatore dell'asse AMPK-mTOR, promuovendo l'attivazione della via di AMPK e la down-regolazione della via di mTOR.

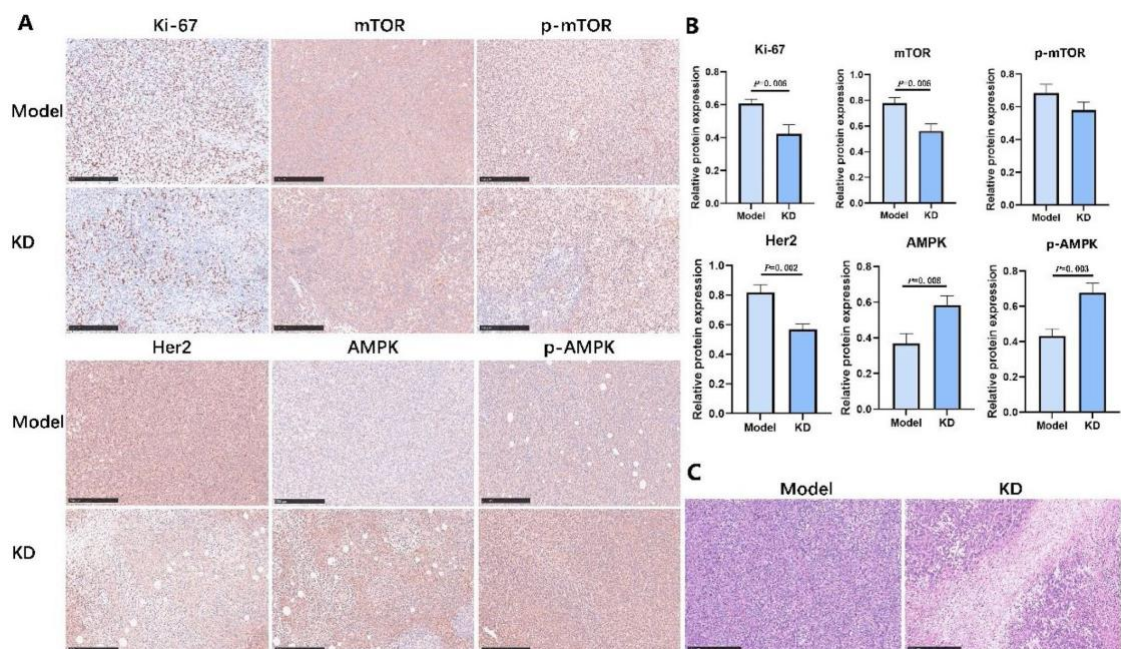


Fig 3: Da Luo et al.,2026. Effetti della dieta chetogenica sui tessuti tumorali del topo e sull'espressione proteica correlata. (B) Analisi di quantificazione dei risultati della colorazione immunoistochimica (Ki-67, mTOR, p-mTOR- HER2, AMPK, p-AMPK) su 6 campioni analizzati. (A e C) Colorazione con ematossilina ed eosina dei tessuti tumorali del topo.

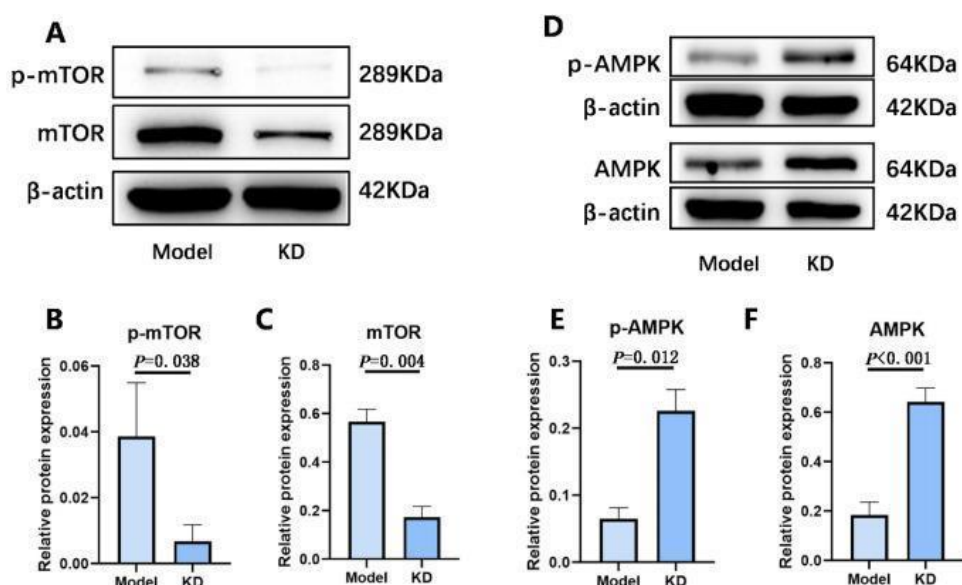


Fig 4: Da Luo et al., 2026. Effetti della dieta chetogenica sui livelli di espressione di mTOR e AMPK. (A-C). Livelli di espressione di mTOR nei tessuti tumorali dei topi. (D-F) Livelli di espressione di AMPK nei tessuti tumorali dei topi.

3.3: Effetti della restrizione di glucosio in vitro

3.3.1: Effetti sulla migrazione e proliferazione cellulare

In seguito, lo studio si è voluto concentrare sull'impatto della restrizione glucidica sulle cellule tumorali 4T1 *in vitro*, valutando come questo influenzi la loro capacità migratoria e il loro tasso di proliferazione. A tal scopo, sono stati impiegati due protocolli sperimentali: la valutazione della migrazione tramite il metodo "scratch assay" e la valutazione della proliferazione tramite il saggio CCK-8. Nel primo metodo è stata praticata una ferita sullo strato di cellule ed è stata monitorata e quantificata la loro capacità di muoversi e riempire l'area vuota. Nel saggio CCK-8 è stato eseguito un saggio di vitalità cellulare basato sui valori di assorbanza spettrofotometrica per valutare se le cellule effettivamente si muovessero oppure se si fossero moltiplicate. I risultati hanno evidenziato che le cellule 4T1 coltivate in terreni caratterizzati da basse concentrazioni di glucosio, mostravano una capacità migratoria significativamente inferiore rispetto a quelle mantenute in condizioni di maggiore disponibilità glucidica (evidenziato in figura 5A e 5B). L'analisi quantitativa ha pertanto confermato che la restrizione di glucosio inibisce in modo significativo la migrazione delle cellule 4T1. Nel saggio di vitalità cellulare CCK-8 invece, al diminuire della concentrazione di glucosio nel terreno di coltura, si è

osservata una progressiva riduzione dei valori di assorbanza, indicativa di una diminuzione della vitalità e della proliferazione cellulare (figura 5C). Questo dato conferma che condizioni di carenza glucidica esercitano un effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule 4T1.

Nel complesso, i risultati ottenuti dai due saggi dimostrano che la restrizione glucidica riduce la capacità di migrazione e proliferazione cellulare delle cellule 4T1.

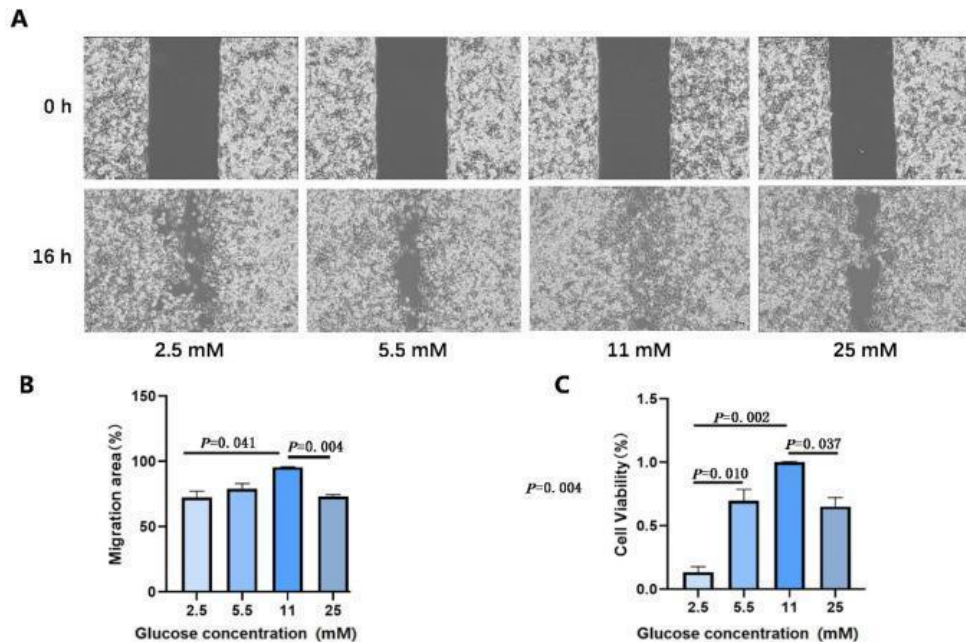


Fig 5: Da Luo et al., 2026. *Valutazione dell'influenza della deprivazione di glucosio sulla crescita e proliferazione delle cellule 4T1.* (A) Il test scratch assay è stato impiegato per valutare la capacità migratoria. (B) Analisi quantitativa della migrazione cellulare basata su risultati del test scratch assay. (C) Per indagare come varia la proliferazione cellulare in risposta alla restrizione di glucosio, è stato utilizzato il saggio CCK-8.

3.3.2: Effetti sui livelli intracellulari di ROS

Con l'obiettivo di determinare se la produzione di specie reattive dell'ossigeno all'interno delle cellule tumorali 4T1 fosse direttamente influenzata dalla restrizione di glucosio, i ricercatori hanno condotto ulteriori esperimenti. Questi erano volti inoltre, alla determinazione del rapporto di causalità tra carenza di glucosio e stress ossidativo generato. L'indagine sperimentale e la successiva validazione dei dati sono state condotte in due fasi: la misurazione dei ROS tramite la sonda DCFH-DA, e la validazione e il controllo tramite il trattamento con NAC. La misurazione dei ROS nelle cellule tumorali 4T1, è stata eseguita tramite la sonda fluorescente,

una molecola che emette segnali fluorescenti proporzionali alla quantità di ROS intracellulari. Questa ha evidenziato un aumento significativo dose-dipendente dei livelli di ROS in cellule coltivate in terreni con basse concentrazioni di glucosio. L'analisi quantitativa ha ulteriormente confermato le variazioni dei livelli di ROS in funzione del grado di restrizione glucidica. Per chiarire il rapporto tra produzione di ROS e riduzione di glucosio, sono stati condotti ulteriori esperimenti utilizzando l'N-acetilcisteina (NAC), con lo scopo di valutare se i risultati ottenuti dipendono effettivamente dai ROS. In questi ultimi esperimenti si sono notati notevoli riduzioni dei ROS con una riduzione dell'intensità della fluorescenza rispetto alle cellule non trattate con NAC (figura 6A e 6B). Questo conferma l'ipotesi iniziale, dimostrando che la restrizione di glucosio promuove in modo specifico la produzione di ROS e l'instaurarsi di uno stato di stress ossidativo nelle cellule 4T1.

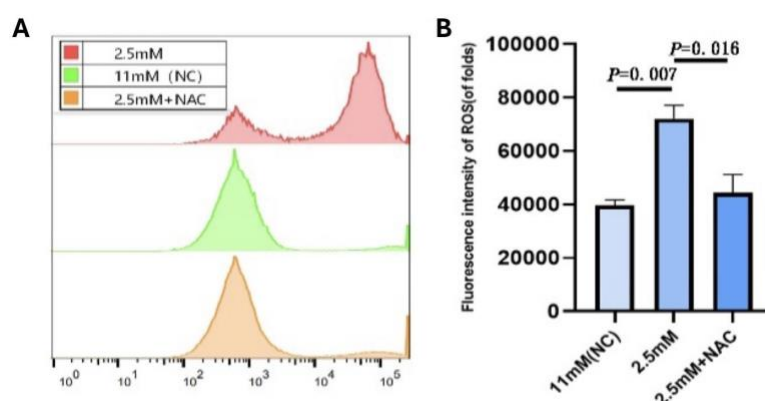


Fig 6: Da Luo et al., 2026. *Livelli di ROS nelle cellule 4T1 sottoposte a restrizione glucidica da sole o combinate con NAC.*

3.3.3: Effetti sui mediatori di attivazione di AMPK e regolazione di espressione di mTOR da parte di AMPK

Infine, lo studio si è concentrato sulle complesse interazioni molecolari che collegano la restrizione glucidica alla via di segnalazione intracellulare. In particolare, l'indagine mira a verificare se i ROS agiscano da mediatori dell'attivazione di AMPK, e in che modo l'asse AMPK-mTOR venga regolato in risposta allo stress ossidativo e allo stato energetico cellulare. Per mappare il meccanismo biochimico nelle cellule 4T1, è stata eseguita un'analisi Western Blot, con lo scopo di quantificare l'espressione e la fosforilazione delle proteine target (AMPK, p-AMPK e mTOR). Sono stati utilizzati quindi tre approcci sperimentali: la variazione del substrato glucidico, la modulazione dello stress ossidativo tramite

trattamento con NAC (per verificare il nesso tra i ROS, l'attivazione di AMPK e la soppressione di mTOR) e l'inibizione farmacologica di AMPK tramite trattamento con Compound C (per comprendere il rapporto tra AMPK e mTOR). L'analisi Western Blot ha confermato che la restrizione di glucosio aumenta l'espressione di AMPK e della forma fosforilata p-AMPK in modo dose-dipendente, con il massimo incremento registrato a una concentrazione di glucosio di 2,5 mM. Per chiarire il ruolo dei ROS, le cellule sono state trattate con NAC (suo potente inibitore), che ha annullato l'incremento dell'espressione di AMPK, confermato che i ROS sono mediatori dell'attivazione di AMPK in questo contesto (come evidenziato in figura 7).

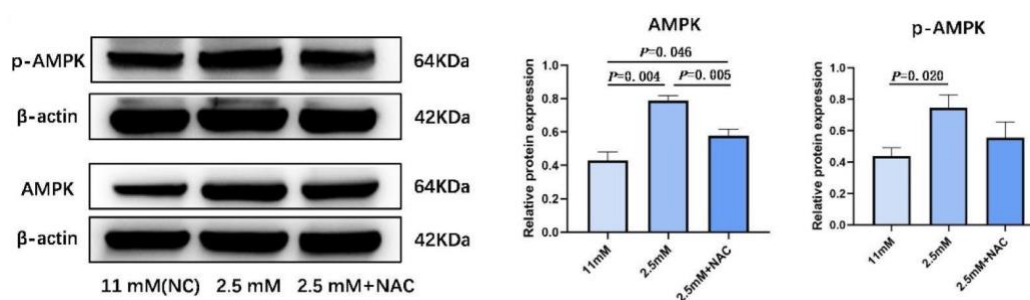


Fig 7: Da Luo et al., 2026. *Effetto della restrizione di glucosio sull'espressione di AMPK e p-AMPK nelle cellule 4T1. Rilevazione dei livelli di AMPK e p-AMPK nelle cellule 4T1 combinate con NAC e senza.*

Le cellule 4T1 esposte a differenti concentrazioni di glucosio, hanno mostrato una progressiva riduzione dell'espressione di mTOR al diminuire della disponibilità glucidica, suggerendo che la restrizione di glucosio eserciti un effetto soppressivo su questa via di segnalazione. Tale andamento è evidenziato dalla figura 8, che riporta i dati quantitativi nella barra dei risultati dell'analisi Western Blot, confermando quanto ipotizzato in precedenza. Ulteriori analisi hanno inoltre evidenziato che il trattamento con N-acetilcisteina (NAC) nel terreno di coltura, è in grado di invertire questa riduzione dell'espressione di mTOR. Questo risultato suggerisce il coinvolgimento dello stress ossidativo nel meccanismo di inibizione di mTOR indotto dalla restrizione glucidica, indicando che NAC, tramite la sua azione antiossidante, possa interferire con questo meccanismo bloccando la soppressione di mTOR.

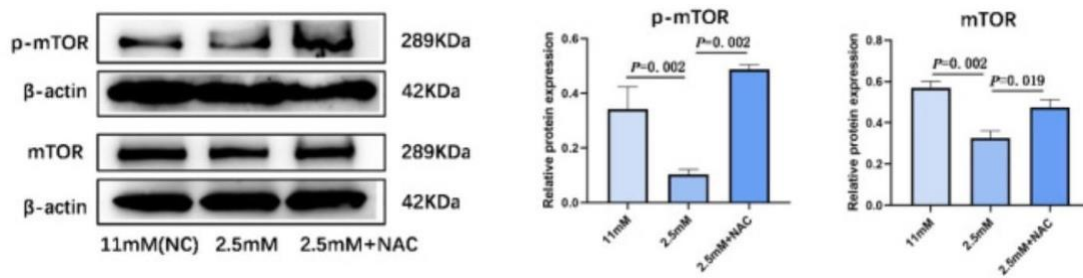


Fig 8: Da Luo et al., 2026. *Effetti della restrizione del glucosio nell'espressione di mTOR e p-mTOR nelle cellule 4T1. Alcune cellule 4T1 sono state incubate con l'aggiunta di NAC per indagare come vari l'espressione di mTOR.*

Infine, per indagare la relazione tra le vie di segnalazione AMPK e mTOR, le cellule 4T1 sono state trattate con un inibitore di AMPK, il Compound C (CC). L'analisi Western Blot ha evidenziato che il trattamento con CC riduce significativamente l'espressione di AMPK con una conseguente modulazione anche dell'espressione di mTOR (rappresentato in figura 9). In conclusione, si deduce che, essendo AMPK un sensore chiave dello stato energetico cellulare, la sua inibizione altera l'equilibrio dei segnali intracellulari, modificando l'espressione di mTOR nelle cellule 4T1.

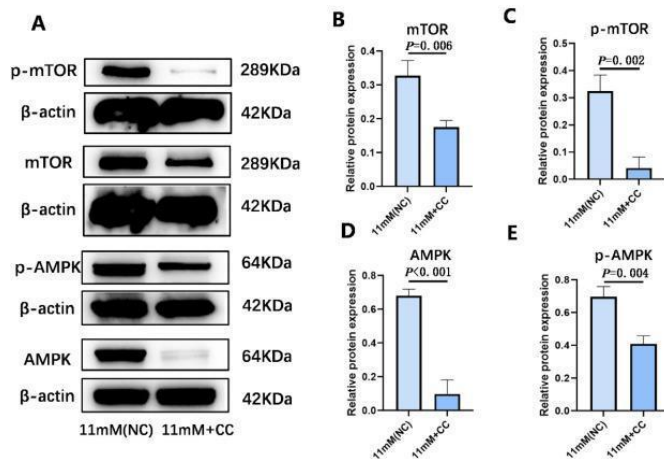


Fig 9: Da Luo et al., 2026. *Regolazione dell'espressione di mTOR da parte di AMPK in condizioni di restrizione glucidica. Le cellule 4T1 sono state coltivate nel terreno di coltura contenente 11 mM di glucosio e sono state trattate con l'inibitore di AMPK, il Compound C. Tramite analisi Western Blot sono stati ricavati i livelli di espressione di AMPK e mTOR.*

È interessante notare come i risultati in vitro siano coerenti con le variazioni osservate nell'espressione di AMPK e mTOR nel gruppo KD degli esperimenti in vivo.

Capitolo 4: Discussioni e conclusioni

Negli ultimi anni, i ricercatori si sono focalizzati su una possibile strategia in grado di migliorare la qualità della vita delle pazienti colpite dal tumore al seno. In particolare, numerosi studi hanno evidenziato l'importanza della nutrizione non solo nella prevenzione del rischio di sviluppare il tumore, ma anche come possibile supporto terapeutico nei pazienti oncologici. In particolare, la scoperta dell'effetto Warburg e delle caratteristiche metaboliche tipiche delle cellule tumorali, hanno portato a ipotizzare un possibile impiego della dieta chetogenica come strategia adiuvante nel trattamento del carcinoma mammario. Diversi studi condotti su modelli murini, hanno infatti confermato il ruolo del glucosio nel promuovere l'insorgenza e la progressione tumorale. Altri studi hanno dimostrato che la restrizione glucidica può aumentare l'efficacia di alcuni farmaci antitumorali attraverso meccanismi mediati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e della proteina chinasi attivata da AMP (AMPK). La dieta chetogenica, oltre a ridurre la disponibilità di glucosio, induce ulteriori cambiamenti metabolici che potrebbero contribuire ai suoi effetti antitumorali. Per verificare tali ipotesi, gli autori dello studio hanno sviluppato dei modelli animali inoculando loro le cellule tumorali 4T1. I risultati hanno mostrato che i topi sottoposti a dieta chetogenica presentavano una significativa riduzione della crescita tumorale rispetto ai topi alimentati con una dieta classica. Inoltre, le analisi effettuate *in vivo* hanno evidenziato una marcata riduzione dell'espressione di mTOR nei tessuti tumorali, accompagnata dall'incremento dell'espressione di AMPK.

Negli esperimenti *in vitro* invece, sono state utilizzate le cellule murine di carcinoma mammario 4T1, coltivate in terreni di coltura contenenti diverse concentrazioni di glucosio e successivamente sottoposte ad analisi. I risultati hanno evidenziato una marcata riduzione della capacità proliferativa delle cellule tumorali, in modo dipendente dalla concentrazione di glucosio. In seguito gli autori hanno osservato che la restrizione glucidica determinava un aumento dei livelli intracellulari di ROS. L'accumulo eccessivo dei ROS è stato associato ad un incremento dello stress ossidativo con conseguente attivazione dell'apoptosi cellulare. Tale osservazione è stata confermata dagli esperimenti condotti *in vitro*, nei quali la restrizione di glucosio ha determinato un aumento significativo del tasso di apoptosi nelle cellule 4T1. L'incremento dei livelli intracellulari di ROS,

ha inoltre promosso l'attivazione di AMPK, una proteina che agisce come sensore dello stato energetico cellulare. Questo meccanismo è stato confermato tramite l'impiego di N-acetilcisteina (NAC), un inibitore dell'attività di ROS, che ha determinato una riduzione dell'attivazione di AMPK, supportando l'esistenza di un legame funzionale tra ROS e AMPK. A sua volta, AMPK esercita effetti inibitori sulla via di segnalazione mTOR, sopprimendo così la proliferazione delle cellule tumorali. Infatti, gli esperimenti *in vitro* confermano ulteriormente tali affermazioni, in quanto l'espressione di AMPK era notevolmente aumentata, mentre quella di mTOR risultava significativamente ridotta nelle cellule 4T1 coltivate in terreni con restrizione glucidica. Questi risultati sono coerenti con i dati ottenuti negli esperimenti *in vivo*.

Nel complesso, le evidenze raccolte suggeriscono un nuovo meccanismo attraverso il quale la restrizione del glucosio esercita i propri effetti sul carcinoma mammario. In particolare, la carenza glucidica modula l'espressione della via di segnalazione AMPK/mTOR, inducendo un aumento dei livelli intracellulari di ROS. L'attivazione di questa cascata molecolare contribuisce a ridurre la crescita e la proliferazione delle cellule tumorali e a promuoverne l'apoptosi, evidenziando il potenziale ruolo della dieta chetogenica come strategia terapeutica adiuvante nel trattamento del carcinoma mammario.

Per quanto riguarda i limiti dello studio, gli autori evidenziano che, nonostante i risultati supportino l'ipotesi secondo cui la restrizione glucidica determini un aumento dei livelli di ROS, con conseguente attivazione di AMPK e inibizione di mTOR, sono necessari ulteriori esperimenti per garantire in modo definitivo il rapporto di causalità tra questi eventi. A tal scopo, sarebbero utili studi basati su manipolazioni specifiche delle vie di segnalazione coinvolte, come il knockout genetico o la sovraespressione di AMPK/mTOR. Un ulteriore limite riguarda l'utilizzo della restrizione di glucosio *in vitro* come modello sperimentale della dieta chetogenica. Tale approccio, infatti, non riproduce completamente il complesso ambiente metabolico presente *in vivo*, in quanto non tiene conto dell'aumento dei corpi chetonici circolanti e dei loro effetti biologici. Tra questi rientrano la modulazione della regolazione epigenetica, dei processi infiammatori e della funzione mitocondriale. Un'altra criticità presentata dagli autori rappresenta l'applicazione della dieta chetogenica (KD), che nell'uomo potrebbe essere limitata

dalla difficoltà nel mantenere una buona aderenza al regime alimentare da parte del paziente, dall'eterogeneità metabolica interindividuale, e da possibili effetti collaterali a lungo termine (Luo et al., 2026). Uno studio recente condotto da Gallop et al., ha evidenziato come gli effetti della KD nel lungo periodo possano essere contrastati. Da un lato, essa favorisce la perdita di peso e limita l'incremento ponderale; dall'altro, può determinare importanti alterazioni metaboliche, tra cui iperlipidemia, steatosi e disfunzione epatica, nonché una marcata intolleranza al glucosio. Gli autori suggeriscono che quest'ultima non sia riconducibile a una situazione di insulino-resistenza, bensì a una ridotta secrezione di insulina da parte delle cellule β pancreatiche. In particolare, le analisi molecolari hanno evidenziato segni di stress del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi, accompagnati da alterazioni del trasporto intracellulare delle proteine e dei granuli contenenti insulina. Tali modificazioni compromettono il corretto rilascio dell'ormone, contribuendo allo sviluppo dell'intolleranza al glucosio osservata nei modelli animali sottoposti a una dieta chetogenica per periodi prolungati (Gallop et al., 2025).

Alla luce di tali considerazioni, saranno necessari ulteriori studi clinici per valutare la sicurezza, la fattibilità e l'efficacia della dieta chetogenica come terapia adiuvante nel trattamento oncologico.

Un ulteriore limite dello studio riguarda l'elevata eterogeneità metabolica che caratterizza sia i diversi tipi di tumore, sia il microambiente all'interno di uno stesso tumore. In particolare, è possibile osservare notevoli differenze nell'equilibrio tra glicolisi aerobica e fosforilazione ossidativa. Infatti, la differente attivazione di oncogeni quali RAS, AKT e c-MYC può determinare una sovraespressione di geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa oppure, al contrario, di geni associati alla glicolisi aerobica. Tali differenze possono conferire alle cellule tumorali flessibilità metabolica, ovvero la capacità di adattare le proprie vie bioenergetiche in base alla disponibilità di nutrienti. Inoltre, in condizioni di ipossia, tipica dei tessuti tumorali a causa di una vascolarizzazione anomala, le cellule tendono ad utilizzare maggiormente la glicolisi aerobica per la produzione di ATP, in accordo con quanto descritto nell'effetto Warburg. Tuttavia, lo studio di Le et al., ha evidenziato che parte delle cellule tumorali è in grado di mantenere attiva la fosforilazione ossidativa e di esprimere geni associati alla funzione mitocondriale anche in

condizioni di ridotta disponibilità di ossigeno. Nel complesso, tali evidenze suggeriscono che la crescita tumorale non dipenda esclusivamente dalla glicolisi aerobica, come proposto dall'effetto Warburg, ma possa essere sostenuta anche da altre vie metaboliche. Di conseguenza, le strategie terapeutiche o nutrizionali volte a limitare la disponibilità di glucosio, potrebbero non risultare efficaci in tutti i contesti, perché alcune cellule tumorali sono in grado di adattarsi metabolicamente e di continuare a proliferare sfruttando altre vie metaboliche (Bose et al., 2021). Infatti, un aspetto critico da considerare nell'impiego della dieta chetogenica in ambito oncologico, riguarda la capacità di alcune cellule tumorali di utilizzare i corpi chetonici come fonte energetica alternativa. Sebbene la riduzione della disponibilità di glucosio possa ostacolare la crescita di molti tumori, diversi studi hanno dimostrato che alcune neoplasie possiedono una notevole flessibilità metabolica e sono in grado di ossidare il β -idrossibutirrato e l'acetoacetato per sostenere il proprio fabbisogno energetico. Inoltre, secondo il modello "Reverse Warburg Effect", le cellule tumorali possono indurre le cellule circostanti, in particolare i fibroblasti associati al tumore, a produrre corpi chetonici che vengono successivamente utilizzati dalle stesse cellule neoplastiche come substrato energetico. In questo contesto, i corpi chetonici non eserciterebbero un effetto antitumorale, ma potrebbero contribuire al mantenimento del metabolismo e della sopravvivenza delle cellule neoplastiche. Tali osservazioni evidenziano come gli effetti della chetosi sul tumore siano fortemente dipendenti dal tipo di neoplasia e dalle sue caratteristiche metaboliche (Puchalska et al., 2017).

Uno studio condotto da Lien et al., ha confrontato gli effetti di due strategie dietetiche differenti: la restrizione calorica (CR) e la dieta chetogenica (KD), sulla crescita tumorale. Sebbene entrambe determinassero una riduzione dei livelli ematici di glucosio e insulina, soltanto la restrizione calorica si è dimostrata efficace nel rallentare la crescita tumorale nei modelli di murini analizzati. Gli autori hanno attribuito tale differenza principalmente alle variazioni della disponibilità lipidica per le cellule tumorali. Infatti, oltre alla riduzione di glucosio, la restrizione calorica comporta anche una diminuzione dei livelli di lipidi nel plasma e nel tessuto tumorale. In queste condizioni le cellule neoplastiche tentano di compensare la carenza lipidica producendo autonomamente alcuni grassi essenziali tramite l'enzima SCD (stearoil-CoA desaturasi). Tuttavia, la restrizione calorica riduce

anche l'attività di questo enzima, determinando uno squilibrio tra acidi grassi saturi e insaturi, che contribuisce al rallentamento della crescita tumorale. Anche la dieta chetogenica riduce l'attività dell'enzima SCD, tuttavia, l'elevata disponibilità di lipidi derivante dall'alimentazione, consente alle cellule tumorali di mantenere un adeguato equilibrio tra acidi grassi saturi e insaturi, limitando così gli effetti sulla crescita del tumore (Lien et al., 2021). In conclusione, questi risultati evidenziano come la risposta agli interventi dietetici sia fortemente influenzata dalle caratteristiche metaboliche del tumore. Considerata l'elevata eterogeneità metabolica tipica delle neoplasie, la dieta chetogenica potrebbe rappresentare un utile approccio complementare alle terapie convenzionali, contribuendo, in determinati contesti, a migliorare la gestione della malattia e degli effetti collaterali associati ai trattamenti oncologici. Tuttavia, i meccanismi attraverso cui essa esercita i propri effetti non sono ancora completamente chiariti e l'efficacia clinica potrebbe variare in funzione delle specifiche caratteristiche biologiche e metaboliche del tumore.

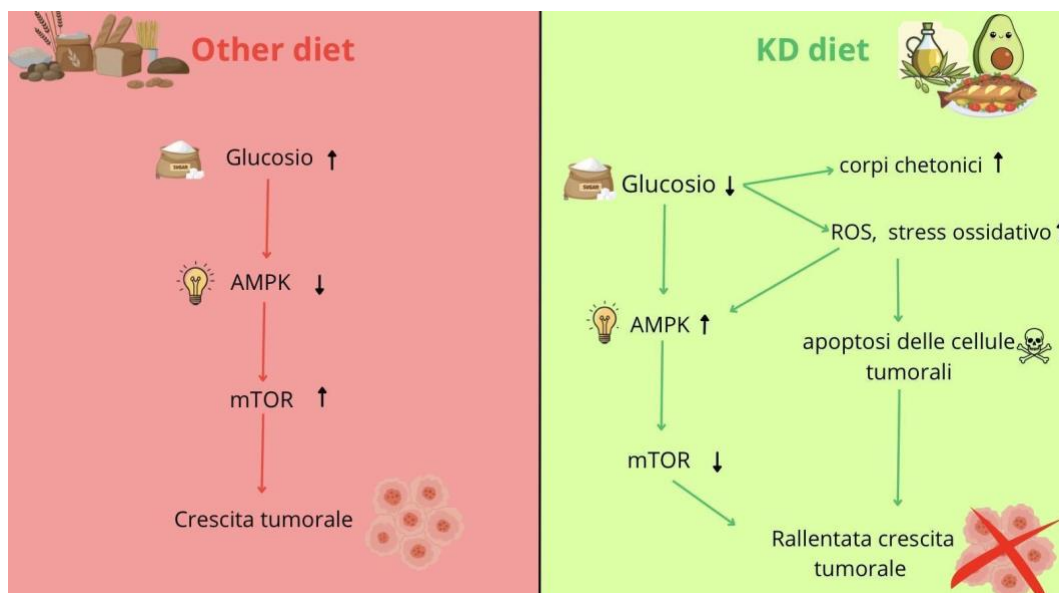


Immagine creata con Canva: riassunto schematico che integra i risultati dello studio in esame riguardo la differenza tra la dieta chetogenica e le diete classiche sulla crescita tumorale.

Capitolo 5: Bibliografia

Luo, Y. (2026). Ketogenic diet modulates AMPK-mTOR pathway in breast cancer. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Article 110312. doi:10.1016/j.jnutbio.2026.110312

Mubin, N. (2026). Multidimensional tumor heterogeneity and its role in therapeutic resistance. *Frontiers in Immunology*, Article 1794130. doi:10.3389/fimmu.2026.1794130

Harbeck, N. (2019). Breast Cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, Article 66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2

Lukasiewicz, S. (2021). Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classifications, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancer*, Article 4287. doi:10.3390/cancers13174287

Bose, S. (2021). Glucose Metabolism in cancer: The Warburg Effect and Beyond. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1311, 3-15. doi:10.1007/978-3-030-65768-0_1

Dynka, D. (2025). Ketogenic Diets for Body Weight Loss: A Comparison with Other Diets. *Nutrients*, Article 965. doi:10.3390/nu17060965

Puchalska, P. (2017). Multi-dimensional Role of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics. *Cell Metabolism*, 25(2), 262-284. doi:10.1016/j.cmet.2016.12.022

Emerling, B. M. (2009). Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMPK/ATP ratio. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(10), 1386-1391. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.019

Ke, R. (2018). Mechanisms of AMPK in maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell Biology International*, 42(4), 384-392. doi:10.1002/cbin.10915

Phillips, R. (2026). Nutrition, Cell Signalling, Mitochondrial Function and Chronic Non-Communicable Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 27(7), Article 3303. doi:10.3390/ijms27073303

Gallop, M. R. (2025). A long- term ketogenic diet causes hyperlipidemia, liver dysfunction, and glucose intolerance from impaired insulin secretion in mice. *Science Advances*, 11(38). doi:10.1126/sciadv.adx2752

Lien, E. C. (2021). Low glycaemic diets alter lipid metabolism to influence tumor growth. *Nature*, 599, 302-307. doi:10.1038/s41586-021-04049-2.

RESEARCH PAPER

Ketogenic diet modulates AMPK-mTOR pathway in breast cancer

Yaxin Luo^{a, #}, Junjun Li^{a, #}, Yuxin Yang^b, Lei Yan^c, Ziyang Huang^b, Lixia Chen^c, Lili Zhao^c, Jing Wang^c, Yongming Yang^c, Xianping Liu^{c, *}, Xihua Yang^{a, c, *}

^a Cancer Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi, China

^b Shanxi Medical University School of Public Health, Taiyuan, Shanxi, China

^c Laboratory Animal Center, Shanxi Province Cancer Hospital, Taiyuan, Shanxi, China

Received 16 June 2025; received in revised form 6 February 2026; accepted 10 February 2026

Abstract

Breast cancer (BC) is one of the most prevalent malignant tumors among women globally. This disease is modulated by the interaction of multiple complex factors and exhibits a high mortality rate, posing a severe threat to women's lives and health. The ketogenic diet (KD), a dietary regimen characterized by high fat and low carbohydrate content, has emerged as a potential adjuvant therapeutic strategy for BC; however, its mechanistic roles in regulating tumor metabolism remain not fully elucidated. In the present study, the underlying mechanism of KD in the context of BC were investigated in depth. In 4T1 mammary tumor-bearing mice, KD suppressed tumor growth by 50.73% ($P < .01$) and activated the AMPK-mTOR axis, as evidenced by a 2.1-fold increase in AMPK phosphorylation and a reduction in mTOR activity. At the cellular level, Glucose restriction regulated mTOR expression at the cellular level by upregulating intracellular reactive oxygen species (ROS) in 4T1 cells and activating AMPK. Combining results at the animal and cellular levels, KD may induce alternations in intracellular ROS levels by restricting glucose uptake, thereby modulating the expression of the AMPK-mTOR pathway and ultimately inhibiting tumor growth. Collectively, our results demonstrate that KD exerts anti-tumor effects via ROS-mediated regulation of the AMPK/mTOR signaling pathway, supporting its potential as a metabolic intervention strategy for BC.

© 2026 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Keywords: Breast cancer; Ketogenic diet; Glucose restriction; AMPK-mTOR pathway; Reactive oxygen species.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer among women [1]. The more aggressive triple-negative breast cancer (TNBC), a subtype lacking the expression of estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor-2, has a 5-year survival rate of only 12% [2]. TNBC is a prevalent form of BC in women. Chemotherapy is one of the most widely used treatment modalities in oncology clinics [3]. Despite advances in surgery, chemotherapy, targeted therapy, and immunotherapy, the prognosis of many BC patients remains poor [4], primarily due to the significant side effects and poor tolerance of current therapeutic regimens. Researchers at home and abroad are exploring postoperative treatment strategies for BC to improve the postoperative quality of life of patients.

Epidemiological evidence indicates that diet not only influences cancer risk but also exerts a significant impact on treatment outcomes [5]. Most notably, Warburg first described the association between carbohydrates and cancer in 1923, when he reported a marked increase in glucose consumption by tumor cells [6,7]. This phenomenon is referred to as the Warburg effect. In recent years, a low-glucose ketogenic diet (KD) has also been shown to reverse redox signaling pathways that promote tumor malignancy [8,9]; when used as an adjuvant therapy for gliomas, it can alter transgene expression patterns and reduce reactive oxygen species (ROS) levels [10]. Hopkins et al. [11] also demonstrated that combined KD administration improves survival in mice bearing various PI3K-driven tumors. In most preclinical tumor models, KD has been proven to inhibit glycolysis and cancer cell proliferation [12]. Given that cancer cells exhibit dysregulated glucose metabolism, resulting in higher glucose uptake in tumors compared to adjacent normal tissues [13], KD may serve as a diet-based postoperative adjuvant strategy for cancer treatment.

Glucose starvation is one of the major forms of metabolic stress in tumor cells [14]. Glucose deprivation impairs glycolysis and the pentose phosphate pathway [14], and increases ROS production, thereby inducing oxidative stress and subsequent cell death. ROS are a group of diverse molecular oxygen derivatives generated dur-

* Corresponding authors at: Xianping Liu and Xihua Yang, Laboratory Animal Center, Shanxi Province Cancer Hospital, No. 3 Zhigongxincun, Xinghualing District, Taiyuan, Shanxi 030013, China.

E-mail addresses: 53601643@qq.com (X. Liu), yangxihua@126.com (X. Yang).

These authors contributed equally to this work.

ing normal aerobic metabolism [15]. Under glucose-limiting conditions, ROS are regarded as positive regulators of AMPK [15]. A reduction in cellular energy status, along with elevated ADP/ATP and AMP/ATP ratios, activates AMP-activated protein kinase (AMPK) [16]—a key regulator of cellular metabolic homeostasis [17,18]. AMPK is also capable of inhibiting the mTOR pathway [19,20], particularly under energy-deficient conditions. Although previous studies have demonstrated that KD or glucose restriction can modulate ROS levels and activate AMPK in various cancer types, including TNBC [21], the precise molecular crosstalk between KD-induced ROS generation and the AMPK-mTOR signaling pathway in 4T1 breast tumors has not been directly elucidated.

The potential of KD as a complementary strategy for cancer therapy has been highlighted by several preclinical and clinical studies [22]. By inducing a metabolic state characterized by ketosis, this dietary regimen creates an unfavorable metabolic microenvironment for cancer cells, which may impede their growth and proliferation; however, its underlying mechanism of action in 4T1 BC remains unclear. In the present study, we investigated whether the KD exerts tumor-suppressive effects on 4T1 tumor-bearing mice *in vivo* via the ROS-AMPK-mTOR pathway and whether glucose restriction regulates mTOR expression in 4T1 cells *in vitro* through the ROS-AMPK pathway. Notably, our study suggests potential links between KD-induced ROS accumulation, AMPK activation, and mTOR inhibition, complementing previous studies focused solely on metabolic stress or AMPK activation in tumor suppression.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and glucose restriction conditions

The 4T1 cell line is a TNBC cell line that exhibits growth and metastasis in BALB/C mice, serving as an animal model for stage IV human BC. 4T1 cells were kindly provided by Prof. Zhang Ruiping (Shanxi Provincial People's Hospital) cultured in RPMI-1640 medium (Procell Life Technologies Ltd., Wuhan, China; Cat. No. PM150110) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco Life Technologies, NY, USA; Cat. No. A5256701) and 1% penicillin-streptomycin solution (Procell; Cat. No. P1400). Cultures were maintained in a humidified incubator (Thermo Fisher Scientific, Germany) at 37°C with 5% CO₂. To establish an *in vitro* model of metabolic stress induced by glucose restriction, glucose-restricted culture conditions were set up as previously described [23]. Briefly, glucose-free RPMI-1640 medium (Procell Life Technologies Ltd., Wuhan, China; No. PM150122) was supplemented with a glucose solution (Procell; Cat. No. PB180418) to achieve final glucose concentrations of 2.5, 5.5, 11, and 25 mM, where 11 mM serving as the normal glucose control. The cells were subsequently subjected to Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assays, wound-healing (scratch) assays, WB analysis, and intracellular ROS measurement via a DCFH-DA-based fluorescence assay were performed to explore the mechanisms underlying glucose restriction-mediated inhibition of BC cell growth. To further verify the involvement of ROS and AMPK signaling pathways, N-acetyl-L-cysteine (NAC; Med Chem Express, NJ, USA; Cat. No. HY-B0215) and Compound C (CC; Med Chem Express, NJ, USA; Cat. No. HY-13418) were used in selected experiments.

2.2. Animal model and KD intervention

This study was approved by the Ethical Review Committee for Experimental Animals of Shanxi Cancer Hospital (IACUC No. 2023034), and all experimental procedures were performed in accordance with the Guidelines for Ethical Review of Laboratory Animal

Table 1
Feed table

Type of feed	Fat(%)	Carbohydrates(%)	Protein(%)
General feed	12.1	65.4	22.5
Ketogenic feed	90.5	0.3	9.2

Table 2
Detailed ketogenic diet composition

Ingredient	Content (g/kg)
Casein	173.3
DL-methionine	2.6
Hydrogenated vegetable shortening	586.4
Corn oil	86.2
Cellulose	87.97
Mineral mixture, calcium-deficient	20.0
Dicalcium phosphate	19.3
Calcium carbonate	8.2
Magnesium oxide	0.4
Vitamin blend	13.0
Choline bitartrate	2.5
Antioxidant ethoxyquin	0.13

imals (GBT 35892-2018). A total of 24 female BALB/c mice were randomly divided into three groups with 8 mice per group: blank control group, model group, and KD group. The mice were provided by Vitality River Laboratory Animal Science and Technology Co. Ltd. (Beijing, China), with an Animal Production License No. SCXK (Beijing) 2016-0006. All mice were housed in a Specific Pathogen-Free (SPF)-grade laboratory at the Laboratory Animal Center of Shanxi Provincial Cancer Hospital, under an Animal Use License No. SYXK (Jin) 2022-0003. Except for the blank control group, mice in the model group and KD group were inoculated with 4T1 cells at the left second nipple pad, with 2×10^5 cells administered per mouse. Mice in the blank control group and model group were fed a normal diet, while those in the KD group were fed a KD. Detailed information on the feeding schedule is presented in Table 1. The ketogenic diet formulation used in this study (fat: protein: carbohydrate≈90:9:1) was adapted from a classic formula validated in cancer models [24]. This ratio reliably induces and sustains nutritional ketosis in mice, provides sufficient essential protein to prevent muscle wasting, and recapitulates the metabolic and antitumor effects of KD across multiple cancer types [25]. We adopted this standardized formulation to ensure experimental comparability and reproducibility. Complete details of the KD composition, including the source and dosage (g/kg) of each ingredient, are provided in Table 2. The ketogenic feed was purchased from Beijing Xiaoshu Youtai Biotechnology Co., Ltd. The number of experimental animals was minimized while ensuring statistical significance, and animal welfare was prioritized throughout the study to reduce discomfort. The experiment was terminated when the tumor diameter of any mouse reached 1.5 cm.

2.3. Western blot analysis

Proteins were extracted using RIPA lysis buffer (Wuhan Safeway Biotechnology Co., Ltd.) supplemented with protease and phosphatase inhibitor PMSF (Beijing Ranjack Technology Co., Ltd.). The protein concentration was determined via a BCA protein assay kit (Shanghai Yas Biotechnology Co., Ltd.). Protein samples were separated by 10% and 6% SDS-PAGE gels (Shanghai Abilify Biomedical Technology Co., Ltd.) and then transferred onto PVDF membranes. The membranes were blocked with 5% skim milk (Servicebio Tech-

nology Co., Ltd., Wuhan, China) for 1 h at room temperature, followed by incubation with primary antibodies at 4°C overnight. After three washes with TBST buffer, the membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. The primary antibodies used were as follows: anti-AMPK (1:1,000, Proteintech Group, Wuhan, China), anti-AMPK α 1 (1:1,000, Bioss, Beijing, China), anti-mTOR (1:5,000, Proteintech Group, Wuhan, China), and anti-p-mTOR (1:2,000, Proteintech Group, Wuhan, China). The secondary antibodies included HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5,000, Jackson, USA) and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:5,000, Proteintech Group, Wuhan, China).

2.4. Wound healing (scratch) assay

μ -Dish 2-well culture inserts (Ibidi GmbH, Germany; Cat. No. 80209), with an insert gap width of 500 μ m, were presterilized and mounted in 6-well plates (Corning, USA). 4T1 cells were cultured to 80% confluence in complete RPMI 1,640 medium (supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin; Jiangsu Key-GEN Bio TECH Corp., Ltd.) and then digested with 0.25% trypsin-EDTA (Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd.). The cell density was adjusted to 5×10^5 cells/mL, and 70 μ L of the cell suspension (approximately 3.5×10^4 cells per well) was carefully seeded into each insert well to ensure uniform coverage. The plates were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h until a fully confluent (100%) cell monolayer was formed. Subsequently, the inserts were gently removed with sterile forceps to create two parallel cell-free gaps per well. The wells were slowly rinsed once with PBS to remove cell debris, and then experimental media with different glucose concentrations were added: normal control group (11 mmol/L glucose) and experimental groups (2.5, 5.5, and 25 mmol/L glucose). Images were captured using an inverted digital biomicroscope (Leica Microsystems Technology (Suzhou) Co., Ltd.) at 4-h intervals over a 24-h period with the same field of view maintained throughout the observation. Cell migration was finally quantified using ImageJ 1.8.0–345 software. A CCK-8 assay was ultimately included to confirm that the detected results were specific to cell migration.

2.5. Cell viability assay (CCK-8)

4T1 cells in the logarithmic growth phase were harvested by digestion with 0.25% trypsin-EDTA (Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd.), and CCK-8 were performed using 96-well plates. Briefly, 2×10^3 cells (100 μ L per well) were seeded into each well of the 96-well plate and incubated to allow cell adhesion. After complete adhesion, the culture medium was replaced with media containing different glucose concentrations: normal control group (11 mmol/L glucose) and experimental groups (2.5, 5.5 and 25 mmol/L glucose). Following 24 h of incubation at 37°C with 5% CO₂, 10 μ L of CCK-8 solution was added to each well, and the plate was further incubated in a cell culture incubator for 1 h. At the end of the incubation period, the absorbance (OD value) of each well was measured at a wavelength of 450 nm using a microplate reader.

2.6. Intracellular ROS measurement

DCFH-DA (Beo Tianmei Biotechnology Co., Ltd.) was diluted to the working concentration with serum-free medium (Wuhan Punosai Life Sciences Co., Ltd.) at a ratio of 1:1,000. 4T1 cells were harvested from culture dishes and incubated with the diluted DCFH-DA solution at 37°C for 20 min in the dark. After incubation, the cells were washed three times with serum-free medium

and an additional two times with phosphate-buffered saline (PBS) to remove residual DCFH-DA. Subsequently, the cells were resuspended in 1 mL of PBS to a final density of 2×10^7 cells/mL and analyzed using a flow cytometry (Becton Dickinson and Company). Flow cytometric data were processed and analyzed with Flow Jo software.

2.7. Histology and immunohistochemistry

Tumor tissues were fixed in 4% paraformaldehyde fixative (Beijing Labgic Technology Co., Ltd) at room temperature for 24 h, followed by conventional paraffin embedding to prepare formalin-fixed paraffin-embedded tissue blocks. Serial sections (5 μ m thick) were cut from the FFPE blocks for subsequent histological and immunohistochemical (IHC) staining. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed to observe the histological morphology of tumor tissues. For IHC staining, sections were incubated with primary antibodies against Ki-67, AMPK, phosphorylated (p)-AMPK, mTOR, phosphorylated (p)-mTOR, and HER2, followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies. Stained sections were observed under a light microscope, and the staining results were quantified and analyzed using ImageJ 1.8.0–345 software.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 and SPSS (version 19.0). All data are presented as the means $\pm$ standard deviations (SD). For comparisons among multiple groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was employed, followed by Dunnett's posthoc test to compare each experimental group with the control group. For comparisons between two groups, Student's *t*-test was used. A *P* Value $< .05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effects of a KD on basal physiological indices in mice and tumor growth in mice

To evaluate the effects of a KD on mice, several key physiological indicators were systematically monitored and analyzed throughout the experiment. The body weights of mice in the KD group and model group were continuously tracked and recorded, and the both groups exhibited consistent weight change trends (Fig. 1E). No significant difference in body weight was observed between the two groups at any time point.

Blood ketone level is a key indicator reflecting the efficacy of KD intervention. The KD group showed elevated blood ketone levels from the early stage of the experiment (Fig. 1A), which were significantly different from those in the other two groups ($P < .05$). These findings confirmed that KD successfully induced substantial ketone body production in mice of the KD group, shifting their metabolic pattern to a state dominated by ketone body-dependent energy supply.

Fluctuations in random blood glucose levels were also closely monitored. During the middle stage of the experiment, the random blood glucose level in the KD group was lower than that in the other two groups (Fig. 1B); notably, the control group had significantly higher blood glucose levels than the KD and model groups on day 5. This phenomenon indicates that KD can effectively regulate mouse blood glucose level, maintaining them at a relatively low and stable state during the middle experiment phase. It also reflects the differential effects of distinct dietary patterns and experimental processes on the glucose regulatory mechanisms of mice.

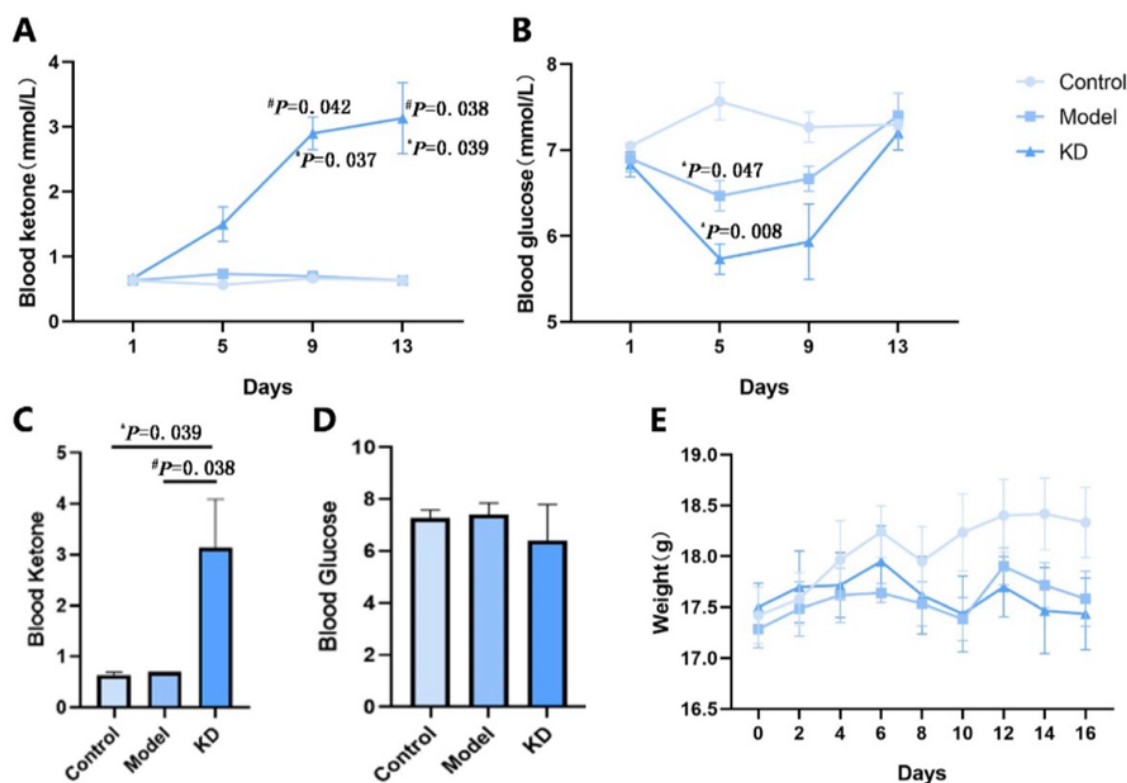


Fig. 1. Monitoring the effects of KD on mice during the experimental period. (A–B) Dynamic changes in blood glucose and blood ketone levels detected at different time points in mice; (C) Quantification analysis of blood ketone levels in mice; (D) Quantification analysis of blood glucose levels in mice; (E) Dynamic Changes in body weight of mice; (* $P < 0.05$ vs. control group; # $P < 0.05$ vs. model group).

The detection of tumor-related indicators was a core focus of this study. Compared with the model group ($n = 6$), the tumor volume and weight in the KD group ($n = 6$) were significantly reduced (Fig. 2A–C). After rigorous data analysis, the tumor inhibition rate of KD was calculated using the following formula: Tumor inhibition rate = $(1 - \text{Tumor weight of the treatment group} / \text{Tumor weight of the control group}) \times 100\%$. The results showed that the tumor inhibition rate of KD reached 50.73%, which strongly confirms that KD exerts a potent inhibitory effect on tumor growth.

3.2. Role of glucose restriction in the migration and proliferation of 4T1 cells

To investigate the effects of glucose concentration changes on the migration and proliferation capacities of 4T1 cells, cells were cultured in media supplemented with different glucose concentrations (2.5, 5.5, 11 and 25 mM) for 24 h [23]. For the detection of cell migration capacity, a scratch assay was performed, and the migration ability was quantitatively evaluated by observing the extent of cell migration to fill the scratched area. The results showed that the cell migration extent in media with lower glucose concentrations was significantly lower than that in media with higher glucose concentrations (Fig. 3A and B). Quantitative analysis of cell migration in the scratched area among different concentration groups revealed a trend of weakened migration with decreasing glucose concentrations, indicating that low glucose concentrations significantly inhibited 4T1 cell migration.

For the detection of cell proliferation capacity, the CCK-8 assay was employed, which can accurately reflect cellular proliferation activity. As the glucose concentration in the medium decreased from 11 mM to 2.5 mM, the absorbance values of cells in each cor-

responding concentration group tended to decrease (Fig. 3C). This finding indicates that glucose-limited media also significantly inhibited 4T1 cell proliferation. Collectively, the results of both the scratch assay and CCK-8 assay demonstrated that glucose restriction can reduce the migration and proliferation capacities of 4T1 cells.

3.3. Glucose restriction and intracellular ROS levels and mechanisms of generation in 4T1 cells

Accumulating evidence indicates that glucose restriction promotes ROS accumulation *in vivo*; therefore, this study focused on whether glucose restriction treatment alters intracellular ROS levels in 4T1 cells. As shown in Figure 4A, DCFH-DA-based detection revealed a significant, dose-dependent increase in ROS levels in 4T1 cells cultured under glucose-restricted conditions, confirming that glucose restriction elevates intracellular ROS levels in these cells. Further quantitative analysis and visualization of the experimental data (Fig. 4C) more precisely illustrated the specific changes in the intracellular ROS levels under different degrees of glucose restriction. To clarify the causal relationship between glucose restriction and intracellular ROS production, additional experiments were performed using N-acetyl-L-cysteine (NAC), a specific ROS scavenger. As shown in Figure 4D, the elevated ROS levels induced by glucose restriction were significantly reduced in NAC-treated cells. Consistent with this, the visual fluorescence image in Figure 4B demonstrated that the fluorescence intensity (which correlates to the ROS level) was significantly attenuated in NAC-treated cells compared with untreated cells under glucose-limited conditions. Collectively, these results confirm that glucose restric-

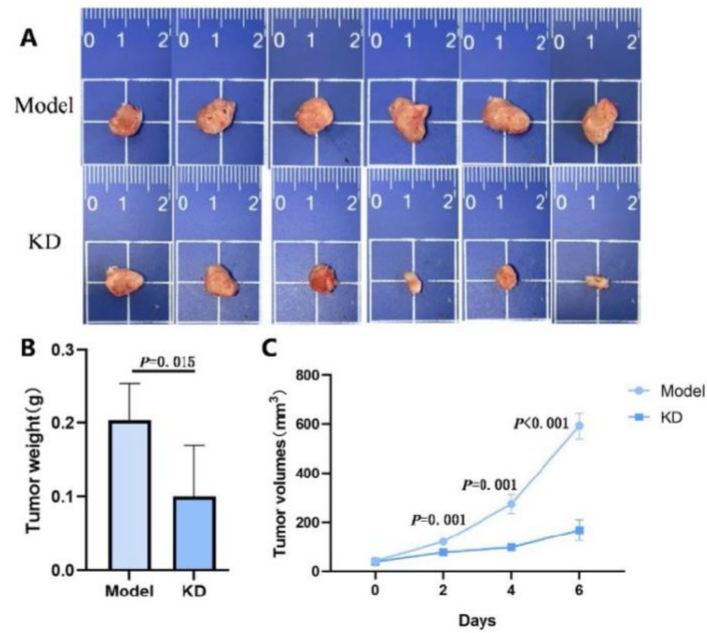


Fig. 2. Inhibitory effect of KD on tumor growth in mice. (A) Representative images of tumors isolated from mice; (B) Quantitative analysis of tumor weight in mice; (C) Dynamic changes in tumor volume of mice.

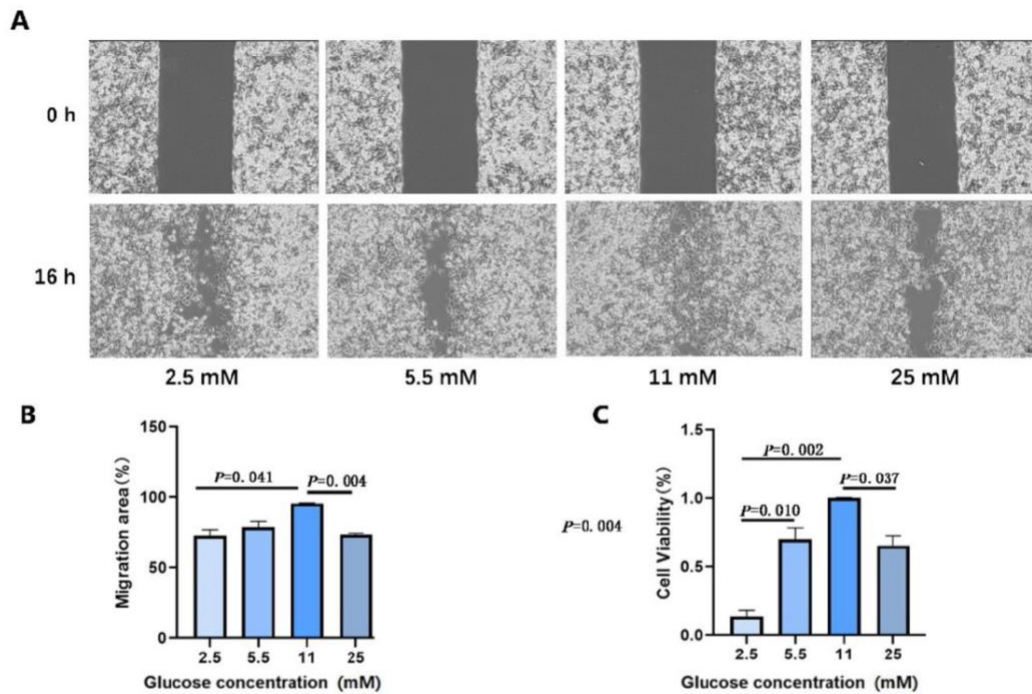


Fig. 3. Assessment of the influence of glucose deprivation on 4T1 cell growth and function. (A) Scratch assay was employed to evaluate the migratory capacity of 4T1 cells under glucose deprivation conditions; (B) Quantitative analysis of cell migration based on scratch assay results; (C) CCK-8 assay was used to investigate the proliferative response of 4T1 cells to glucose restriction.

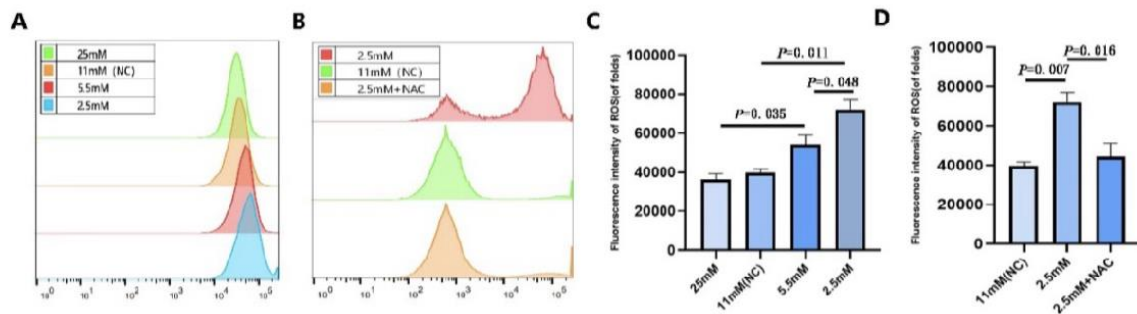


Fig. 4. Effect of glucose restriction on intracellular ROS levels in 4T1 cells. (A and C) 4T1 Cells were cultured in media with different glucose concentrations (2.5, 5.5, 11, 25 mM), and intracellular ROS levels were detected by flow cytometry; (B and D) Intracellular ROS expression levels in 4T1 cells subjected to glucose restriction alone or in combination with NAC treatment.

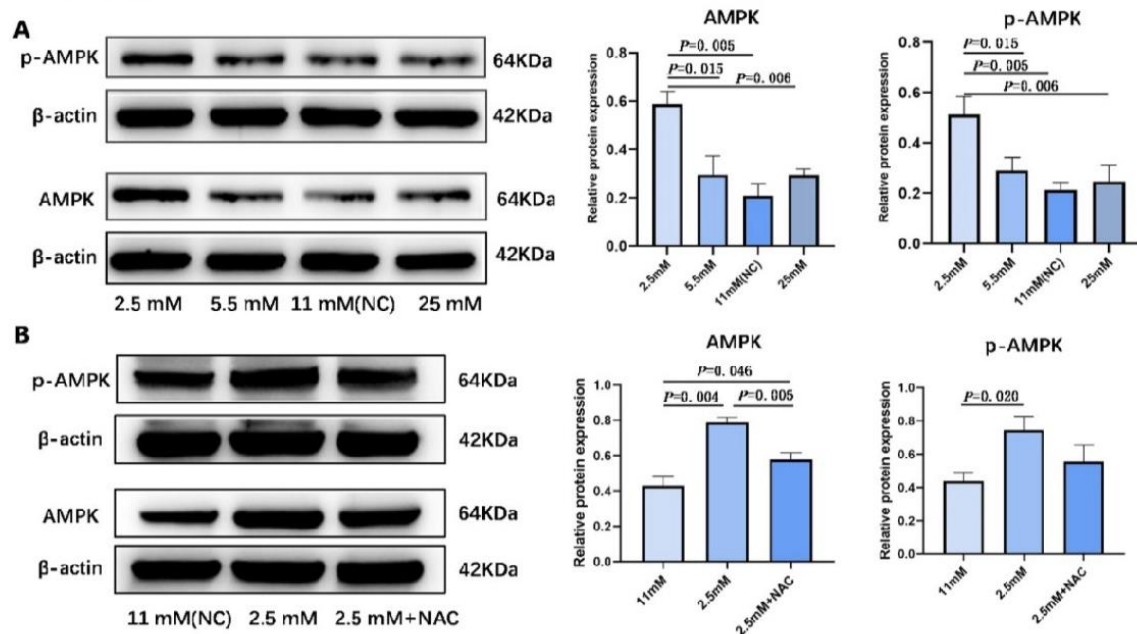


Fig. 5. Effect of glucose restriction on AMPK and p-AMPK expression in 4T1 cells. (A) 4T1 Cells were incubated in media with different glucose concentrations (2.5, 5.5, 11, 25 mM), and the expression levels of AMPK and phosphorylated AMPK (p-AMPK) were detected by Western blot analysis; (B) 4T1 Cells were subjected to glucose restriction alone or in combination with NAC treatment, and the expression levels of AMPK and p-AMPK were detected.

tion promotes ROS production in 4T1 cells, and the scavenging of ROS by NAC further verifies the specificity of this effect.

3.4. Mediators of AMPK activation in 4T1 cells under glucose restriction

The capacity of ROS to trigger the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) has been well documented in previous studies [26]. To further explore the underlying cellular mechanisms, WB analysis was performed to verify whether ROS mediate the activation of AMPK in 4T1 cells under glucose deprivation conditions. In the experimental design, treatment groups with different glucose concentration gradients were set up, covering a variety of representative concentration conditions.

As shown in Figure 5A, our results demonstrated that glucose restriction enhanced the expression of AMPK and its phosphorylated form (p-AMPK) in a dose-dependent manner. Notably, the upregulation of AMPK expression peaked when the glucose concentration was as low as 2.5 mM in 4T1 cells, which was the most significant change compared with other concentration groups.

To further clarify the involvement of ROS in this process, 4T1 cells were treated with 2 mM N-acetylcysteine (NAC)—a classi-

cal antioxidant that can effectively scavenge intracellular ROS. As shown in Figure 5B, the significantly increased levels of AMPK and p-AMPK induced by glucose restriction were markedly reduced after NAC treatment, and the expression levels were almost restored to those under normal glucose conditions. levels under normal glucose concentration conditions. These observations suggest that glucose restriction enhances the redox-sensitive AMPK signaling pathway in 4T1 cells, in which ROS most likely play a key mediating role.

3.5. Regulation of mTOR expression in 4T1 cells by glucose restriction

To investigate the effect of glucose restriction on mTOR expression in 4T1 cells, cells were treated with media containing different glucose concentrations (2.5, 5.5, 11 and 25 mM). The results showed that mTOR expression was significantly downregulated as glucose concentration decreased, indicating that glucose limitation could suppress mTOR expression. This finding is visualized in Figure 6A, which presents the quantitative bar data of WB results after grayscale analysis, confirming the regulatory effect of different glucose concentrations on mTOR expression following 24 h of treatment.

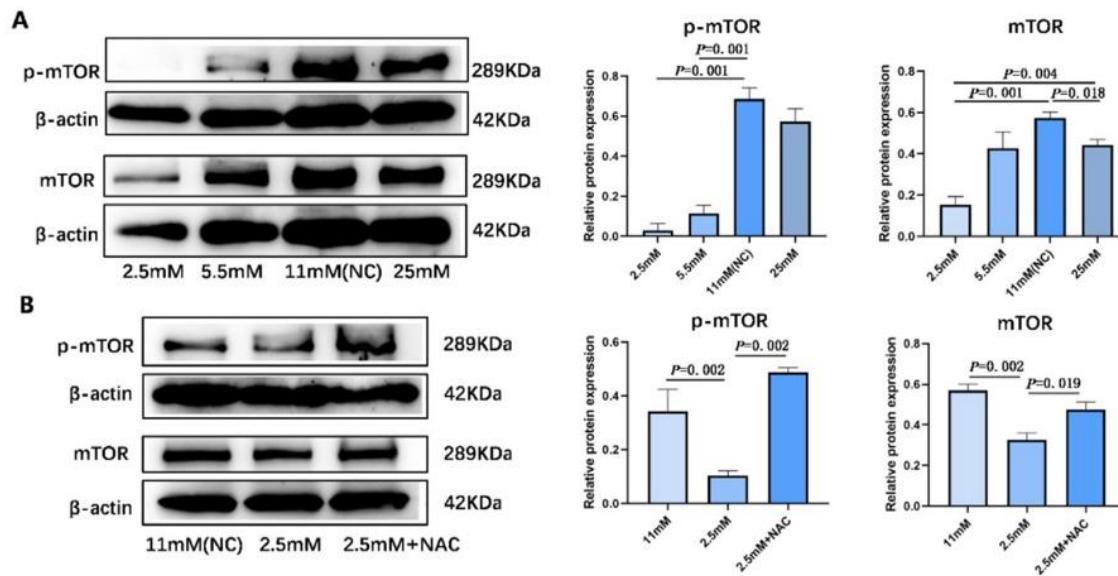


Fig. 6. Effect of glucose restriction on mTOR and p-mTOR expression in 4T1 cells. (A) 4T1 cells were incubated in media with different glucose concentrations (2.5, 5.5, 11, 25 mM) for 24 h, and the expression level of mTOR was detected by Western blot analysis; (B) 4T1 cells were subjected to glucose restriction (2.5 mM) alone or in combination with 2 mM NAC treatment, and the expression level of mTOR was detected.

Further exploration of the underlying mechanism is shown in Figure 6B. When cells were subjected to glucose restriction (2.5 mM), mTOR expression tended to decrease. However, when 2 mM NAC was added to the glucose-restricted culture system, the glucose restriction-induced downregulation of mTOR expression was effectively reversed. These findings suggest that oxidative stress may be involved in the glucose restriction-mediated downregulation of mTOR expression, and the antioxidant NAC can interfere with this potential mechanism to block the suppression of mTOR expression.

3.6. Regulation of mTOR expression by AMPK in 4T1 cells

To explore the associations between the AMPK and mTOR signaling pathways using 4T1 cells as the research model. As shown in Figure 7A–E, 4T1 cells were treated with the AMPK-specific inhibitor CC, and the expression levels of related proteins were detected by WB analysis. The results demonstrated that CC treatment significantly downregulated the expression of AMPK protein in 4T1 cells; concurrently, the expression level of mTOR was also decreased.

AMPK is a key sensor of cellular energy and metabolic status [17], and alterations in its activity are known to trigger a series of downstream signaling cascades. Our findings suggest that inhibition of AMPK by CC disrupts the intrinsic signaling balance maintained in 4T1 cells, which in turn modulates the expression of downstream mTOR. Collectively, these results confirm that AMPK can regulate mTOR expression in 4T1 cells, providing an important experimental basis for a deeper understanding of the complex intracellular signaling networks and related physiological processes.

3.7. Regulation of AMPK-mTOR expression by a KD in mice

In mice *in vivo* experiments, immunohistochemistry (IHC) was used to visualize the expression localization and relative content of specific proteins, while H&E staining—a classical histological staining method—clearly revealed morphological and structural changes in mouse tissue cells (Fig. 8). The morphological and structural

characteristics of relevant tissue cells in mice fed a KD were different from those in the control group, which is most likely associated with the regulation of the AMPK–mTOR signaling pathway.

WB analysis (Fig. 9) was performed to accurately quantify the protein expression levels of AMPK and mTOR. Compared with the control group, mice fed a KD showed significantly enhanced AMPK activity (reflected by elevated p-AMPK expression) and reduced mTOR expression. Notably, the changes in AMPK and mTOR expression in the KD group were consistent with the trends observed in previous *in vitro* experiments. These findings confirm that a low-carbohydrate KD regulates the expression of AMPK and mTOR *in vivo*, with the regulatory pattern highly consistent between *in vivo* and *in vitro* experimental results.

4. Discussion

BC is a multifactorial complex malignant tumor that has long ranked first in the global incidence of female malignancies. Its high mortality rate poses a severe challenge to public health and clinical oncology [27], making the development of effective therapeutic strategies a top priority in medical research. In recent years, with the in-depth exploration of metabolic regulation-based therapeutic approaches, the KD has gained extensive attention due to its proven potential therapeutic value in a variety of diseases, including inflammation, epilepsy, and obesity. Notably, in the field of tumor therapy, KD has gradually become the focus of research because of its unique metabolic regulatory mechanism.

The Warburg effect has long elucidated the high glucose dependence of cancer cells—a metabolic hallmark that enables cancer cells to proliferate rapidly and sustain aggressive growth under glucose-replete conditions [28]. In recent years, studies utilizing mouse cancer models have further validated the promotional role of glucose in tumor initiation and progression [29]. For instance, a study by Zhang et al. [23] demonstrated that glucose restriction induces ROS- and AMPK-mediated CTR1 expression, thereby enhancing cisplatin efficiency in non-small cell lung cancer (NSCLC). Although KD and glucose restriction share overlapping metabolic features, including reduced glucose flux, KD induces additional sys-

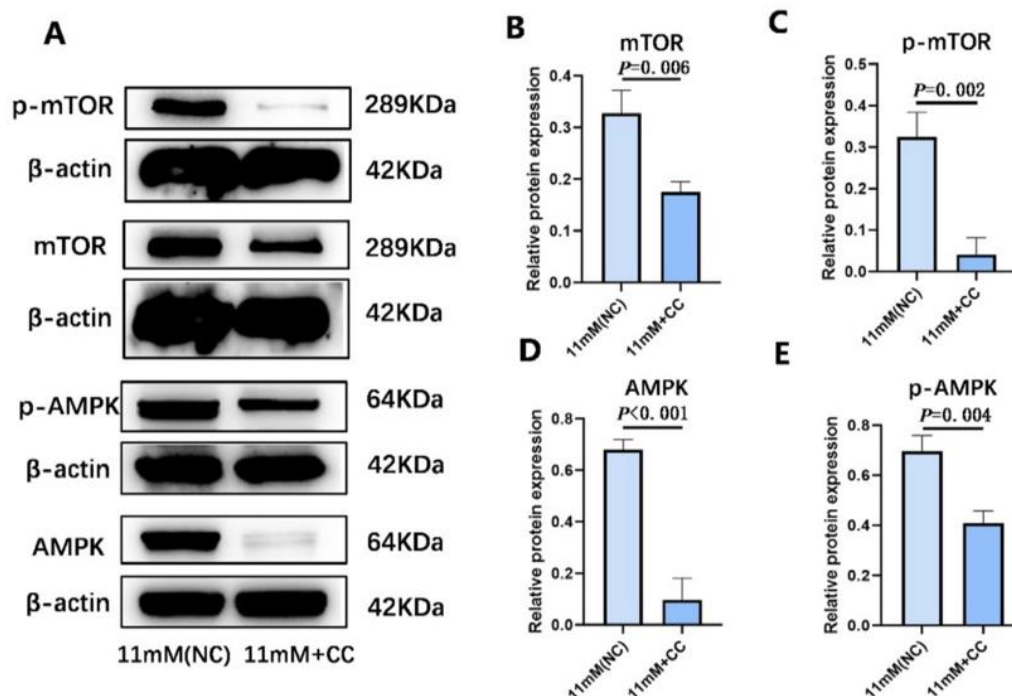


Fig. 7. Regulation of mTOR expression by AMPK under glucose restriction conditions. (A–E) 4T1 cells were cultured in medium with 11 mM glucose and treated with AMPK inhibitor Compound C (CC). The protein expression levels of AMPK and mTOR were detected by Western blot analysis.

temic metabolic changes that may contribute to its antitumor effects [30].

By performing in situ inoculation of 4T1 cells in mice, we successfully established a BC animal model that mimics the pathological characteristics of human BC. Using this model, we verified the significant inhibitory effect of the KD on BC growth in mice. Specifically, compared with the model group, mice in the KD group exhibited significantly smaller BC tumors and a markedly reduced tumor growth rate. This observation not only strengthens the feasibility of KD as a potential adjuvant therapeutic strategy for BC but also provides a solid experimental foundation for subsequent mechanistic investigations. This result is consistent with Evans et al. [31] demonstrated that calorie-restricted diets and KDs exert regulatory effects on pancreatic tumor-bearing mice, while Yang et al. [32] and other scholars' suggestion that dietary therapies can be used in conjunction with existing cancer therapies to eliminate tumors.

For in vitro cellular experiments, we selected the murine BC cell line 4T1, which is widely used in BC in vitro research due to its high invasiveness and metastatic potential [33]. In the present study, our cellular experimental results preliminarily demonstrated that glucose restriction can significantly inhibit the proliferation and growth of 4T1 BC cells. Our findings suggest that the underlying molecular mechanisms of this inhibitory effect may be closely associated with the activation of the ROS–AMPK signaling pathway, the maintenance of mitochondrial function, and the alleviation of oxidative stress.

To explore the underlying mechanism by which glucose restriction regulates the biological behavior of 4T1 BC cells, a series of in vitro experiments were designed in this study. First, 4T1 cells were treated with media containing different glucose concentrations, and proliferative capacity were evaluated using the CCK8 assay. The results showed that low-glucose media inhibited

the proliferation of 4T1 cells in a concentration-dependent manner, which is consistent with the high glucose dependence of tumor cells characterized by the Warburg effect. It should be noted that intracellular ROS levels were assessed using DCFH-DA staining, which reflects overall oxidative activity but does not distinguish between specific ROS species. Previous studies have demonstrated that under glucose restriction or metabolic stress, mitochondrial-derived ROS—particularly hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anions—are the predominant ROS species involved in AMPK activation [34]. Therefore, although individual ROS species were not separately quantified in this study, the observed increase in ROS is consistent with metabolically induced mitochondrial oxidative stress.

Elevated levels of ROS—critical intracellular signaling molecules—are commonly associated with oxidative stress and apoptosis [15]. Although the metabolic context differs, previous studies have shown that excessive ROS accumulation—whether induced by high glucose or metabolic imbalance—can trigger mitochondria-mediated apoptosis. For instance, Li et al. [35] reported that ROS accumulation induced by high glucose during the embryo–larval stage of zebrafish leads to mitochondria-mediated apoptosis, while Wang et al. [36] indicated that ROS regulate cell death outcomes through mechanisms involving apoptosis, autophagy, and ferroptosis. Consistent with these observations, our Annexin V/PE staining experiments demonstrated that glucose restriction significantly increased apoptosis in 4T1 cells, suggesting that ROS-mediated signaling contributes to tumor cell death under metabolic stress.

To elucidate the role of AMPK in glucose restriction-mediated ROS generation, we added the ROS scavenger NAC to 4T1 cells treated with 2.5 mmol/L glucose (low-glucose group). WB analysis showed that the AMPK expression level in the NAC-treated low-glucose group was upregulated and tended to be higher than that

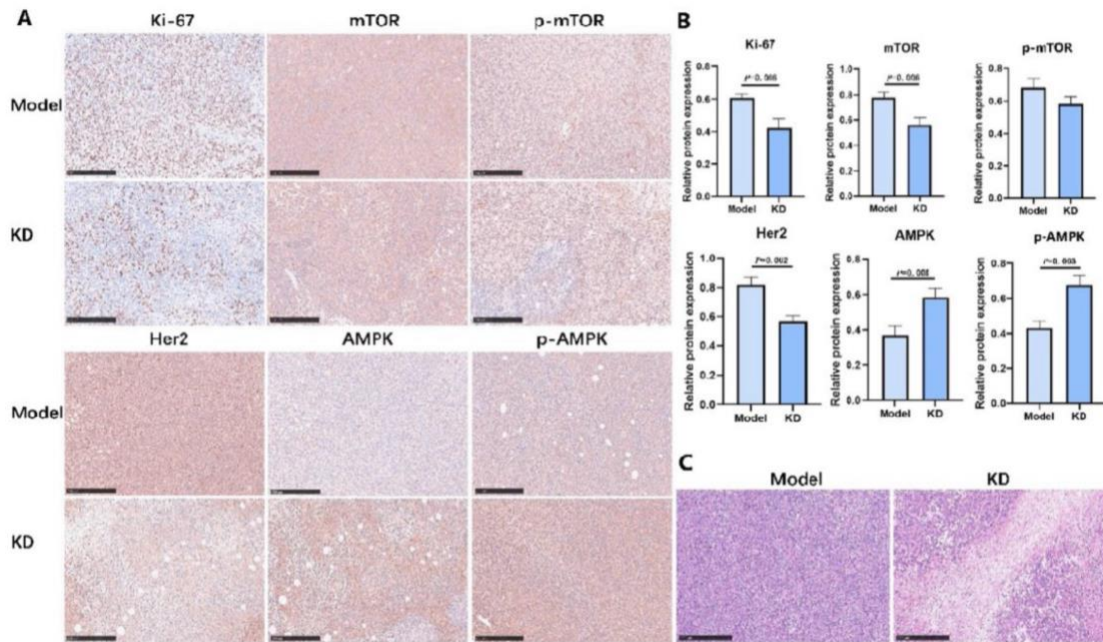


Fig. 8. Effects of KD on mouse tumor tissues and related protein expression. (A and C) Quantification analysis of immunohistochemical (IHC) staining results (Ki-67, mTOR, P-mTOR, Her2, AMPK, p-AMPK) ($n = 6$); (B) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of mouse tumor tissues; (D–F) Expression levels of AMPK and mTOR in mouse tumor tissues.

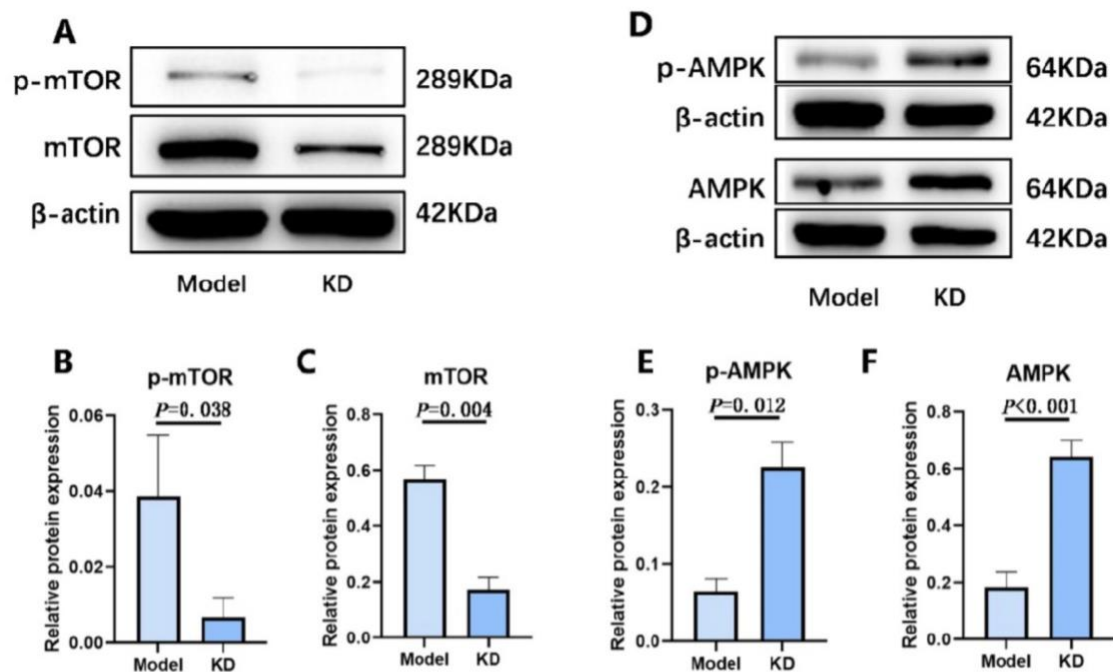


Fig. 9. Effects of KD on mTOR and AMPK expression in mouse tumors. (A–C) Expression levels of mTOR in mouse tumor tissues; (D–F) Expression levels of AMPK in mouse tumor tissues.

in the in the 2.5 mmol/L group alone (without NAC treatment), while being closer to the level in the normal control (NC) group. This result confirms that glucose restriction via ROS promotes intracellular AMPK expression, which is reversed when ROS activity is inhibited with NAC.

It should be noted that Compound C (dorsomorphin), the pharmacological inhibitor of AMPK used in this study, has been re-

ported to have off-target effects, including the inhibition of other kinases [37]. This represents a potential limitation of our experimental approach. However, Compound C is still widely used as a tool compound for AMPK inhibition in metabolic and cancer research, especially in short-term in vitro experiments, and has been proven to effectively suppress AMPK activity under metabolic stress conditions [38].

These findings highlight the critical role of AMPK in linking energy stress (induced by glucose restriction) and redox homeostasis, providing a novel molecular mechanism for understanding the adaptive response of tumor cells to metabolic stress. Our results are consistent with the findings of Lin [39] and Jiang et al. [26]. To further explore the effect of glucose restriction on tumor cell apoptosis, we subsequently performed Annexin V/PE double-staining experiments. The results showed that low-glucose treatment significantly increased the apoptosis rate of 4T1 cells, suggesting that glucose restriction might inhibit tumor growth by inducing apoptosis.

The results of the IHC staining experiments revealed that KD intervention significantly downregulated the expression levels of mTOR, HER2, and Ki-67 in tumor tissues, while markedly upregulating AMPK expression. Notably, HER2 and Ki-67 are well-recognized tumor proliferation markers, and their reduced expression further confirms the antitumor efficacy of KD. This finding is highly consistent with the results of our *in vitro* cellular experiments; collectively, these *in vivo* and *in vitro* data suggest that KD may inhibit BC growth by regulating the AMPK/mTOR signaling pathway.

AMPK, a key regulator of cellular energy metabolism, exerts inhibitory effects on the mTOR signaling pathway, thereby suppressing tumor cell proliferation. AMPK not only monitors intracellular energy homeostasis but also modulates downstream signaling cascades—most notably the mTOR pathway—to regulate cell growth, proliferation, and survival [40]. Previous studies have suggested that AMPK activation is typically triggered by energetic stress (e.g., glucose restriction) and inhibits tumor growth by suppressing protein synthesis and cell proliferation through the downregulation of mTOR signaling [41]. Consistent with these findings, our *in vitro* experiments, AMPK expression was significantly upregulated, whereas mTOR expression was significantly downregulated in 4T1 cells cultured in low-glucose medium.

By combining these findings, we have elucidated a novel mechanism underlying the regulatory effect of glucose restriction on BC cells. Specifically, our results demonstrate that glucose restriction modulates the expression of the AMPK/mTOR signaling pathway by inducing an elevation in increasing intracellular ROS levels. This regulatory process effectively inhibited the growth of BC cells and promoted their apoptosis.

4.1. Limitations of the study

Several limitations of the present study should be acknowledged. First, although our results indicate that ROS accumulation mediates AMPK activation and subsequent mTOR inhibition under glucose restriction or KD conditions, the mechanistic relationship remains largely correlative. Future studies employing pathway-specific manipulations, such as genetic knockdown or overexpression of AMPK/mTOR, or rescue experiments using ROS modulators, will be necessary to establish causality.

Second, glucose restriction was used as an *in vitro* surrogate for KD-induced metabolic stress; however, it does not fully recapitulate the systemic metabolic environment *in vivo*, where KD also elevates circulating ketone bodies that act as signaling metabolites influencing epigenetic regulation, inflammation, and mitochondrial function. Additionally, unlike earlier studies that investigated the effects of KD on the growth of brain tumors or prostate cancer [42], the present study focuses on TNBC, a type of cancer lacking targeted therapies; more importantly, in contrast to the study by Calderin et al. [43], which observed AMPK activation but did not explore its upstream triggering factors, we have clarified that ROS is the key bridge connecting metabolic stress to AMPK activation, thereby delineating a complete pathway from dietary intervention

to intracellular signal transduction. Nevertheless, the *in vitro* glucose restriction model still fails to replicate the complex *in vivo* metabolic milieu induced by KD.

Third, the translational application of KD in humans may be limited by patient compliance, interindividual metabolic heterogeneity, and potential long-term safety concerns [44]. Future clinical studies are warranted to evaluate the feasibility, safety, and efficacy of KD as an adjunct therapy and to explore personalized dietary interventions based on patient-specific metabolic profiles.

Ethics approval

This study was performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The Ethical Committee for Animal Experiments of Shanxi Cancer Hospital approved this study. (IACUC No: 2023034). The experimental animals were 24 BALB/c female mice purchased from Beijing Viton Lever Company. The mice were kept in the SPF laboratory of the Laboratory Animal Center of Shanxi Provincial Cancer Hospital and the experimental process strictly followed the “3R” principle.

Consent to publish

The authors confirmed that human research participants provided informed consent for all images in the release chart.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors declare no competing financial interests or personal relationships that could influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Yaxin Luo: Writing – original draft, Investigation, Data curation. **Junjun Li:** Writing – original draft, Investigation, Data curation. **Yuxin Yang:** Investigation, Data curation. **Lei Yan:** Investigation, Data curation. **Ziyang Huang:** Investigation, Data curation. **Lixia Chen:** Data curation. **Lili Zhao:** Data curation. **Jing Wang:** Data curation. **Yongming Yang:** Supervision. **Xianping Liu:** Methodology, Conceptualization. **Xihua Yang:** Methodology, Funding acquisition, Conceptualization.

Acknowledgments

None.

Funding

This work was supported by the Shanxi Provincial Key Research Laboratory Construction Project of Traditional Chinese Medicine (#zyyyys2024018) and the Shanxi Provincial Scientific and Technological Innovation Talent Team Special Project (#202204051001033).

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jnutbio.2026.110312.

References

- [1] Cava E, Marzullo P, Farinelli D, Gennari A, Saggia C, Riso S, et al. Breast cancer diet "BCD": a review of healthy dietary patterns to prevent Breast cancer recurrence and reduce mortality. *Nutrients* 2022;14(3):476. doi:10.3390/nu14030476.
- [2] Guillén-Mancina E, Jiménez-Alonso JJ, Calderón-Montaña JM, Jiménez-González V, Díaz-Ortega P, Burgos-Morón E, et al. Artificial diets with selective restriction of amino acids and very low levels of lipids induce anti-cancer activity in mice with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancers* 2023;15(5):1540. doi:10.3390/cancers15051540.
- [3] Łukasiewicz S, Czelewska M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. *Cancers* 2021;13(17):4287. doi:10.3390/cancers13174287.
- [4] Perez M, García-Heredia JM, Felipe-Abrio B, Muñoz-Galván S, Martín-Broto J, Carnero A. Sarcoma stratification by combined pH2AX and MAP17 (PDZK1IP1) levels for a better outcome on doxorubicin plus Olaparib treatment. *Sig Transduct Target Ther* 2020;5(1):195. doi:10.1038/s41392-020-00246-z.
- [5] Peck B, Schulze A. Lipid metabolism at the nexus of diet and tumor microenvironment. *Trends Cancer* 2019;5(11):693–703. doi:10.1016/j.trecan.2019.09.007.
- [6] Kukurugya MA, Rosset S, Titov DV. The Warburg effect is the result of faster ATP production by glycolysis than respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2024;121(46):e2409509121. doi:10.1073/pnas.2409509121.
- [7] Bose S, Zhang C, Le A. Glucose metabolism in cancer: the Warburg effect and beyond. In: Le A, editor. *The heterogeneity of cancer metabolism. Advances in experimental medicine and biology. The heterogeneity of cancer metabolism. Advances in experimental medicine and biology*, 1311. Springer International Publishing; 2021. p. 3–15. doi:10.1007/978-3-030-65768-0_1.
- [8] Branco AF, Ferreira A, Simões RF, Magalhães-Novais S, Zehowski C, Cope E, et al. Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond. *Eur J Clin Invest* 2016;46(3):285–98. doi:10.1111/eci.12591.
- [9] Allen BC, Bhatia SK, Buatti JM, Brandt KE, Lindholm KE, Button AM, et al. Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2013;19(14):3905–13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0287.
- [10] Stafford P, Abdelwahab MG, Kim DY, Preul MC, Rho JM, Scheck AC. The ketogenic diet reverses gene expression patterns and reduces reactive oxygen species levels when used as an adjuvant therapy for glioma. *Nutr Metab (Lond)* 2010;7(1):74. doi:10.1186/1743-7075-7-74.
- [11] Hopkins BD, Pauli C, Du X, Wang DG, Li X, Wu D, et al. Suppression of insulin feedback enhances the efficacy of PI3K inhibitors. *Nature* 2018;560(7719):499–503. doi:10.1038/s41586-018-0343-4.
- [12] Klement R, Paziencia V. Impact of different types of diet on gut microbiota profiles and cancer prevention and treatment. *Medicina* 2019;55(4):84. doi:10.3390/medicina55040084.
- [13] Tajan M, Voutsden KH. Dietary approaches to cancer therapy. *Cancer Cell* 2020;37(6):767–85. doi:10.1016/j.ccell.2020.04.005.
- [14] Ren Y, Shen HM. Critical role of AMPK in redox regulation under glucose starvation. *Redox Biol* 2019;25:101154. doi:10.1016/j.redox.2019.101154.
- [15] Lennicke C, Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell* 2021;81(18):3691–707. doi:10.1016/j.molcel.2021.08.018.
- [16] Ke R, Xu Q, Li C, Luo L, Huang D. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell Biol Int* 2018;42(4):384–92. doi:10.1002/cbin.10915.
- [17] Grahame Hardie D. AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. *J Intern Med* 2014;276(6):543–59. doi:10.1111/joim.12268.
- [18] Lin SC, Hardie DG. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status. *Cell Metab* 2018;27(2):299–313. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.009.
- [19] Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 2017;169(2):361–71. doi:10.1016/j.cell.2017.03.035.
- [20] Glaviano A, Foo ASC, Lam HY, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol Cancer* 2023;22(1):138. doi:10.1186/s12943-023-01827-6.
- [21] Zhang P, Li B, Chen Q, Wang H, Feng Q. Glucose restriction induces ROS-AMPK-mediated CTR1 expression and increases cisplatin efficiency in NSCLC. *Cancer Lett* 2022;543:215793. doi:10.1016/j.canlet.2022.215793.
- [22] Neha, Chaudhary R. Ketogenic diet as a treatment and prevention strategy for cancer: a therapeutic alternative. *Nutrition* 2024;124:112427. doi:10.1016/j.nut.2024.112427.
- [23] Zhang P, Li B, Chen Q, Wang H, Feng Q. Glucose restriction induces ROS-AMPK-mediated CTR1 expression and increases cisplatin efficiency in NSCLC. *Cancer Lett* 2022;543:215793. doi:10.1016/j.canlet.2022.215793.
- [24] Allen BC, Bhatia SK, Buatti JM, Brandt KE, Lindholm KE, Button AM, et al. Ketogenic diets enhance oxidative stress and radio-chemo-therapy responses in lung cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 2013;19(14):3905–13. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0287.
- [25] Cortez N.E., Pathak S., Rodriguez Lanzi C., Hong B.V., Crone R., Sule R., et al. A Ketogenic Diet in Combination with Gemcitabine Mitigates Pancreatic Cancer-Associated Cachexia in Male and Female KPC Mice. *Int J Mol Sci* 24(13):10753. doi:10.3390/ijms241310753.
- [26] Jiang P, Ren L, Zhi L, Yu Z, Lv F, Xu F, et al. Negative regulation of AMPK signaling by high glucose via E3 ubiquitin ligase MG53. *Mol Cell* 2021;81(3):629–637.e5. doi:10.1016/j.molcel.2020.12.008.
- [27] Rojas K, Stuckey A. Breast cancer epidemiology and risk factors. *Clin Obstet Gynecol* 2016;59(4):651–72. doi:10.1097/GRE.0000000000000239.
- [28] Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci* 2016;41(3):211–18. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [29] Eisenstein M. Why tumour geography matters—and how to map it. *Nature* 2024;635(8040):1031–3. doi:10.1038/d41586-024-03830-3.
- [30] Effinger D, Hirschberger S, Yoncheva P, Schmid A, Heine T, Newels P, et al. A ketogenic diet substantially reshapes the human metabolome. *Clin Nutr* 2023;42(7):1202–12. doi:10.1016/j.clnu.2023.04.027.
- [31] Lien EC, Westermarck AM, Zhang Y, Yuan C, Li C, Lau AN, et al. Low glycaemic diets alter lipid metabolism to influence tumour growth. *Nature* 2021;599(7884):302–7. doi:10.1038/s41586-021-04049-2.
- [32] Yang H, Zingaro VA, Lincoff J, Tom H, Oikawa S, Osés-Prieto JA, et al. Remodeling of the translational controls diet and its impact on tumorigenesis. *Nature* 2024;633(8028):189–97. doi:10.1038/s41586-024-07781-7.
- [33] Paschall AV, Liu K. An orthotopic mouse model of spontaneous breast cancer metastasis. *J Vis Exp* 2016(114):e54040. doi:10.3791/54040.
- [34] Emerling BM, Weinberg F, Snyder C, Burgess Z, Mutu GM, Viollet B, et al. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* 2009;46(10):1386–91. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.019.
- [35] Li Y, Chen Q, Liu Y, Bi L, Jin L, Xu K, et al. High glucose-induced ROS-accumulation in embryo-larval stages of zebrafish leads to mitochondria-mediated apoptosis. *Apoptosis* 2022;27(7):509–20. doi:10.1007/s10495-022-01731-2.
- [36] Wang B, Wang Y, Zhang J, Bi L, Jin L, Xu K, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Arch Toxicol* 2023;97(6):1439–51. doi:10.1007/s00204-023-03476-6.
- [37] Dasgupta B, Seibel W. Compound C/Dorsomorphin: its use and misuse as an AMPK inhibitor. In: Neumann D, Viollet B, editors. *AMPK: methods and protocols*. Springer; 2018. p. 195–202. doi:10.1007/978-1-4939-7598-3_12.
- [38] Saito S, Aki F, Sakurai J, Park H, Shin-ya K, Tomida A. Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. *PLoS one* 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0045845.
- [39] Lin SP, Bu J, Ye S, Xie Q, Wei JX, Yin XF, et al. Activated AMPK-mediated glucose uptake and mitochondrial dysfunction is critically involved in the glutamate-induced oxidative injury in HT22 cell. *Tissue Cell* 2023;81:102039. doi:10.1016/j.tice.2023.102039.
- [40] Steinberg GR, Hardie DG. New insights into activation and function of the AMPK. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2023;24(4):255–72. doi:10.1038/s41580-022-00547-x.
- [41] Zhang CS, Hawley SA, Zong Y, Li MQ, Wang ZC, Gray A, et al. Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* 2017;548(7665):112–16. doi:10.1038/nature23275.
- [42] Murphy S, Rahmy S, Gan D, Liu GQ, Zhu YN, Manyak M, et al. Ketogenic diet alters the epigenetic and immune landscape of prostate cancer to overcome resistance to immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Res* 2024;84(10):1597–612. doi:10.1158/0008-5472.CAN-23-2742.
- [43] Calderin EP, Zheng JJ, Boyd NL, McNally L, Audam TN, Lorkiewicz P, et al. Exercise-induced specialized proresolving mediators stimulate AMPK phosphorylation to promote mitochondrial respiration in macrophages. *Mol Metab* 2022;66:101637. doi:10.1016/j.molmet.2022.101637.
- [44] Gallop MR, Vieira RFL, Mower PD, Matsuzaki ET, Liou W, Smart FE, et al. A long-term ketogenic diet causes hyperlipidemia, liver dysfunction, and glucose intolerance from impaired insulin secretion in mice. *Sci Adv* 2025;11(38):eadx2752. doi:10.1126/sciadv.adx2752.