

MECCANISMI DI RESISTENZA DEI TUMORI E IMPIEGO DELLE SOSTANZE NATURALI NELLA TERAPIA ADIUVANTE

Maria Condello (a), Evelin Pellegrini (a), Giuseppe Arancia (b), Stefania Meschini (a)

(a) Centro Nazionale per la Ricerca e la Valutazione Preclinica e Clinica dei Farmaci,
Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) già Dipartimento Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Sebbene vengano introdotti sempre nuovi protocolli terapeutici per la cura dei tumori, il cancro rappresenta ancora la terza causa di morte nel mondo. L'elevato tasso di mortalità è dovuto all'inefficacia dei trattamenti farmacologici e all'instaurarsi del fenomeno della polifarmacoresistenza (*Multidrug Resistance*, MDR).

I chemioterapici usati nella terapia contro il cancro possono essere molto tossici con effetti collaterali che ne limitano l'efficacia. Tra gli effetti più noti vi sono la cardiotoxicità della doxorubicina e la nefrotossicità e immunosoppressione del cisplatino. La chemioterapia adjuvante ha lo scopo di ridurre il rischio di ricaduta a livello locale e generale successivo all'intervento chirurgico. Se la malattia, invece, è localmente avanzata e non è facilmente operabile, viene effettuato un trattamento chemioterapico preoperatorio (chemioterapia neoadiuvante). Quando la malattia non è limitata a un solo organo ma coinvolge anche altre sedi (osso, polmone, fegato, ecc.), sia perchè recidivata sia perchè già presente al momento della diagnosi, si effettua direttamente il protocollo chemioterapico proprio della malattia metastatica. Molti sono i farmaci a disposizione per i diversi trattamenti che vengono utilizzati in combinazione o in modo sequenziale. Nonostante l'avanzamento tecnologico e le numerose ricerche in tale ambito, gli effetti dannosi sugli organi sani impongono l'uso limitato dei chemioterapici a dosi elevate. L'uso contemporaneo di più farmaci a basso dosaggio, con la speranza di ottenere un effetto sinergico, è spesso limitato dalla combinazione di effetti dovuti all'attivazione di *pathway* molecolari, non facilmente prevedibili, responsabili dei fenomeni di resistenza. La resistenza dei tumori ai chemioterapici può essere intrinseca o acquisita. La resistenza intrinseca si instaura, prima del trattamento farmacologico, per effetto delle alterazioni genetiche che il *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) sviluppa durante la trasformazione tumorale e che è la causa dell'insorgere della resistenza a terapie specifiche. La resistenza acquisita è quella indotta in seguito al trattamento farmacologico ed ha anch'essa un ruolo fondamentale nel fallimento della terapia oncologica. Quando una cellula tumorale diventa resistente a farmaci strutturalmente e funzionalmente diversi tra loro, si ha la polifarmacoresistenza.

Allo scopo di superare questi problemi e ottimizzare i protocolli in clinica oncologica, la ricerca preclinica è orientata verso la sperimentazione di combinazioni farmacologiche a dosaggi subcitotossici, con limitati effetti collaterali ed effetti terapeutici mirati verso target intracellulari specifici.

Principali meccanismi della polifarmacoresistenza

Sono stati individuati diversi meccanismi cellulari alla base della resistenza ai farmaci, molti dei quali possono determinare contemporaneamente il fenotipo resistente (Wang, 2019):

- *Resistenza mediata da molecole di trasporto*: la polifarmacoresistenza è spesso associata alla ridotta concentrazione intracellulare del chemioterapico per un aumentato efflusso o per un ridotto ingresso del farmaco nella cellula bersaglio. Le proteine di trasporto coinvolte sono pompe d'efflusso appartenenti alla superfamiglia di proteine transmembrana ATP-dipendenti, dette *ATP-binding cassettes* (ABC) (Gottesman, 2002). Finora sono stati identificati, nel cariotipo umano, geni per 49 proteine ABC che sono state suddivise in 7 famiglie (ABC A-G) (Chen, 2016). Uno dei trasportatori più studiati è la P-glicoproteina (P-gp), proteina di membrana di 170 kDa, prevalentemente localizzata nella membrana plasmatica delle cellule tumorali. Tuttavia è stata trovata anche nelle vescicole intracitoplasmatiche, nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri e nell'apparato del Golgi dove gioca un ruolo nel trasporto del farmaco dal nucleo verso la periferia cellulare e nel nucleo dove è coinvolta nella rimozione della sostanza citotossica dal *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) (Meschini, 2000; Guo, 2019). Tra gli innumerevoli substrati espulsi dalla P-gp ricordiamo gli alcaloidi della Vinca (vinblastina e vincristina), i taxani (paclitaxel e docetaxel), gli antibiotici antraciclinici (doxorubicina, epirubicina e daunorubicina), gli inibitori delle topoisomerasi (etoposide, topotecano) e gli inibitori delle tirosin chinasi (disatinib e gefitinib) (Eckford, 2009). La P-gp è formata da due domini transmembrana omologhi, ciascuno dei quali contiene 6 α -eliche e due domini di legame per i nucleotidi, che legano e idrolizzano ATP. L'interazione tra le due metà della P-gp è essenziale per il corretto funzionamento della pompa (Esser, 2017).
- *Resistenza mediata dall'esocitosi del farmaco mediante vescicole*: alcuni farmaci vengono intrappolati in vescicole di esocitosi, che riversano il farmaco al di fuori dalla cellula tumorale riducendone la concentrazione intracellulare e di conseguenza l'effetto citotossico (Zhitomirsky, 2017).
- *Resistenza metabolica*: un'alterata espressione degli enzimi metabolici di fase I (come le isoforme del citocromo P450) e quelli di fase II (enzimi del glutatione transferasi) è stata trovata in diversi tumori resistenti a una varietà di chemioterapici (Ramsay, 2014; Pathania, 2018).
- *Resistenza all'apoptosi* è mediata da una serie di mutazioni geniche che rendono la cellula incapace di morire per apoptosi in seguito al trattamento con i farmaci (Wilson *et al.*, 2009). Le principali mutazioni interessano il *pathway* di p53 e i geni che codificano per le proteine proapoptotiche (come Bax e Bak) e antiapoptotiche (Bcl-2, Bcl-xl) (Fanourakis *et al.*, 2018).
- *Resistenza mediata dallo stress ossidativo*: le specie reattive dell'ossigeno (ROS) provocano danni al *DeoxyriboNucleic Acid* (DNA) nei geni coinvolti nella proliferazione e nel controllo della crescita cellulare, inducendo resistenza al farmaco (Yang, 2018).
- *Microambiente tumorale nella MDR*: numerose evidenze scientifiche suggeriscono il ruolo determinante del microambiente tumorale nella MDR (Al-Akra, 2019). Il microambiente tumorale è una fitta trama dinamica di cellule tumorali, cellule stromali e matrice extracellulare caratterizzato da regioni scarsamente ossigenate (regioni ipossiche), povere di nutrienti, di glucosio (regioni ipoglicemiche) e con pH acido. Di conseguenza le cellule all'interno della massa tumorale, scarsamente irrorate dai vasi sanguigni, ricevono una limitata dose di farmaco con conseguente riduzione dell'effetto della terapia. Il principale

regolatore molecolare della MDR nel microambiente tumorale è la proteina HIF- α in grado di regolare l'espressione dei trasportatori di membrana e degli enzimi del metabolismo del farmaco di fase II (Shen, 2009; Bhattacharya, 2016).

- *Sopravvivenza e l'adattamento delle cellule tumorali*: nelle regioni ipossiche di alcuni tumori solidi, la sopravvivenza e l'adattamento delle cellule tumorali alla mancanza di ossigeno e di nutrienti viene favorita dall'autofagia (Li, 2017). L'autofagia è un processo altamente dinamico che, in condizioni di stress, interviene permettendo alla cellula di riciclare i pochi nutrienti a disposizione per produrre nuova energia (Klionsky, 2016). Inoltre, gli organelli cellulari danneggiati sono degradati in vacuoli autofagici in modo che non siano letali per la cellula stessa (Wei, 2018). È stato dimostrato che l'autofagia promuove la farmacoresistenza favorendo la selezione di cellule staminali tumorali, come osservato nel glioblastoma e nel tumore del seno (Smith, 2019). Le cellule staminali tumorali sono una piccola popolazione del tumore che, grazie all'autofagia, sopravvive alla scarsità di ossigeno o nutrienti, mantiene le caratteristiche di pluripotenza e, avendo un elevato indice invasivo e metastatico, continuano a sopravvivere e a invadere i tessuti circostanti (Nazio, 2019). In particolare, le cellule staminali tumorali utilizzano la mitofagia (eliminazione selettiva dei mitocondri) per eliminare i mitocondri danneggiati, mantenendo basso il livello di ROS e prevenendo l'attivazione della morte cellulare programmata (Liu, 2017).
- *Resistenza mediata da alterazioni epigenetiche*: le alterazioni genetiche sono cambiamenti nelle sequenze del DNA e includono la metilazione del DNA, le modificazioni istoniche e le modificazioni del microRNA (miRNA). Dopo il trattamento chemioterapico possono verificarsi alterazioni epigenetiche che modificano l'espressione dei geni coinvolti nella MDR (Wengong, 2019).

Sostanze naturali nella terapia adiuvante dei tumori farmacoresistenti

La conoscenza approfondita dei meccanismi alla base della farmacoresistenza dei tumori ha permesso di trovare diverse strategie terapeutiche per il loro superamento. Esse sono basate sull'uso dei modulatori dei trasportatori ABC, sul silenziamento genico, sul trattamento con anticorpi monoclonali e sulla veicolazione dei farmaci tramite nanoparticelle di diversa natura (Condello, 2020). Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che sostanze naturali (flavonoidi, fenoli, terpenoidi, alcaloidi, carotenoidi, lignani), se somministrate in associazione con i convenzionali chemioterapici, possono ridurre il fenomeno della resistenza, agendo sui diversi meccanismi (Lin, 2020). Per esempio, per ridurre la cardiotoxicità e la resistenza alla doxorubicina, numerosi estratti vegetali sono stati somministrati in associazione con questo chemioterapico: un lignano naturale estratto dal *Silybum marianum* ha ridotto la farmacoresistenza del tumore della prostata (Gioti, 2019).

Studi recenti evidenziano come la Curcumina in associazione con il 5-Fluorouracile sia efficace nei confronti delle cellule umane di carcinoma esofageo e in associazione con il Paclitaxel verso le cellule tumorali della vescica (Pendleton, 2019; Khan, 2020).

In particolare, i nostri studi hanno valutato l'attività chemiosensibilizzante della voacamina (VOA), un alcaloide bisindolico estratto dalla corteccia di una pianta infestante del Brasile, la *Peschiera fuchsiaeifolia*. I primi studi hanno dimostrato che la VOA, a concentrazioni subcitotossiche (1 $\mu\text{g/mL}$), era in grado di aumentare l'effetto della doxorubicina nei confronti di cellule di osteosarcoma umano farmacoresistenti, U2-OS/DX (Meschini, 2003). L'effetto

chemiosensibilizzante della VOA era dovuto a un duplice meccanismo: (a) capacità di inibire, in maniera competitiva, la funzionalità della P-gp, aumentando l'accumulo intracellulare del chemioterapico (Meschini *et al.*, 2005); (b) effetto depolimerizzante sui microtubuli, attraverso il quale, si alterava il flusso di esocitosi delle vescicole contenenti il farmaco doxorubicina (Condello, 2020).

L'effetto chemiosensibilizzante della vocamina nei confronti della doxorubicina è stato inoltre dimostrato anche su altre linee farmacoresistenti di osteosarcoma (SAOS-2-DX) e su linee intrinsecamente resistenti di melanoma (Me30966) (Condello, 2014). Studi successivi hanno dimostrato che i due monomeri (voacangina e vobasina), che costituiscono l'alcaloide dimerico VOA, e il legame chimico che li unisce, sono necessari affinché la VOA abbia effetto chemiosensibilizzante (Condello, 2020).

Infine, la VOA, a concentrazioni elevate (10 µg/mL), induceva un meccanismo di morte cellulare per autofagia sulle stesse linee farmacosensibili e farmacoresistenti di osteosarcoma umano, dimostrando l'importanza dell'uso a dosi subcitotossiche in combinazione con i chemioterapici per favorire il potenziamento dell'attività dei chemioterapici stessi (Meschini, 2008). Alla stessa concentrazione e tempo di incubazione usati per l'effetto chemiosensibilizzante, la VOA non ha avuto alcun effetto tossico sui fibroblasti umani (Condello, 2014), incoraggiando il proseguimento degli studi su linee tumorali di diverso istotipo e in associazione con farmaci chemioterapici diversi dalla doxorubicina.

Conclusioni

Da questa breve rassegna emerge l'importanza delle sostanze naturali quando date in associazione con i convenzionali chemioterapici. Esse infatti possono aumentare, in determinate condizioni, l'effetto tossico dei chemioterapici consentendo da una parte di superare il fenotipo farmacoresistente delle cellule tumorali, dall'altra di diminuire la dose di chemioterapico che potrebbe essere tossico per le cellule sane.

Nonostante tali studi *in vitro* siano promettenti, bisogna sempre ricordare che le sostanze naturali possono essere di per sé tossiche nei confronti dei tessuti sani e bisogna valutare con molta attenzione e cautela le possibili interazioni con i farmaci chemioterapici. Pertanto la successiva sperimentazione animale rappresenta una tappa fondamentale prima di poter sperimentare sul malato l'efficacia della terapia combinata.

Bibliografia

- Al-Akra L, Bae D, Leck LYW, Richardson DR, Jansson PJ. The biochemical and molecular mechanisms involved in the role of tumor micro-environment stress in development of drug resistance. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2019;1863(9):1390-7.
- Bhattacharya B, Omar MFM, Soong R. The Warburg effect and drug resistance. *Br J Pharmacol* 2016;173:970-9.
- Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhou P, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade. *Cancer Lett* 2016;370:153-64.
- Condello M, Cosentino D, Corinti S, Di Felice G, Multari G, Gallo FR, Arancia G, Meschini S. Voacamine modulates the sensitivity to doxorubicin of resistant osteosarcoma and melanoma cells and does not induce toxicity in normal fibroblasts. *J Nat Prod* 2014;77:855-62.

- Condello M, Pellegrini E, Multari G, Gallo FR, Meschini S. Voacamine: alkaloid with its essential dimeric units to reverse tumor multidrug resistance. *Toxicol in Vitro* 2020;65:104819.
- Eckford PD, Sharom, FJ. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 2009;109:2989-3011.
- Esser L, Zhou F, Pluchino, KM, Shiloach J, Ma J, Tang WK, Gutierrez C, Zhang A, Shukla S, Madigan JP, Zhou, T, Kwong PD, Ambudkar SV, Gottesman MM, Xia D. Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity. *J Biol Chem* 2017;292:446-61.
- Fanourakis G, Saetta A, Lazaris AC, Miaouli M, Voutsinas GE, Patsouris E, Tseleni-Balafouta S. Resistance to Fas-mediated apoptosis does not correlate to structural alterations or expression changes of the death receptor in papillary thyroid carcinomas. *Pathobiology* 2018;85:304-10.
- Gioti K, Papachristodoulou A, Benaki D, Havaki S, Beloukas A, Vontzalidou A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Mikros E, Tenta R. Silymarin enriched extract (*Silybum marianum*) additive effect on doxorubicin-mediated cytotoxicity in PC-3 prostate cancer cells. *Planta Med* 2019;85:997-1007.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.
- Guo W, Dong W, Li M, Shen Y. Mitochondria P-glycoprotein confers paclitaxel resistance on ovarian cancer cells. *Onco Targets Ther* 2019;12:3881-91.
- Khan K, Quispe C, Javed Z, Iqbal MJ, Sadia H, Raza S, Irshad A, Salehi B, Reiner Z, Sharifi-Rad J. Resveratrol, curcumin, paclitaxel and miRNAs mediated regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway: go four better to treat bladder cancer. *Cancer Cell Int* 2020;20(1):560.
- Klionsky DJ *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12(1):1-222.
- Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM, Chen ZS. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer* 2017;36(1):52-62.
- Lin SR, Chang CH, Hsu CF, Tsai MJ, Cheng H, Leong MK, Sung PY, Chen JC, Weng CF. Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: preclinical evidence. *Br J Pharmacol* 2020;177:1409-23.
- Liu K, Lee J, Kim JY, Wang L, Tian Y, Chan ST, Cho C, Machida K, Chen D, Ou JJ. Mitophagy controls the activities of tumor suppressor p53 to regulate hepatic cancer stem cells. *Mol Cell* 2017;68(2):281-92.
- Meschini S, Calcabrini A, Monti E, Del Bufalo D, Stringaro A, Dolfini E, Arancia G. Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 2000;5:615-28.
- Meschini S, Condello M, Calcabrini A, Marra M, Formisano G, Lista P, De Milito A, Federici E, Arancia G. The plant alkaloid voacamine induces apoptosis-independent autophagic cell death on both sensitive and multidrug resistant human osteosarcoma cells. *Autophagy* 2008;4:1020-33.
- Meschini S, Marra M, Calcabrini A, Federici E, Galeffi C, Arancia G. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaeifolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. *Int J Oncol* 2003;23:1505-13.
- Meschini S, Marra M, Condello M, Calcabrini A, Federici E, Dupuis ML, Cianfriglia M, Arancia G. Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaeifolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug-resistant tumor cells. *Int J Onc* 2005;27:1597-603.
- Nazio F, Bordi M, Cianfanelli V, Locatelli F, Cecconi, F. Autophagy and cancer stem cells: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death Differ* 2019;26(4):690-702.
- Pathania S, Bhatia R, Baldi A, Singh R, Rawala RK. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors' role in cancer resistance. *Biomed Pharmacother* 2018;105:53-65.

- Pendleton EG, Jamasbi RJ, Geusz ME. Tetrahydrocurcumin, Curcumin, and 5-Fluorouracil effects on human esophageal carcinoma cells. *Anticancer Agents Med Chem* 2019;19(8):1012-20.
- Ramsay EE, Dilda, PJ. Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Front Pharmacol* 2014;5:53-65.
- Shen G, Kong AN. Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of phase II drug metabolism enzymes and phase III drug transporters. *Biopharm Drug Dispos* 2009;30(7):345-55.
- Smith AG, Macleod KF. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *J Pathol* 2019;247(5):708-18.
- Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist* 2019;2:141-60.
- Wei Y, Liu M, Li X, Liu J, Li H. Origin of the autophagosome membrane in mammals. *Biomed Res Int*;2018:1012789.
- Wengong S, Shen J, Zheng H, Fan W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin Epigenet* 2019;11(1):25.
- Wilson TR, Johnston PG, Longley DB. Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:307-19.
- Yang, H, Villani, RM, Wang, H, Simpson, MJ, Roberts, MS, Tang, M, Liang, X. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2018;37:1-10.
- Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget* 2017;8:45117-32.