

L'ALCALOIDE VEGETALE VOACAMINA INDUCE MORTE AUTOFAGICA IN CELLULE TUMORALI UMANE FARMACORESISTENTI

Pasquale Lista (a, c), Maria Condello (a), Elena Federici (b), Gabriele Civitelli (a), Giuseppe Arancia (a), Stefania Meschini (a)

(a) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(b) Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

(c) Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata, Rionero in Vulture, Potenza

Introduzione

Le cellule tumorali esposte ad agenti citotossici possono sviluppare resistenza ai chemioterapici tradizionali e assumere il fenotipo polifarmacoresistente (MDR: *multidrug resistance*). Negli ultimi anni, sono state proposte numerose soluzioni per superare la farmacoresistenza nei tumori. L'utilizzo di sostanze naturali a concentrazioni subcitotossiche, in combinazione con i farmaci convenzionali, potrebbe rappresentare un importante contributo alla terapia antitumorale. L'interesse verso i prodotti naturali vegetali è in costante aumento grazie alla possibilità di sensibilizzare, mediante sostanze non tossiche, la cellula tumorale al trattamento farmacologico. La Voacamina (VOA), un alcaloide bisindolico vegetale, isolato dalla pianta infestante brasiliana *Peschiera fuchsiaefolia*, presenta attività antimicrobica e antimalarica contro ceppi di *Plasmodium falciparum* cloroquina resistenti. La malaria e il cancro apparentemente sembrano non avere nulla in comune, ma in realtà entrambe le patologie possono risultare refrattarie alla terapia a causa dell'insorgenza del fenotipo resistente, caratterizzato dalla sovraespressione della P-glicoproteina (P-gp), nota proteina di membrana che permette l'estruzione dello xenobiotico, riducendone l'accumulo intracellulare nonché l'effetto citotossico. Abbiamo precedentemente dimostrato come la VOA fosse in grado di inibire in modo competitivo la P-gp espressa in diverse linee cellulari tumorali farmacoresistenti – osteosarcoma umano (U-2 OS/DX), carcinoma del colon (LoVo-R), linfoblastoidi (CEM-R) – favorendo così l'accumulo intracellulare della doxorubicina (DOX) (7). Il risultato più interessante è stato che l'effetto citotossico così ottenuto non era dovuto all'induzione dell'apoptosi, ma le cellule tumorali così trattate andavano incontro a un meccanismo di morte cellulare autofagica.

L'autofagia è un processo catabolico che si osserva in alcune condizioni sperimentali tra cui la mancanza di nutrienti e/o di fattori di crescita o in risposta a varie condizioni di stress quali l'esposizione alle radiazioni ionizzanti, sostanze citotossiche e ipossia. L'autofagia in primo luogo, rappresenta quindi un processo catabolico che garantisce il mantenimento omeostatico delle cellule attraverso l'eliminazione di proteine alterate e di organelli danneggiati, permettendo così il riutilizzo di componenti necessari per lo svolgimento di importanti funzioni vitali (3). Alcuni recenti studi hanno dimostrato però che in diversi modelli cellulari tumorali l'induzione del processo autofagico può portare alla morte cellulare (4).

Le cellule di osteosarcoma umano farmacoresistenti sono state trattate con una concentrazione di VOA e per un periodo di tempo tali da indurre circa il 50% di morte nella popolazione trattata. In seguito sono state effettuate analisi morfologiche mediante l'utilizzo della microscopia elettronica a scansione (SEM), analisi dei markers tipici dell'apoptosi quali il test dell'Annexina V-FITC in citofluorimetria e il taglio della proteina PARP mediante tecnica di *western blotting* per confermare l'assenza di morte cellulare programmata.

Risultati e discussione

Studi recenti *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato l'importanza della comprensione dei meccanismi molecolari che regolano l'attivazione o la repressione del fenomeno autofagico nei tumori (7). Abbiamo quindi voluto approfondire il meccanismo di morte cellulare indotto dalla VOA in modo tale da individuarne i target molecolari. Tale conoscenza ci permetterà di valutare l'effettiva possibilità di un trattamento efficace in combinazione con altri farmaci.

Una cellula in apoptosi mostra evidenti caratteristiche morfologiche meglio individuabili mediante sistemi di microscopia ottica ed elettronica: la cellula diventa sferica e perde contatto con le cellule adiacenti; la cromatina comincia ad essere degradata e condensata; la cromatina continua il processo di degradazione e condensazione in corpi addossati al nucleolemma (2). Le cellule che non sono in grado di andare in apoptosi muoiono o per necrosi, che porta alla lisi della cellula per inefficienza metabolica, o per autofagia, processo catabolico di autodigestione. All'inizio del processo autofagico, proteine e organelli che devono essere degradati per poi essere riutilizzati, sono avvolti da strutture vacuolari caratterizzate da una doppia membrana, dette autofagosomi. Successivamente gli autofagosomi fondono con i lisosomi per formare gli autolisosomi, dove il materiale viene digerito dagli enzimi lisosomiali (5).

In precedenti studi abbiamo dimostrato che le cellule U-2 OS/DX, dopo trattamento con VOA, presentano strutture molto simili a vacuoli autofagici; ciò è stato dimostrato mediante l'utilizzo del microscopio elettronico a trasmissione (TEM); inoltre è stata evidenziata l'espressione della proteina LC3, noto marker degli autofagosomi, mediante microscopia confocale a scansione laser.

Questi dati preliminari ci hanno indotto a studiare meglio il meccanismo di morte cellulare indotto dalla VOA a concentrazioni citotossiche; pertanto la fase successiva del nostro studio ci ha portato ad escludere che si trattasse di apoptosi (morte cellulare programmata di tipo I).

Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) hanno evidenziato, nelle cellule U-2 OS/DX trattate con VOA, segni di danno cellulare, anche se la maggior parte delle cellule non mostrava segni morfologici tipici di cellule in apoptosi (Figura 1B). Le cellule di controllo (Figura 1A) mostrano una classica distribuzione uniforme dei microvilli e una forma abbastanza regolare, mentre in seguito a trattamento (Figura 1B) le cellule appaiono retratte e con forma irregolare seguita da una ridistribuzione dei microvilli di membrana. Paragonando le cellule trattate con VOA (Figura 1B) con quelle trattate con la Staurosporina (Figura 1C), noto induttore dell'apoptosi, si può escludere l'induzione di apoptosi da parte della VOA.

La valutazione dei parametri biochimici e morfologici ha confermato la non attivazione del *pathway* apoptotico (6). È stata analizzata l'esposizione superficiale della fosfatidilserina, evento primario del programma apoptotico. Le cellule trattate con VOA (5 µg/mL per 24 h), sono state marcate con ioduro di propidio (PI) e con Annessina V coniugata con FITC e analizzate in citofluorimetria (Figura 1D). Nell'esperimento rappresentativo riportato, i controlli delle U-2 OS/WT e delle U-2 OS/DX mostrano una percentuale di cellule Annessina V-negative e PI-negative (cellule vive) del 94,5% e del 96,2%, rispettivamente. Queste percentuali diminuiscono significativamente (47,6% e 50,8%) dopo trattamento con VOA. La percentuale totale delle cellule permeabili allo ioduro di propidio è del 45,9% per le U-2 OS/WT e del 40,1% per le U-2 OS/DX, mentre le annessina V-positive e PI-negative (cellule in apoptosi) è del 6,5% (U-2 OS/WT) e del 9,1% (U-2 OS/DX). Questi risultati sembrano suggerire che l'apoptosi avviene solo in una piccola percentuale di cellule. L'analisi tramite *Western blotting* del taglio della polimerasi ADP-ribosilasi (PARP), ampiamente accettato come marcatore dell'apoptosi (8), ha ulteriormente dimostrato l'assenza di tale fenomeno nelle cellule di osteosarcoma trattate con VOA (Figura 1E).

In conclusione i dati appena mostrati confermano che il trattamento di cellule di osteosarcoma umano trattate con VOA (5 µg/mL per 24 ore) induce morte cellulare autofagica e non apoptosi, quindi si può ben sperare per un futuro e promettente utilizzo di tale sostanza in terapia clinica. Inoltre, una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nel *pathway* autofagico rappresentano oggi la chiave di volta per individuare nuovi target molecolari, al fine di migliorare l'efficacia della terapia antitumorale nei confronti di fenotipi tumorali farmacoresistenti e/o apoptosi resistenti.

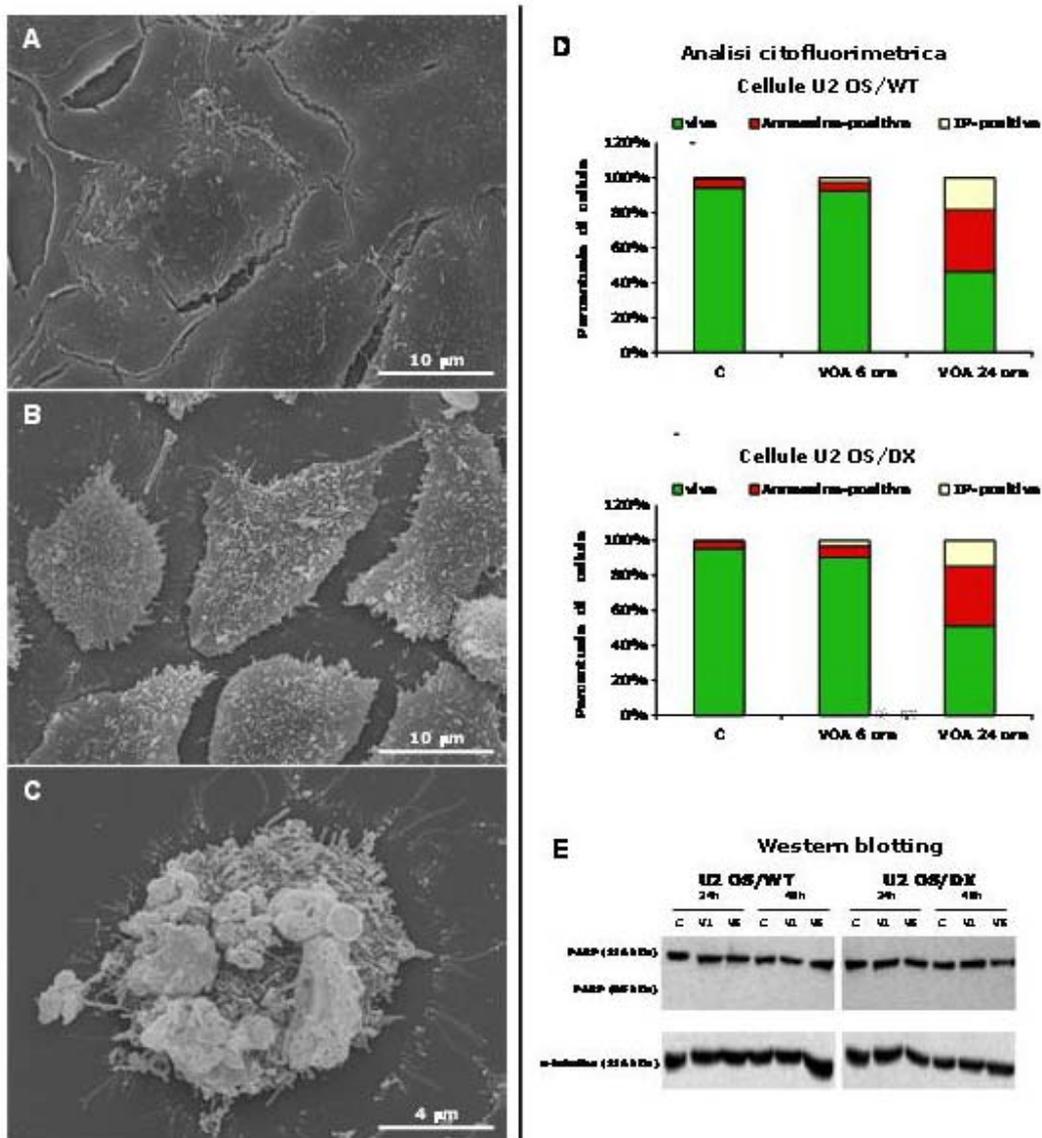


Figura 1. A) SEM - Controllo; B) SEM - trattamento con VOA; C) SEM - trattamento con Staurosporina; D)Analisi citofluorimetrica di cellule trattate con VOA 5 µg/mL per 6 ore e per 24 ore; sono state successivamente doppiamente marcate con ioduro di propidio (PI) e con Annessina V coniugata con FITC; E) Western blotting: analisi di PARP dopo trattamento con VOA tempo- e dose-dipendente delle linee cellulari U-2 OS/WT e U-2 OS/DX

Bibliografia

1. Jin S and White E. Role of autophagy in cancer. *Autophagy* 2007;3:28-31.
2. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002;181-182:471-4.
3. Klionsky DJ and Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000;290:1717-21.
4. Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Natur Rev Cancer* 2005;5:726-34.
5. Kroemer G, Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005;5:886-97.
6. Lecoeur H, Gougeon ML. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexinV/propidium iodide assay. *Cytometry* 2001;44:65-72.
7. Meschini S, Marra M, Condello M, Calcabrini A, Federici E, Dupuis ML, Cianfriglia M, Arancia G. Voacamine, an alkaloid extracted from *Peschiera fuchsiaefolia*, inhibits P-glycoprotein action in multidrug resistant tumor cells. *Int J Onc* 2005;27:1597-603.
8. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J* 1996;10:587-97.