

Titolo: Acido ascorbico e cancro: una revisione - Ascorbic Acid and Cancer: A Review

Codice: ASC005

Autore: Cameron et al.

Data: 1979

Rivista: *Cancer Research* 39(3): 663-681

Argomento: acido ascorbico

Accesso libero: si

DOI: PMID: 371790

URL: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/39/3/663/483494/Ascorbic-Acid-and-Cancer-A-Review1>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2024/06/03/asc005-cameron-et-al-1979/>

Parole chiave: vitamina c, ascorbato, scorbuto, cancro, matrice extracellulare, glucosaminoglicani, proteoglicani, collagene, resistenza, immunocompetenza, ossido-riduzione, energia

Tumore: n/a

Traduzione: totale&fedele

Punti di interesse: [vedi file allegato](#)

Traduzione articolo

### Riassunto

**La resistenza dell'ospite alla crescita e all'invasività neoplastica è riconosciuta come un fattore importante nel determinare l'insorgenza, il progresso e l'esito finale di ogni malattia tumorale. Vengono brevemente passati in rassegna i fattori coinvolti nella resistenza dell'ospite e viene presentata in dettaglio la relazione tra questi fattori e il metabolismo dell'acido ascorbico. È dimostrato che molti fattori coinvolti nella resistenza dell'ospite alla neoplasia dipendono in modo significativo dalla disponibilità di ascorbato.**

### Introduzione

Pochi oggi contesterebbero che il comportamento di ogni cancro umano è determinato in misura significativa dalla resistenza naturale del paziente alla sua malattia. Di conseguenza, è ormai ampiamente riconosciuto che si potrebbero ottenere benefici sostanziali nella gestione del cancro se si potessero ideare metodi pratici per aumentare la resistenza.

C'è un crescente corpo di prove teoriche e pratiche che suggeriscono che la disponibilità di ascorbato è il fattore determinante nel controllare e potenziare molti aspetti della resistenza dell'ospite al cancro. Abbiamo preparato questa recensione come aiuto agli investigatori in questo campo e come fonte di informazioni per gli altri.

### Storia

La storia della vitamina C è conoscenza comune. A metà del XVIII secolo James Lind dimostrò che

il succo degli agrumi freschi cura lo scorbuto (197). L'agente attivo, la forma enolica del 3-cheto-L-gulofuranlattone, battezzato acido ascorbico o vitamina C, fu isolato alla fine degli anni '20 da Albert Szent-Györgyi (317). Verso la metà degli anni '30 furono ideati metodi per sintetizzare il composto, che presto divenne ampiamente disponibile a basso costo. Fu presto stabilito che la sostanza era praticamente non tossica a qualsiasi dosaggio. La struttura della vitamina C è mostrata nel Grafico 1.

La funzione fondamentale della vitamina C è la prevenzione dello scorbuto. L'attuale dose dietetica raccomandata dal Food and Nutrition Board dell'Accademia Nazionale delle Scienze degli Stati Uniti - Consiglio Nazionale delle Ricerche, 45 mg al giorno per un adulto, è adeguata per prevenire lo scorbuto essenzialmente in tutte le persone normali. La domanda se un'assunzione maggiore potesse o meno portare a una salute migliore e a un maggiore controllo delle malattie è stata fatta non appena il composto puro è diventato liberamente disponibile, e il dibattito continua.

I nostri precedenti suggerimenti secondo i quali l'ascorbato potrebbe essere di qualche valore nel trattamento di supporto del cancro (54, 55, 60) suscitò ulteriori polemiche, anche se meno di quanto ci si potesse aspettare. Il cancro non trattato segue quasi invariabilmente un decorso inesorabilmente progressivo, offrendo per lo meno l'opportunità di misurare l'effetto terapeutico. Inoltre, è ben noto che i pazienti affetti da cancro hanno un fabbisogno significativamente maggiore di questo nutriente, vi sono prove convincenti che esso possa essere implicato in molti meccanismi riguardanti la resistenza dell'ospite alla crescita maligna invasiva, ed esistono alcuni rapporti clinici sperimentali e pilota che indicano che la somministrazione di ascorbato in quantità sostanzialmente superiori ai livelli di base raccomandati nella dieta esercita effettivamente qualche beneficio terapeutico.

Il nostro interesse è nato dalla realizzazione che l'acido ascorbico, noto per essere necessario per la sintesi del collagene, potrebbe essere necessario in quantità maggiori per l'incapsulamento protettivo dei tumori (253) e dalla conclusione simultanea indipendente che la molecola di ascorbato (o alcuni residui a causa di ciò) devono essere coinvolti nell'inibizione a feedback delle glicosidasi lisosomiali (60) responsabili della invasività maligna (48). Da questi inizi congiunti è arrivata la consapevolezza che l'acido ascorbico potrebbe essere implicato in molti altri aspetti della resistenza dell'ospite e persino la proposta provvisoria che la resistenza dell'ospite, non importa quanto misurata, dipenda in definitiva dalla disponibilità di acido ascorbico.

Abbiamo pubblicato una serie di rapporti clinici che indicano risposte favorevoli nel cancro umano avanzato a nessun trattamento specifico se non dosi regolari ed elevate di ascorbato (51-53, 56-59), ma finora non è stato effettuato alcuno studio adeguatamente progettato per confermare o confutare questi risultati e, se confermati, determinare il dosaggio più efficace. La nostra speranza è che tali studi vengano presto intrapresi, e ci aspettiamo che, sulla base di solide prove statistiche fornite da tali studi, l'ascorbato supplementare diventi presto una parte essenziale di tutti i regimi pratici di trattamento e prevenzione del cancro.

Presentiamo di seguito alcune delle prove esistenti a sostegno della nostra tesi. Innanzitutto attiriamo l'attenzione su alcune somiglianze tra lo scorbuto e il cancro.

### **Scorbuto e cancro**

Qualsiasi discussione sulla funzione biologica dell'acido ascorbico deve iniziare con una considerazione dello scorbuto, la "base di riferimento" universalmente accettata e, se non trattata, la malattia invariabilmente fatale derivante da una grave carenza alimentare di ascorbato.

Lo scorbuto, una malattia ormai rara nella sua forma franca, è una sindrome di disintegrazione generalizzata dei tessuti a tutti i livelli, che comporta la dissoluzione della sostanza fondamentale intercellulare, la rottura dei fasci di collagene e la lisi dei cementi interepiteliali e interendoteliali, portando all'ulcerazione con colonizzazione batterica secondaria e alla disorganizzazione vascolare con edema ed emorragia interstiziale, e anche a una caratteristica raramente enfatizzata in

letteratura, la proliferazione cellulare indifferenziata generalizzata con cellule specializzate in tutto il tessuto che ritornano a una forma primitiva (350).

La patologia dello scorbuto è stata riassunta come “una rottura strutturale generalizzata della matrice intercellulare associata a proliferazione cellulare indifferenziata, o in termini evolucionistici (ammesso che un tale individuo in via di disintegrazione possa essere mantenuto in vita), il graduale ritorno dalla condizione multicellulare ad un primitivo stato unicellulare (50).

Seguendo ulteriormente questa visione teorica, si potrebbe considerare lo scorbuto (proliferazione cellulare indifferenziata generalizzata con disgregazione generalizzata della matrice) come una varietà “omnifocale” di malattia neoplastica.

Il defunto dottor William McCormick di Toronto sembra essere stato il primo a riconoscere che i cambiamenti stromali generalizzati dello scorbuto sono identici ai cambiamenti stromali locali osservati nelle immediate vicinanze delle cellule neoplastiche invasive (211). Egli ipotizzò che la sostanza nutritiva (vitamina C) nota per essere in grado di prevenire tali cambiamenti generalizzati nello scorbuto potrebbe avere effetti simili nel cancro, e l'evidenza (da rivedere più avanti) che i pazienti affetti da cancro sono quasi invariabilmente depleti di ascorbato diede supporto alla sua opinione.

Esistono altre associazioni interessanti tra lo scorbuto e il cancro. Ci sono alcune prove epidemiologiche (riviste di seguito) che indicano che l'incidenza del cancro in grandi gruppi di popolazione è inversamente correlata all'assunzione media giornaliera di ascorbato. Non esiste alcuna reale prova moderna che i pazienti francamente scorbutici soccombano al cancro, presumibilmente perché tali pazienti o muoiono abbastanza rapidamente a causa del loro stato di estrema carenza vitaminica o, più probabilmente, vengono prontamente diagnosticati e rapidamente curati. Tuttavia, la letteratura storica contiene molte allusioni all'aumento della frequenza di “cancri e tumori” nelle vittime dello scorbuto. Un tipico rapporto di autopsia di James Lind (197) contiene frasi come “...tutte le parti erano così mescolate e unite insieme per formare una massa o un grumo che i singoli organi non potevano essere identificati”, la descrizione dell'infiltrazione neoplastica di un anatomista morbo del XVIII secolo.

Infine, nel cancro umano avanzato, le caratteristiche premortali di anemia, cachessia, estrema stanchezza, emorragie, ulcerazioni, suscettibilità alle infezioni e livelli anormalmente bassi di ascorbato nei tessuti, nel plasma e nei leucociti, con insufficienza surrenalica terminale, sono virtualmente identici ai sintomi premortali caratteristici dello scorbuto umano avanzato.

### **Resistenza dell'ospite al cancro**

È noto che molti fattori sono coinvolti nella resistenza dell'ospite alla crescita invasiva maligna.

Questi possono essere convenientemente suddivisi in fattori stromali che agiscono localmente e altri che agiscono a livello sistemico.

La resistenza stromale è esercitata principalmente dalla capacità dell'ospite di incapsulare le cellule neoplastiche in una barriera di tessuto fibroso densa e praticamente impenetrabile. La barriera collagene è scarsa e mal definita nei tumori invasivi altamente anaplastici, in quantità moderata nei tumori con moderata rapidità di crescita e molto abbondante nei tumori “contenuti” scirrosi atrofici a crescita lenta. In ogni individuo, il grado di fibrosi stromale è lo stesso intorno alla crescita primaria e alle sue metastasi, indicando una risposta costituzionale. Altri importanti fattori stromali nella resistenza sono (a) la resistenza della sostanza fondamentale intercellulare all'infiltrazione locale e (b) il grado di risposta linfocitaria. I linfociti sono più numerosi nello stroma dei tumori a crescita lenta e scarsi o praticamente assenti attorno alle lesioni a crescita rapida, e ancora una volta il grado di infiltrazione linfocitaria è identico attorno alla crescita primaria e alle sue metastasi, indicando una risposta costituzionale. Una risposta linfocitaria vivace indica una maggiore resistenza dell'ospite ed è associata a una prognosi più favorevole.

I fattori sistemici sono meno chiaramente definiti. Si tratta di fattori costituzionali come l'efficienza

relativa del sistema immunitario, meccanismi di feedback coinvolti nel contenimento degli enzimi "invasivi" e, almeno per alcuni tumori, lo stato ormonale dell'individuo.

La capacità di portare in modo sicuro la resistenza dell'ospite ai livelli massimi in ogni paziente migliorerebbe notevolmente il trattamento del cancro. È nostra intenzione dimostrare che il metabolismo dell'acido ascorbico è implicato in tutti questi meccanismi di resistenza e che l'ingestione di questa sostanza in quantità adeguate potrebbe fornire un metodo semplice e sicuro per raggiungere questo obiettivo desiderabile.

### **Chimica dell'acido ascorbico e della matrice intercellulare**

L'acido ascorbico è di enorme importanza biologica. È una delle sostanze riducenti più importanti che si conosca naturalmente nei tessuti viventi e sin dalla sua scoperta è stata oggetto di numerose indagini, teorie e revisioni esaustive (50, 66, 140, 181, 195, 213, 251, 254, 313, 350). Non sarebbe opportuno recensire qui questa voluminosa letteratura. Proponiamo di limitare la nostra discussione ad aree di particolare rilevanza per il cancro.

Due punti meritano di essere sottolineati subito: (a) sebbene la maggior parte degli animali possa sintetizzare l'acido ascorbico, un essere umano non può, e dipende totalmente dall'assunzione alimentare per soddisfare tutte le sue esigenze; (b) l'acido ascorbico, noto per essere essenziale per l'integrità strutturale della matrice intercellulare, è strettamente correlato all'acido glucuronico, un elemento essenziale delle principali strutture della matrice.

Questo ci porta a considerare la matrice intercellulare. Nel secolo scorso l'eminente patologo Rupert Virchow ha rivoluzionato la sua specialità focalizzando l'attenzione sulla natura "cellulare" della malattia. Abbiamo l'impressione di essere nel mezzo di una seconda rivoluzione nella patologia con il riconoscimento che le cellule non esistono nello spazio "vuoto".

La cellula è ancora dominante, ma oggi si apprezza sempre più che per ogni azione, fisiologica o patologica, della cellula, esiste una reazione appropriata nell'immediato ambiente extracellulare. Tutte le cellule dei tessuti del corpo sono saldamente immerse in una sostanza fondamentale altamente viscosa. Questo materiale ubiquitario può essere scarso o abbondante e presentarsi a vari gradi di aggregazione molecolare, a seconda del particolare organo studiato, ma fondamentale è di distribuzione universale, pervade ogni interspazio e isola ogni cellula da quella vicina. Costituisce l'ambiente di contatto immediato di tutte le cellule e deve essere attraversato da ogni molecola che entra o esce dalla cellula.

Le variazioni nella composizione fisico-chimica dell'ambiente extracellulare (polimerizzazione-depolimerizzazione) esercitano una profonda influenza sul comportamento cellulare e, a loro volta, le cellule possiedono un potente mezzo per modificare il loro microambiente immediato. Una cellula proliferante e il suo ambiente di contatto costituiscono un sistema equilibrato in cui ciascuna componente influenza l'altra; questa interdipendenza è coinvolta in tutte le forme di divisione cellulare ed è di particolare importanza nel cancro (54).

La sostanza fondamentale della matrice intercellulare è un gel acquoso complesso contenente elettroliti, metaboliti, gas disciolti, oligoelementi, vitamine, ormoni, enzimi, carboidrati, grassi e proteine. La sua importante proprietà strutturale di estrema viscosità dipende dall'abbondanza di alcuni polimeri mucopolisaccaridici a catena lunga, i glicosaminoglicani e i relativi proteoglicani. Questi polimeri ad alto peso molecolare intrecciati formano una rete idrofila strutturalmente stabile, che, a sua volta, è rinforzata a livello microscopico da una rete tridimensionale di fibre di collagene. Questo è il vero *milieu interieur* di Claude Bernard, all'interno del quale si svolge tutta l'attività cellulare.

La chimica dei glicosaminoglicani e dei proteoglicani è oggetto di molti studi contemporanei e sono disponibili alcune eccellenti revisioni (10, 103, 171, 189, 240, 241). I glicosaminoglicani sono polimeri a catena lunga a filamento singolo con pesi molecolari che vanno fino a  $10 \times 10^6$ . Le varietà comuni sono l'acido ialuronico (costituito da unità ripetitive alternate di N-acetilglucosamina

e acido glucuronico), condroitina (costituita da N-acetil galattosamina e acido glucuronico) e esteri solfati (i condroitin solfati), di cui esistono diversi isomeri.

I proteoglicani sono macromolecole con una struttura multiramificata più complessa. Le prove attuali indicano che essi sono costituiti da un nucleo primario di glicosaminoglicani, al quale sono attaccati, tramite proteine di collegamento, nuclei proteici secondari a intervalli distanziati, ai quali sono attaccati polimeri di glicosaminoglicani terziari. Va notato che i proteoglicani della matrice non sono una singola specie molecolare ma comprendono una famiglia di macromolecole piuttosto simili che differiscono per complessità, peso molecolare, dimensione idrodinamica, composizione chimica e reattività (132).

Nei tessuti sani, la matrice intercellulare viene mantenuta in un equilibrio stazionario di cambiamento dinamico molto lento, con la formazione di nuove macromolecole (polimerizzazione) bilanciata dal ricambio e dal decadimento (depolimerizzazione). A livello locale, nel cancro, la depolimerizzazione della matrice nelle immediate vicinanze delle cellule invasive in proliferazione è una caratteristica sorprendente; questo è esattamente il cambiamento osservato su scala generalizzata nello scorbuto (48, 50).

La depolimerizzazione dei glicosaminoglicani della matrice è determinata dall'azione sequenziale della "ialuronidasi". Questa sequenza di glicosidasi lisosomiali coinvolge prima un'endoglicosidasi ("vera" ialuronidasi) che scinde il polimero a catena lunga in tetrasaccaridi; a questa azione fa seguito l'azione concertata di 2 esoglicosidasi, la  $\beta$ -glucuronidasi e la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasi ( $\beta$ -N-acetil galattosaminidasi nel caso delle condroitine). Il tetrasaccaride è l'inibitore a feedback dell'endoglicosidasi ma è anche il substrato delle esoglicosidasi.

Pertanto, qualsiasi interferenza con quest'ultimo inibirà l'intero processo (152, 309).

La depolimerizzazione dei proteoglicani della matrice è provocata dall'azione combinata delle glicosidasi e delle proteasi neutre, che si ritiene vengano rilasciate simultaneamente dai lisosomi cellulari durante la divisione cellulare.

Sembra ormai ragionevolmente certo che il continuo rilascio di questi enzimi idrolitici dalle cellule neoplastiche sia responsabile della loro capacità invasiva, del percorso selettivo attraverso una maggiore diffusione dei nutrienti verso le cellule tumorali, e forse anche del sostegno dell'intero slancio della proliferazione neoplastica autonoma (48, 54).

L'effetto di questi enzimi idrolitici sulla matrice è quello di rilasciare nel flusso sanguigno un intero spettro di prodotti di degradazione dei glicosaminoglicani e delle glicoproteine, i cosiddetti "reattivi della fase acuta", la cui stima costituisce la base per la maggior parte dei processi test sierochimici per il cancro.

Anche la componente collagene della matrice extracellulare è suscettibile alla stessa attività enzimatica idrolitica.

Le fibrille di collagene sono legate insieme in fibre di collagene microscopicamente visibili dalla sostanza del cemento della matrice (140).

Più specificamente, la microscopia elettronica mostra un preciso allineamento molecolare dei proteoglicani lungo le catene di collagene (191). Le interazioni ioniche tra i residui di lisina e arginina caricati positivamente del collagene polimerico e i gruppi di glicosaminoglicani e acido proteoglicano solfonico caricati negativamente, insieme alla formazione di legami idrogeno, offrono una probabile spiegazione per questa "adesività" (311).

La degradazione enzimatica di tali legami reticolanti vitali nelle immediate vicinanze delle cellule neoplastiche potrebbe provocare la dissoluzione e la "scomparsa microscopica" di questa impalcatura molecolare essenziale. Tale disintegrazione strutturale è, ovviamente, abbastanza caratteristica dell'erosione stromale osservata nelle immediate vicinanze di escrescenze altamente maligne.

Per quanto riguarda la fibrillogenesi del collagene e la sua rilevanza specifica per l'incapsulamento del tumore, sembra chiaro che le interazioni specifiche con glicosaminoglicani e proteoglicani

extracellulari svolgono un ruolo essenziale (132). Esiste ora un numero schiacciante di prove (191, 201, 202, 205, 206, 311) a sostegno della visione originariamente proposta da Meyer (215) secondo cui i polimeri della matrice a catena lunga con le loro spaziatore anioniche regolari forniscono lo stampo molecolare essenziale per la precisa deposizione ordinata dei precursori del collagene e la loro regolare disposizione sequenziale nelle fibrille di collagene.

Pertanto, la dissoluzione enzimatica della matrice inibirebbe anche la formazione di nuovo collagene.

Qualsiasi misura in grado di proteggere l'integrità della matrice intercellulare (a) ritarderà efficacemente l'infiltrazione maligna, (b) limiterà la nutrizione selettiva dei tumori, (c) proteggerà le barriere collagene preesistenti dall'erosione neoplastica e (d) faciliterà l'incapsulamento protettivo del collagene. Questa è una funzione importante dell'acido ascorbico.

### **La maggiore richiesta di acido ascorbico nel cancro**

La tesi che l'ascorbato sia coinvolto nella resistenza alla neoplasia trova sostegno nei numerosi studi che dimostrano che i pazienti affetti da cancro hanno riserve di ascorbato anormalmente basse. Quando questo fu dimostrato per la prima volta molti anni fa, si tendeva a supporre che tale scoperta riflettesse semplicemente lo scarso stato nutrizionale generale dei pazienti affetti da cancro in stadio avanzato. Tale visione non è più sostenibile, ed è ormai generalmente riconosciuto che bassi livelli di cancro indicano un maggiore utilizzo e fabbisogno di vitamina.

L'aumento dell'utilizzo dell'ascorbato, misurato dall'esaurimento delle riserve di ascorbato, non è affatto limitato al cancro; è un aspetto caratteristico di molti altri disturbi "proliferativi cellulari", come l'infiammazione (17, 91), e dei processi riparativi dopo trauma chirurgico (88, 89), infarto miocardico (160, 161) e ustioni termiche (16).

Gli ultimi 3 studi dimostrano che l'ascorbato viene rimosso dalle riserve circolanti e concentrato nel sito del processo riparativo.

Uno spostamento simile dell'ascorbato dalle riserve allo stroma del tumore è stato dimostrato nel cancro. Studi sulle cavie hanno dimostrato che l'acido ascorbico è selettivamente concentrato nel tessuto canceroso e, di conseguenza, i tessuti normali sono impoveriti (39,315, 336). Dyerand Ross (109) studiò il contenuto di ascorbato nei tessuti di topi portatori di un'ampia varietà di tumori, e in tutti gli esempi la concentrazione di ascorbato era maggiore nel tumore che nel fegato del rispettivo ospite. Dodd e Giron-Conland (101), utilizzando la risonanza di spin elettronico, hanno dimostrato che il radicale ascorbico è presente in un'ampia varietà di tumori in concentrazione maggiore rispetto ai corrispondenti tessuti normali.

Anche il tessuto tumorale umano contiene livelli elevati di ascorbato. Goth e Littman (139) hanno dimostrato per una varietà di tumori umani. Chinoy (69) ha riferito che certi tumori umani contengono livelli di ascorbato molto maggiori rispetto al loro tessuto di origine, e utilizzando tecniche istochimiche hanno dimostrato che la maggiore concentrazione di ascorbato era depositata alla periferia del tumore, contro il margine invasivo in continua crescita. In 29 pazienti su 30, Moriarty et al. (225) hanno riscontrato che il livello nei tumori era superiore a quello nei tessuti circostanti.

La concentrazione di ascorbato nello stroma del tumore determina un impoverimento misurabile delle riserve circolanti. La tabella 1 elenca gli studi che sono stati effettuati, confrontando i valori nei pazienti affetti da cancro con quelli ottenuti nei controlli normali.

L'aumento del fabbisogno di ascorbato nel cancro può essere dimostrato anche mediante test di carico di ascorbato (18, 49, 126, 127, 186, 217). Tutte queste indagini hanno mostrato un maggiore utilizzo di ascorbato da parte dei soggetti affetti da cancro.

I risultati combinati di tutti questi studi mostrano che gravi carenze di ascorbato nel sangue e nei leucociti sono una caratteristica del cancro. Pertanto, indipendentemente dagli effetti terapeutici specifici suggeriti, la sostituzione di questo deficit dovrebbe far parte di tutti i regimi terapeutici

completi contro il cancro.

### **Acido ascorbico e resistenza dell'ospite alla neoplasia**

Il metabolismo dell'ascorbato può essere implicato in una serie di meccanismi di resistenza dell'ospite funzionanti sia a livello stromale che sistemico.

**Ascorbato, ialuronidasi e matrice intercellulare.** L'invasività è uno degli attributi fondamentali e distintivi delle cellule tumorali maligne, conferendo loro la capacità non solo di infiltrarsi negli interstizi dei tessuti locali ma anche di ulcerarsi attraverso le barriere membranose e di penetrare nei vasi linfatici, nei vasi sanguigni e in altri spazi preformati e quindi produrre metastasi remote mediante trasferimento passivo. L'integrità strutturale della matrice della sostanza fondamentale è la prima barriera all'invasività.

La depolimerizzazione della matrice adiacente viene invariabilmente osservata nelle immediate vicinanze delle cellule neoplastiche invasive, e ora vi sono molte prove che il meccanismo dell'invasività maligna dipende dal rilascio continuo di glicosidasi lisosomiali (ialuronidasi) e forse di altri enzimi lisosomiali degradativi (la proteasi neutre e collagenasi) dalle cellule invasori; vedere la recensione di Cameron (48) e le pubblicazioni di Balazs e von Euler (11), Fiszer-Szafarz et al. (116-120), Harris et al. (152) e Grossfeld (147).

L'endoglicosidasi ha un peso molecolare di circa 80.000 (6, 7). Altri enzimi lisosomiali sono le esoglicosidi, le proteasi, la collagenasi, la nucleasi, le solfatasi e le fosfatasi. Il rilascio di ialuronidasi dalla cellula tumorale è solitamente accompagnato dal rilascio di quantità maggiori di altri enzimi lisosomiali, come è stato dimostrato per un'ampia varietà di tumori sperimentali e umani (93, 110, 120, 172, 190, 282, 292, 316).

L'impatto di questo continuo deflusso di enzimi lisosomiali sul microambiente immediato è quello di determinare profondi cambiamenti nella struttura fisico-chimica della matrice. Questi cambiamenti, principalmente la dissoluzione e la depolimerizzazione dei glicosaminoglicani e dei proteoglicani della matrice, distruggono la stabilità strutturale della micella molecolare, con una brusca caduta della viscosità locale della sostanza fondamentale che porta ad una diminuzione dell'adesività reciproca delle cellule tumorali (76, 212), alla loro maggiore motilità (1) e, cosa più importante di tutte, l'erosione della barriera strutturale immediata all'infiltrazione maligna (48). Questi cambiamenti pericellulari locali della depolimerizzazione della matrice, che colpiscono tutte le barriere, dalla membrana cellulare al cemento interendoteliale dei capillari stromali, darebbero luogo a zone locali di maggiore diffusione capillare e tissutale e potrebbero spiegare la cosiddetta nutrizione selettiva dei tumori, la fin troppo familiare immagine di un tumore fiorente che cresce parassitario in un ospite che muore costantemente per inanizione nutrizionale cachettica (48). Pertanto, se potessimo stabilizzare le interrelazioni della matrice cellulare nel cancro e, più in particolare, trovare un metodo per inibire in modo sicuro le glicosidasi delle cellule tumorali, dovremmo possedere un mezzo non solo per limitare l'invasività maligna ma anche per ritardare la proliferazione delle cellule maligne privando queste cellule della loro stato nutrizionale favorevole. Si tratta di un obiettivo terapeutico altamente auspicabile, ma i benefici potrebbero essere ancora maggiori.

Il seguente concetto di lavoro è stato pubblicato da Cameron nel 1966 (48) ed elaborato da Cameron e Pauling nel 1973 (54):

*"Tutte le cellule dei tessuti hanno una tendenza intrinseca a dividersi, ma questa tendenza è normalmente frenata dalla natura viscosa del loro intimo ambiente extracellulare di glicosaminoglicani, sostanze fondamentali ad alto peso molecolare. La proliferazione viene avviata dal rilascio cellulare di ialuronidasi, che consente alla cellula la libertà locale di dividersi e di migrare all'interno dei limiti del campo alterato. La proliferazione continuerà finché la ialuronidasi viene rilasciata. La proliferazione cesserà, e il normale contenimento e organizzazione dei tessuti verranno ripristinati quando la produzione di ialuronidasi tornerà alla normalità".*

Secondo questo concetto, l'unica differenza tra la proliferazione cellulare "neoplastica" e quella "normale" è la persistenza del rilascio di ialuronidasi nella prima.

È una caratteristica comune delle reazioni enzima-substrato che l'accumulo di sottoprodotti eserciti un effetto inibitorio di feedback. Pertanto, non è una sorpresa scoprire che è stato dimostrato sperimentalmente che i residui di glicosaminoglicani fino alla D-glucosamina inibiscono la crescita del sarcoma 37 (264, 273), del sarcoma 180 (22, 23), del carcinoma Walker 256 (24, 224), vari carcinomi ascitici (21, 22, 223) e carcinomi epidermoidi (121), sebbene la N-acetilglucosamina e gli zuccheri neutri non hanno causato alcun effetto (23, 223). È interessante notare che è stato riportato che la glucosamina inibisce la biosintesi di proteine, RNA e DNA negli esperimenti di assorbimento di marcatori in vitro (21, 24). Recentemente, Schaffrath et al. (281) hanno dimostrato l'inibizione delle polimerasi DNA-dipendenti e RNA-dipendenti nonché della RNA polimerasi DNA-dipendente da parte di una varietà di glicosaminoglicani solfati.

Test in vitro hanno dimostrato che i residui di condroitin solfato (6, 7) e altri acidi polisaccaridi polisolforici (8), inclusa l'eparina, un glicosaminoglicano polisolfato, sono inibitori della ialuronidasi (135, 136). Rutina (194), esperidina e derivati (20) e polifloretina fosfato (75) mostrano in vitro l'inibizione della ialuronidasi e stabilizzano anche i lisozimi (326). È stata segnalata l'inibizione della ialuronidasi da parte dei bioflavonoidi e composti correlati (125, 207, 239). Stephens et al. (309) hanno recentemente dimostrato che il tiomalte dell'oro è un efficace inibitore della ialuronidasi, ma non siamo a conoscenza di alcuna segnalazione del suo utilizzo nel cancro sperimentale o umano.

Il nostro interesse speciale si è concentrato sull'esistenza nel siero di tutte le specie di una specifica frazione glicoproteica nota come PHI (Le sigle utilizzate sono: PHI, inibitore fisiologico della ialuronidasi; UHP, idrossiprolina urinaria; Acido 3-HOA, 3-idrossiantranilico). La concentrazione sierica di PHI rimane entro un intervallo notevolmente ristretto in condizioni di salute, ma aumenta notevolmente in una varietà di stati patologici, comprese infezioni, guarigione di ferite, artrite reumatoide e cancro (133, 134, 153, 175). Per questo motivo, il siero dei pazienti affetti da cancro inibisce la ialuronidasi in vitro (116, 150). Finora, la PHI non è stata completamente caratterizzata, ma è stata identificata come una glicoproteina con un peso molecolare di circa 100.000 (207, 238). La glucosamina e gli acidi uronici sono i principali costituenti del PHI (238), e sembra chiaro che la frazione consiste di una catena polipeptidica alla quale è attaccato un residuo di glicosaminoglicano che è stato modificato per conferirgli la sua potente e altamente specifica attività inibitoria. Nel 1972, abbiamo suggerito che la modifica fosse la sostituzione di uno o più residui di acido glucuronico nel prodotto di depolimerizzazione del glicosaminoglicano con l'acido ascorbico, dalla sua stretta relazione chimica (60). Appare ormai chiaro che il componente attivo del PHI è un tetrasaccaride con un'unità terminale di acido glucuronico sostituita da un residuo di ascorbato, resistente all'attività esoglicosidasi, e quindi capace di bloccare l'intero processo di depolimerizzazione dei glicosaminoglicani.

L'ipotesi che l'acido ascorbico sia necessario per la sintesi del PHI offre una spiegazione convincente per la sua funzione biologica nel prevenire lo scorbuto, uno stato di depolimerizzazione generalizzata della matrice causato dall'esposizione alla ialuronidasi non inibita, prodotta durante il corso della normale divisione e sostituzione cellulare (50). Spiega anche, in parte, perché c'è un aumento del fabbisogno di ascorbato in tutti gli stati di proliferazione cellulare, compreso il cancro. Soddisfare questo requisito rafforzato aumentando l'assunzione dovrebbe consentire a questo meccanismo di contenimento di funzionare con la massima efficienza.

Poiché l'esperienza clinica quotidiana conferma che l'ascorbato è necessario per una guarigione e una riparazione soddisfacenti delle ferite, il presupposto naturale è stato che questa vitamina sia essenziale per la crescita. Offriamo l'ipotesi alternativa che la funzione primaria della vitamina C sia quella di frenare la crescita eccessiva attraverso la sua incorporazione nel sistema PHI, indirizzando la capacità proliferativa intrinseca di tutte le cellule in un modello di comportamento differenziato

organizzato e vincolato.

Così, nel semplice esempio della guarigione delle ferite, la fase iniziale di proliferazione cellulare produce la depolimerizzazione della matrice immediata e il rilascio di quantità misurabili di residui di glicosaminoglicani nel flusso sanguigno, lì per assorbire le riserve di ascorbato per portare ad un aumento dei livelli di PHI, il tutto poi seguito abbastanza rapidamente mediante inversione in una fase di guarigione, di cellule quiescenti e a riposo, reintegrate in una matrice ristabilizzata, con il ritorno di questi indici biochimici ad uno stato di equilibrio stazionario. In assenza di ascorbato, cioè nello scorbutico, le ferite non riescono a guarire, persiste una matrice destabilizzata, “granulomi” proliferativi di cellule indifferenziate e la continua fuoriuscita di sottoprodotti della matrice degradata nel flusso sanguigno (260, 279).

In *vitro*, è stato riportato che la reazione dell'ascorbato con acido ialuronico e condroitin solfato produce prodotti di degradazione di viscosità leggermente inferiore rispetto ai preparati originali (303). L'acido ascorbico inibisce anche la ialuronidasi in vitro in condizioni che precludono la possibilità di produzione di PHI, ma è stato dimostrato che ha un effetto molto maggiore in vivo, indicando chiaramente l'esistenza di qualche meccanismo intermedio (267).

Un recente breve rapporto di Shapiro et al. (295) indica che le cavie prescorbutiche hanno aumentati piuttosto che diminuiti livelli di PHI, e questo è difficile da conciliare con il modello generale. Una possibile spiegazione di questa apparente contraddizione potrebbe risiedere nella scoperta di Fiszer-Szafarz (117) secondo cui il siero contiene diverse frazioni di inibitori della ialuronidasi distinguibili mediante l'uso di diverse tecniche di laboratorio.

La realizzazione che il termine “ialuronidasi” abbraccia una sequenza di enzimi degradativi correlati ha dato origine a una certa confusione in letteratura. Pertanto, molti ricercatori hanno affermato che le cellule neoplastiche producono quantità significativamente maggiori di ialuronidasi, ma altri ricercatori non sono stati in grado di confermarlo; vedere i riferimenti nella recensione di Cameron (48). Tuttavia, non sembra esserci alcun dubbio sul fatto che le cellule neoplastiche rilascino quantità significativamente maggiori di esoglicosidasi  $\beta$ -glucuronidasi (63,74, 115, 152, 243) e  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasi (63, 77, 79, 120, 152). Nel loro recente studio su un osteosarcoma sperimentale nel ratto, Harris et al. (152) non hanno dimostrato alcun aumento significativo dell'attività della ialuronidasi, ma un aumento significativo dell'attività della  $\beta$ -glucuronidasi e della  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasi negli omogenati di osteosarcoma rispetto agli omogenati di osso normale.

L'articolo di Carr (63) contiene un'osservazione interessante. Sono stati studiati tre diversi tumori sperimentali nei topi. Dopo aver inoculato i.p. (intraperitoneale) per formare escrescenze ascitiche non invasive, tre tumori sperimentali non hanno mostrato alcuna attività esoglicosidasica significativa. Tuttavia, quando gli stessi tumori venivano inoculati s.c. (sottocute) per produrre crescite invasive in una matrice viscosa della sostanza fondamentale, la loro attività esoglicosidasica è aumentata in modo molto marcato. Sembrerebbe quindi che le cellule neoplastiche abbiano un notevole potenziale esoglicosidasico che si esprime solo in presenza del substrato specifico. Questa osservazione ha importanti implicazioni per gli studi sulle colture di tessuti attualmente in corso.

Il saccaro-1,4-lattone è un inibitore specifico della  $\beta$ -glucuronidasi (78) e Carr (62) ha dimostrato che la somministrazione di questo e di composti correlati determina una marcata regressione dei tumori sperimentali nei topi. Sfortunatamente, questo composto viene metabolizzato in acido saccarico tossico.

Il problema è trovare qualche inibitore non tossico dell'esoglicosidasi, e l'acido ascorbico, contenente la struttura dell'anello ciclico di un lattone con strette somiglianze strutturali con il substrato naturale dell'esoglicosidasi e in possesso di questa funzione fisiologica, sembrerebbe essere un contendente favorito per questo ruolo. Inoltre, studi in vitro di Kojima e Hess (182) hanno dimostrato che l'acido ascorbico funziona come un inibitore non competitivo della N-

acetilglucosaminidasi. Gli studi sull'inibizione della  $\beta$ -glucuronidasi sono stati esaminati da Dutton (108).

Per riassumere, le caratteristiche pericolose del comportamento delle cellule neoplastiche (invasività, nutrizione selettiva e forse crescita) sono causate dalla depolimerizzazione microambientale. A sua volta, questa destabilizzazione della matrice è determinata dalla costante esposizione alle glicosidasi lisosomiali continuamente rilasciate dalle cellule neoplastiche. Infine, l'ascorbato è coinvolto nel naturale contenimento di questa attività enzimatica degradativa.

**Ascorbato, collagene e incapsulamento del tumore.** La matrice intercellulare è rinforzata da una rete tridimensionale di fibre di collagene intrecciate. Un aumento generalizzato del contenuto di collagene della matrice può essere indotto da alcuni ormoni (estrogeni, androgeni, corticosteroidi, tiroxina) con un graduale passaggio da uno schema amorfo ad uno più fibrotico; lo stesso cambiamento si osserva nel processo di invecchiamento; vedere i riferimenti nella recensione di Cameron (48).

La quantità di collagene presente determina la forza del tessuto e anche la sua resistenza all'infiltrazione maligna. È risaputo che le cellule tumorali invasive si diffondono preferenzialmente lungo i piani dei tessuti "molliti" e vengono deviate e limitate da tessuti fibrotici come cicatrici, fascia, capsule e legamenti. Su scala generalizzata, il graduale spostamento verso un modello più fibrotico nella matrice indotto da questi ormoni e il processo di invecchiamento possono spiegare l'aumento della resistenza alla crescita tumorale associata a questi cambiamenti ormonali e costituzionali (48).

Pertanto, se l'integrità della matrice è la prima linea di difesa contro la crescita invasiva, questa difesa è rafforzata in modo molto potente dalla barriera successiva, la rete di collagene. Per apprezzare appieno l'importante ruolo svolto dal collagene nella resistenza stromale, dobbiamo prima guardare agli effetti delle cellule invasive sul collagene preesistente e poi alla capacità variabile dei singoli ospiti di incapsulare i loro tumori all'interno di barriere di nuovo tessuto fibroso.

La dissoluzione delle fibre di collagene preesistenti nelle immediate vicinanze delle cellule neoplastiche è una caratteristica ben riconosciuta delle crescite invasive attive. Ciò ha portato molti a postulare che le cellule tumorali rilascino la collagenasi, uno specifico enzima proteolitico presente sia nelle cellule dei mammiferi che in quelle dei batteri. Estratti di vari tumori animali e umani mostrano una maggiore attività della collagenasi (104, 131, 270, 310, 319).

Come accennato in precedenza, potrebbe benissimo essere che la trasformazione neoplastica implichi una produzione aumentata e sostenuta di tutti gli enzimi lisosomiali, inclusa la collagenasi, ma potrebbe esserci una spiegazione più semplice.

Si ricorderà che le fibre di collagene sono costituite da innumerevoli fibrille (esse stesse otticamente invisibili) "incollate insieme" in fibre visibili da macromolecole di glicosaminoglicani e proteoglicani. L'esposizione alle glicosidasi dissolverebbe la sostanza del cemento e, convertendo le fibre visibili in fibrille molecolari fluttuanti in una matrice depolimerizzata, sembrerebbe esercitare un'attività di "collagenasi". In ogni caso, l'iperattività lisosomiale delle cellule neoplastiche è chiaramente responsabile della distruzione delle barriere collagene preesistenti prima della crescita invasiva maligna.

La membrana basale è una sostanza fondamentale fortemente rinforzata con collagene. È stata osservata una disorganizzazione della membrana basale durante la coltura di cellule di carcinoma murino LS402A in mezzo carente di ascorbato, e questo effetto viene invertito introducendo ascorbato (263). La lisi del collagene preesistente è stata studiata in tumori di ratto trapiantati (262) e durante la carcinogenesi del 2-amminoantracene (258).

Il catabolismo del collagene determina un aumento del livello di UHP e, nell'uomo, la misurazione dell'UHP è utile al medico, poiché l'aumento dei livelli riflette l'aumento della diffusione e dell'attività della malattia. È stato dimostrato che i livelli di UHP nei pazienti con cancro al seno

sono direttamente proporzionali alla diffusione della malattia e hanno una relazione inversa con i livelli di ascorbato leucocitario e che una dose di carico di 1 g di acido ascorbico produce una forte diminuzione nell'escrezione di UHP (18). Pertanto, le cellule neoplastiche invasive possiedono la capacità di distruggere le barriere collageniche preesistenti, con un aumento del catabolismo del collagene e della produzione dei risultanti residui di idrossiprolina, e questo effetto distruttivo può essere ridotto in modo significativo aumentando l'assunzione di ascorbato.

Ancora più interessante, dal punto di vista della terapia pratica, è la capacità variabile degli individui di incapsulare il tumore (la cosiddetta risposta scirrosa). Nella pratica clinica quotidiana si può osservare l'intera gamma di risposte, che vanno dallo sfortunato individuo con un tumore altamente anaplastico, spietatamente invasivo, con una reazione fibrotica stromale del tutto trascurabile e un'aspettativa di vita molto limitata, a quello dell'individuo più fortunato con un tumore molto lento. Tumore in crescita, praticamente non invasivo, racchiuso in una barriera densa e quasi impermeabile di tessuto cicatriziale reattivo (i cosiddetti tumori scirrosi atrofici) e con una prognosi clinica poco diversa dalla normale aspettativa di vita. È vero che il primo quadro desolante tende a manifestarsi con maggiore frequenza nelle fasce di età più giovani, mentre il secondo quadro clinico è più frequente negli anziani, ma la differenziazione per età non è affatto netta. Sarebbe un progresso considerevole nella cura del cancro se tutti i tumori potessero essere convertiti nella varietà scirrosa atrofica. Anche allo stato attuale delle nostre conoscenze questo non è un obiettivo impossibile. Per raggiungere questo scopo, dobbiamo prima considerare il "suolo", riconoscendo che gli anziani, presumibilmente a causa di qualche cambiamento ormonale, sembrano in generale essere più capaci di suscitare questa potente reazione difensiva rispetto ai giovani. Pertanto, si dovrebbe prendere in considerazione la possibilità di utilizzare un adeguato aggiustamento endocrino (non necessariamente sinonimo di invecchiamento) per condizionare la matrice e renderla più adattabile a questo processo di incapsulamento (48).

Tuttavia, indipendentemente dal preconditionamento del "suolo", l'incapsulamento implica un'intensa deposizione locale di fibre di collagene completamente formate che imprigionano le cellule tumorali invasive.

L'acido ascorbico è essenziale per la formazione di nuovo collagene. Il ruolo preciso dell'ascorbato nella sintesi del collagene è stato oggetto di molti studi; vedere le revisioni complete di Gould (140) e Barnes (15). Durante gli stati di carenza di ascorbato, la sintesi totale del collagene determinata dalle tecniche di estrazione non viene influenzata (19) anche se la guarigione della ferita mediante fibre di collagene microscopicamente visibili è completamente assente (88). La mancanza di ascorbato riduce drasticamente l'idrossilazione dei residui di prolina e lisina in idrossiprolina e idrossilisina del collagene maturo durante l'assemblaggio ribosomiale (19, 140, 141, 174, 176), portando all'instabilità della tripla elica del collagene (171). Tale instabilità provoca un aumento del catabolismo del collagene, come è stato dimostrato nello scorbutico (138, 272) e nel cancro (18, 258, 262).

È stato dimostrato che l'acido ascorbico aumenta la sintesi del collagene da parte dei fibroblasti in vitro (99, 280) e mantiene la sintesi del collagene nei fibroblasti non mitotici per periodi prolungati (99). La prolil idrossilasi, l'enzima che idrossila i residui prolil e lisil del procollagene, richiede l'ascorbato per funzionare in vitro (181), e l'aggiunta di acido ascorbico alle colture tissutali stimola l'attività della prolil idrossilasi dei fibroblasti (174).

Pertanto, non vi è dubbio che una quantità sufficiente di ascorbato sia essenziale per la fibrillogenesi del collagene, sia stabilizzando la matrice e proteggendola dagli effetti erosivi delle glicosidasi lisosomiali, sia facilitando l'idrossilazione dei residui di prolile nel procollagene. Riassumendo, nella situazione del cancro sono coinvolti 3 fattori: (a) c'è l'effetto stimolante delle cellule neoplastiche che creano un ambiente proliferativo attorno ai fibroblasti stromali; (b) ci sono prove che l'ambiente ormonale possa influenzare la risposta fibrotica; (C) per un'adeguata risposta

scirroso, è essenziale un'abbondanza di ascorbato, e questo è un fattore aperto al controllo terapeutico.

**Ascorbato e immunocompetenza.** È generalmente accettato che il sistema immunitario svolga un ruolo nella resistenza dell'ospite al cancro, sia nel senso profilattico di un efficiente sistema di immunosorveglianza che distrugge le cellule neoplastiche in una fase iniziale della loro carriera, sia nel senso protettivo di ritardare la crescita di tumori già consolidati. I pazienti mantenuti in regimi immunosoppressivi a lungo termine presentano un'aumentata incidenza di alcune forme di cancro, e i pazienti affetti da cancro tendono ad avere una diminuzione dell'immunocompetenza misurata con test standard (271). Qualsiasi misura pratica in grado di migliorare l'immunocompetenza potrebbe solo essere vantaggiosa per il malato di cancro.

Il sistema di difesa immunologico ha l'arduo compito di distinguere prima l'amico dal nemico riconoscendo il "sé" dal "non sé" e poi agire sull'informazione identificando il bersaglio così da permetterne l'eliminazione attraverso vari meccanismi e strategie. Il riconoscimento dipende dalla valutazione di piccole differenze nella struttura molecolare.

Lewis Thomas (321) immagina il sistema immunitario come una forza di polizia, che pattuglia costantemente le cellule del corpo, tenendo gli occhi aperti per individuare le cellule che diventano neoplastiche e, una volta riconosciute, distruggendole. Perché un sistema del genere funzioni, le cellule tumorali devono mostrare un antigene di superficie per il "riconoscimento" diverso dai loro compatrioti non neoplastici.

Per alcuni tumori sperimentali, indotti da specifici virus oncogeni e specifici cancerogeni chimici, esiste una chiara evidenza che ciò sia vero, e inoltre l'antigene è specifico per l'agente cancerogeno (90, 221, 271). Nel cancro umano, il quadro è meno chiaro. Alcuni tumori derivati dallo stesso tipo cellulare di base spesso esprimono un antigene di differenziazione comune, misurato mediante test immunoproteici specifici (236, 237). Questi cosiddetti antigeni oncofetali sono presenti anche sulle cellule embrionali e in effetti vi sono prove che possano essere presenti sulla superficie di qualsiasi cellula in rapida divisione, ma non necessariamente neoplastica (271). Il rilevamento di specifiche immunoproteine oncofetali nel siero può riflettere la sensibilità delle tecniche esistenti.

Pertanto, la maggior parte degli stati di proliferazione cellulare sarebbero al di sotto del livello di rilevamento ma, nel caso in cui una singola cellula si dividesse e suddividesse progressivamente per formare un immenso clone di cellule neoplastiche, l'antigene clonale sarebbe misurabile come un "antigene tumore-specifico" (46).

La membrana cellulare potenzialmente antigenica è una struttura altamente complessa costituita da proteine e lipoproteine, non solo del tutto specifica per l'individuo ma anche del tutto specifica per il particolare tipo di cellula, mascherata da un "esoscheletro" di glicosaminoglicani e macromolecole di collagene. La divisione cellulare deve implicare lo smascheramento e la dissoluzione della membrana cellulare coinvolgendo nuove configurazioni molecolari e alterando così la sua risposta antigenica. Noi avanziamo la tesi che tutte le cellule che si dividono per alterazione della membrana cellulare suscitano un debole segnale "non sé" come parte del meccanismo omeostatico generale del corpo. Questo segnale di riconoscimento evocherebbe una debole risposta antigenica, specifica per il particolare tipo di cellula a causa della sua peculiare esposizione proteica, ma riconoscibile solo se un numero molto elevato di cellule clonali simili si stesse dividendo, come nell'embrione o nel cancro.

Esistono prove che la dissoluzione del componente glicosaminoglicano della membrana cellulare per esporre le configurazioni proteiche e lipoproteiche, come sarebbe destinato a risultare dal rilascio cellulare di glicosidasi, gioca un ruolo importante nel determinare l'antigenicità (43, 44).

A causa delle somiglianze proteiche, la risposta immunitaria, così devastante nella situazione dell'allotrapianto, è molto meno efficace contro le cellule tumorali indigene dell'ospite. Tuttavia, gioca un ruolo nel determinare la resistenza di un singolo paziente al suo particolare tumore.

A nostro avviso, l'ascorbato è essenziale per garantire il funzionamento efficiente del sistema

immunitario. I meccanismi di immunocompetenza sono una combinazione di reazioni difensive umorali e cellulari con l'ascorbato coinvolto in numerosi modi. Occorre ora considerare questi meccanismi.

La risposta al segnale "nemico" è la rapida mobilitazione di agenti umorali e cellulari ad alta attività specifica e l'elaborazione di unità di riconoscimento, immunoglobuline specifiche. La replicazione del sistema è evidente nella sua funzione "cerca e distruggi", in cui la stessa complessa unità molecolare che riconosce una struttura spara anche con un'arma, il sistema del complemento, che attacca solo la struttura identificata da l'anticorpo specifico, anche se è presente solo in una singola cellula.

Sebbene il sistema del complemento possa essere attivato da diversi fattori, la specificità di questa azione deriva dal fatto che può essere focalizzato con la precisione di un raggio laser fino al punto di impatto locale delle immunoglobuline con l'antigene specifico con cui sono state creato per riconoscere. La cascata di fattori del complemento così messa in moto diffonde ulteriormente il segnale mediante una varietà di messaggeri chimici e l'attivazione indiretta, attraverso l'anafilotossina (81, 82), di altre cellule per indurre il rilascio di attivatori per sostenere la risposta infiammatoria, inclusa la fagocitosi, che sarà discussa in una sezione successiva.

La precisione del riconoscimento e l'intensità della risposta variano di volta in volta nello stesso individuo a seconda dello stato endocrino, riflettendo fattori costituzionali come l'età, il sesso e l'ambiente ormonale (90). L'influenza dello stato endocrino sulla resistenza dell'ospite al cancro sarà discussa di seguito. L'importanza dello stato endocrino nel preconditionamento del "suolo" ricorda la nostra precedente discussione secondo cui fattori simili influenzano l'efficienza della risposta fibrotica.

I fattori umorali coinvolti nell'immunocompetenza sono le immunoglobuline specifiche della superficie cellulare e la loro arma definitiva, la cascata del complemento.

Il sistema reticoloendoteliale si occupa della precisa progettazione e produzione delle immunoglobuline, proteine che contengono un gran numero di legami disolfuro (rispetto ad altre proteine) la cui funzione è quella di collegare le catene leggere e pesanti. Il ruolo del sistema dell'acido ascorbico - acido deidroascorbico nella biosintesi dei legami S-S è stato ampiamente discusso da Lewin (195), il quale conclude fermamente che l'ascorbato è essenziale per la sintesi delle immunoglobuline. Una correlazione positiva tra i livelli sierici di asorbato e i titoli sierici di IgG e IgM è stata riportata da Valiance (325), studiando soggetti umani isolati da qualsiasi fonte di nuova infezione per quasi 1 anno in una remota stazione di ricerca antartica britannica.

Per quanto riguarda l'arma più definitiva della cascata del complemento, è stato recentemente dimostrato che la somministrazione di asorbato di sodio supplementare alle cavie aumenta significativamente il potere esteratico del primo componente del complemento (attività della C<sub>1</sub> esterasi, senza la quale l'intera cascata del complemento è inutilizzabile) in animali immunizzati con antipenicilloil (porcellino d'India)  $\gamma$ -globulina<sup>3</sup>.

Nell'immunità cellulo-mediata, l'immunocompetenza è esercitata prevalentemente dai linfociti. Nei tumori, il grado di infiltrazione dei linfociti stromali è una misura dell'efficienza della resistenza dell'ospite al processo neoplastico. Pertanto, il grado di infiltrazione linfocitaria è ora accettato come un indicatore prognostico affidabile.

Rispetto ad altre cellule, i linfociti contengono concentrazioni sostanzialmente più elevate di asorbato, e ci sono forti indicazioni che questa caratteristica sia "intenzionale" e correlata al loro ruolo attivo nell'immunocompetenza cellulo-mediata.

È stato chiaramente dimostrato che le cavie addomesticate principalmente con diete prescorbutiche hanno un'immunocompetenza marcatamente ridotta, come dimostrato dalla loro prolungata tolleranza agli allotrapianti, e che questo cambiamento è correlato a livelli anormalmente bassi di asorbato nei linfociti. Quando viene somministrato asorbato per ripristinare i livelli di asorbato nei linfociti alla normalità, gli allotrapianti vengono prontamente e universalmente respinti (167).

Questa osservazione ci ha portato a suggerire che la condizione opposta di saturazione dell'ascorbato nei linfociti dovrebbe essere associata ad una maggiore immunocompetenza (55). Questa previsione è stata successivamente confermata. Yonemoto et al. (356) hanno dimostrato in soggetti giovani sani che un'elevata dose di carico di ascorbato (5 g al giorno per 3 giorni) evoca un aumento significativo nella blastogenesi dei linfociti, come misurato dalla risposta alla fitoemoagglutinina e, inoltre, che questo aumento nell'immunocompetenza veniva ulteriormente potenziato in modo significativo dalla somministrazione di dosi maggiori di ascorbato (10 g). Un effetto simile di aumento delle risposte dei linfociti T a canavalina 2 con una maggiore assunzione di ascorbato da parte dei topi è stato riportato da Siegel e Morton (300). Queste osservazioni supportano l'opinione del senso comune secondo cui i linfociti ricchi di ascorbato dovrebbero essere in grado di condurre la loro azione protettiva in modo più efficiente rispetto a quelli che non lo sono, una caratteristica questa del cancro accertato.

Per riassumere, i pazienti affetti da cancro generalmente mostrano una ridotta immunocompetenza e quasi invariabilmente hanno un basso contenuto di ascorbato nei linfociti. Il modo più semplice e sicuro per migliorare l'immunocompetenza in tali pazienti e per garantire che i loro sistemi di difesa umorali e cellulo-mediati funzionino alla massima efficienza è quello di aumentare la loro assunzione di ascorbato. Solo quando questa maggiore domanda e utilizzo nel cancro saranno pienamente soddisfatti, questi meccanismi immunitari potranno garantire la massima protezione contro la proliferazione delle cellule tumorali.

**Ascorbato ed equilibrio ormonale.** Le più alte concentrazioni di ascorbato si trovano nelle ghiandole surrenali e pituitarie, e gli stadi terminali dello scorbuto sono appena preceduti dal completo esaurimento dell'ascorbato surrenale, che porta, è stato spesso affermato, alla "morte da scorbuto" per insufficienza cortico-surrenale. Ciò ha indotto molti a suggerire che il sistema acido ascorbico-acido deidroascorbico svolga un ruolo importante nella sintesi e nel rilascio degli ormoni dell'asse adrenopituitario. Le prove di ciò sono sia contrastanti che confuse (13, 72, 73, 102, 277, 278).

Naturalmente è noto da molti anni che le variazioni dello stato ormonale di un individuo ed in particolare le variazioni relative nelle diverse componenti dell'asse adrenopituitario possono talvolta esercitare un effetto significativo sulla resistenza dell'ospite alla neoplasia; si veda l'ampia recensione di Stoll (312). Nel 1974, abbiamo proposto il suggerimento provvisorio che la disponibilità di ascorbato, influenzando l'interrelazione tra i membri di questa orchestra ormonale, potrebbe determinare se un individuo possiede un ambiente steroideo favorevole o sfavorevole (55). La proposta non è stata ancora studiata e il suggerimento rimane senza prove sperimentali.

**Ascorbato e fagocitosi.** Si ritiene che la fagocitosi svolga un ruolo importante nella risposta immunitaria cellulo-mediata alle cellule tumorali. Inoltre, praticamente tutti i tumori si ulcerano attraverso le superfici adiacenti (pelle, tratto gastrointestinale, tratto respiratorio, ecc.) e sono soggetti a invasione batterica secondaria. Pertanto, la tossiemia dell'infezione secondaria diventa parte della malattia tumorale. Una fagocitosi efficiente offre una certa protezione contro questa quasi inevitabile complicazione.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'ascorbato è necessario per la fagocitosi attiva sia in vivo che in vitro (71, 87, 128, 137, 210, 240, 270).

La motilità dei leucociti dipende dall'attività dello shunt dell'esoso monofosfato, che a sua volta viene attivato dall'ascorbato (84, 94, 173) che ossida il NADPH in NADP<sup>+</sup> con rilascio di perossido battericida (252). Recentemente è stata pubblicata una revisione della fagocitosi ossigeno-dipendente (9).

L'effetto sorprendente dell'aumento dell'assunzione di ascorbato con la dieta sulla blastogenesi dei linfociti umani misurata mediante la risposta alla fitoemoagglutinina e l'assorbimento della [<sup>3</sup>H]timidina è stata notata nella sezione precedente.

### **Acido ascorbico e prevenzione dei tumori**

Qualsiasi misura che ritarderà la crescita di tumori già consolidati dovrebbe anche, se applicata abbastanza precocemente, sopprimere efficacemente i tumori “latenti” e quindi in termini clinici ha un certo valore profilattico. Lo scopo di questa sezione è considerare se l’ascorbato offra qualche grado di protezione contro una varietà di agenti cancerogeni.

**L'attività antivirale dell'acido ascorbico.** Si ritiene che alcuni tumori siano iniziati da virus oncogeni [vedi discussione di Dulbecco (106)], e tutta quest'area è al centro di gran parte dell'interesse della ricerca attuale, con proposte di utilizzo di agenti antivirali nella profilassi del cancro e nella chemioterapia (208). In questo contesto l'attività antivirale dell'acido ascorbico assume nuova importanza.

L'evidenza clinica che l’ascorbato supplementare offre protezione contro un ampio spettro di malattie virali è stata esaminata da Pauling (252, 254) e Stone (313) nei loro rispettivi libri. Particolare menzione deve essere fatta del lavoro pionieristico di Jungeblut (162, 163), nel dimostrare l'attività in vitro e in vivo contro il virus della poliomielite, e il lavoro clinico di Klenner (178, 179), che ne sostiene fortemente l'uso contro un'ampia varietà di disturbi virali. In Giappone, Morishige e Murata (227) hanno utilizzato integratori di ascorbato nella prevenzione e nel trattamento di successo di morbillo, parotite, orchite virale, polmonite virale, herpes zoster ed encefalite virale. L'effetto più sorprendente registrato da questi lavoratori giapponesi è stata la prevenzione praticamente completa dell'epatite post-trasfusionale in un paese dove tale complicanza è comune (227).

In laboratorio, Murata et al. (228–230) hanno studiato l'inattivazione di virus batterici mediante ascorbato e sono stati in grado di dimostrare l'inattivazione di fago J1 di *Lactobacillus casei* e di una varietà di virus di *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Il meccanismo dell’inattivazione virale in vitro non è ancora chiaro. Potrebbe comportare la liberazione di perossido dall’ossidazione dell’ascorbato, poiché l’aggiunta di catalasi fornisce protezione (290, 348). Tuttavia, Murata et al. (231) hanno notato che le concentrazioni di perossido che avrebbero dovuto essere prodotte durante l'ossidazione dell'ascorbato non avevano alcun effetto sul virus batterico Δ-A. Murata ha postulato che gli intermedi dei radicali liberi prodotti durante l’ossidazione dell’ascorbato sono gli agenti attivi nell’inattivazione virale e ha presentato valide argomentazioni a sostegno della sua opinione. A questo proposito, il ruolo del radicale mono-deidroascorbato nella cessazione delle reazioni dei radicali liberi e la sua conseguente funzione biologica sono stati esaminati da Bielski et al. (28).

È stato anche dimostrato che l'ascorbato potenzia la produzione di interferone (92, 298-301), nonché potenzia le proprietà fagocitiche del sistema reticolo-endoteliale, entrambe potenti difese in vivo contro i virus. Anche l'interazione dell'ascorbato con la L-lisina nei ratti (67) può contribuire all'efficacia dell'ascorbato.

Qualunque possano essere i meccanismi, esiste l'evidenza clinica e sperimentale che l’ascorbato supplementare possiede una certa attività antivirale. Pertanto, se mai venisse provata un’eziologia virale del cancro umano, ci si potrebbe aspettare che l’ascorbato eserciti qualche effetto profilattico e terapeutico.

**Ascorbato e idrocarburi cancerogeni.** Esistono prove frammentarie che l’ascorbato offra una certa protezione contro gli idrocarburi cancerogeni.

Una stimolazione molto marcata della sintesi dell'ascorbato nei ratti e nei topi può essere evocata dall'esposizione a vari composti nocivi inclusi gli idrocarburi cancerogeni, di cui il metilcolantrene è il più potente (40,47, 80, 323).

Le ossidasi a funzione mista sono un gruppo di enzimi microsomiali strettamente correlati che metabolizzano molte classi di composti e sono particolarmente importanti nell'inattivazione degli agenti chimici cancerogeni. Sebbene questi enzimi microsomiali siano stati studiati più estensivamente nel tessuto epatico, prove recenti indicano la loro presenza nei tessuti di tutte le

principali porte di ingresso, inclusi il tratto gastrointestinale, i polmoni, la pelle e la placenta (337). Rappresentano quindi la barriera metabolica iniziale verso le sostanze estranee nocive. Questi enzimi sono influenzati dall'età, dalla specie e dal ceppo, dal sesso e dallo stato nutrizionale (358) e richiedono NADPH e ossigeno molecolare (339-345) per la loro azione. L'acido ascorbico è anche un requisito delle ossidasi a funzione mista che idrossilano triptofano (83, 233, 307), tirosina (187, 233, 307, 324), dopamina (193) e fenilalanina (314). Il metabolismo microsomiale dei composti estranei liposolubili o degli agenti cancerogeni produce prodotti generalmente più solubili in acqua, il che aumenta notevolmente la loro velocità di escrezione. Non sorprende quindi che gli induttori delle ossidasi microsomiali a funzione mista (idrocarburi policiclici, pentobarbital, fenobarbital, clordano,  $\beta$ -naftoflavone e fenotiazene) forniscano protezione dagli agenti cancerogeni, mentre gli inibitori di questi enzimi (compresi il tetracloruro di carbonio, gli insetticidi organofosforici, ozono e monossido di carbonio) potenziano gli effetti cancerogeni; tra gli agenti cancerogeni studiati figurano il benzo(a)pirene, il 7,12-dirnetilbenzantracene, l'N-2-fluorenilacetammide, il 4-dimetilamminostilbene-uretano, la tossina aflà, la dietilnitrosammina, i coloranti aminoazoici, il 3-metil-4-dimetilamminoazobenzene, il 2-acetilaminofluorene e felce aquilina (bracken fern) [vedi recensione di Wattenberg (341)J.

È stata segnalata anche l'azione diretta dell'ascorbato sugli agenti cancerogeni. Warren (335) ha dimostrato l'ossidazione degli idrocarburi aromatici in vitro mediante ascorbato. Floyd et al. (122) hanno riferito che l'ascorbato inibisce la conversione dell'N-idrossi-N-acetil-2-amminofluorene in due agenti cancerogeni più potenti, il 2-n itrosofluorene e l'N-acetil-2-amminofluorene. Questa reazione di ossidoriduzione riduce il perossido mediante l'azione della perossidasi e quella di un donatore di elettroni; nelle condizioni utilizzate, l'ascorbato era preferibilmente ossidato. Anche l'attacco dell'agente cancerogeno N-acetossi-2-acetamidofluorene sulla guanosina viene impedito in vitro, probabilmente (291).

È stato dimostrato che la carenza di acido ascorbico nelle cavie riduce l'attività del citocromo microsomiale P-450 a circa il 50% del suo valore normale (96, 97, 192, 203, 268) citocromo  $b_5$  (96, 97, 174, 192, 302, 358), citocromo c reductasi legata al NADPH (174, 358) e l'attività di O- e N-demetilasi (174, 185, 192, 358). Dati contrastanti di Kato et al. (170) in cui le attività enzimatiche sopra menzionate non erano influenzate dalla carenza di ascorbato sembrano essere il risultato di un periodo di deplezione più breve (12 giorni). Zannoni e Sato (Rif. 174, pag. 119) hanno dimostrato che le attività degli enzimi microsomiali non diminuiscono significativamente in un esperimento di deplezione di 10 giorni, ma lo fanno significativamente dopo 21 giorni. Esperimenti di reintegro con cavie scorbutiche hanno dimostrato che l'integrazione con acido ascorbico ha riportato il citocromo P-450 e le attività di demetilazione alla normalità entro 48 ore (97, 192, 203).

**Ascorbato e nitrosammine.** Le nitrosammine, prodotti della reazione del nitrito con un'ammina secondaria, l'alchilurea, o un gruppo N-alchilcarbammato, sono state fortemente implicate come importanti cancerogeni ambientali (196). L'inquinamento atmosferico da nitrosammine potrebbe essere significativo. In alcune parti degli Stati Uniti i livelli di dimetilnitrosammina salgono a 0,1  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  di aria "pulita", che equivale a circa 1,0-1,4  $\mu\text{g}$  per persona al giorno; in confronto, un pacchetto di sigarette ne contiene circa 0,8 e 4 fette di pancetta conservata al nitrito contengono circa 5,5  $\mu\text{g}$  di dimetilnitrosammina (296). Una varietà di tumori sperimentali del tratto alimentare, del fegato, del polmone e della vescica urinaria possono essere prodotti dalle nitrosammine (218, 219, 234, 275) e numerosi prodotti della nitrosazione sono cancerogeni in vivo, compresi quelli della citrullina, dell'efedrina, sarcosina, morfolina, metilurea, piperazina, pirrolidina, aminopirina, dietilammina e dimetilammina (347). La nitrosazione viene solitamente studiata in condizioni gastriche simulate, ma Hill et al. (155) hanno dimostrato che le nitrosammine possono essere prodotte in qualsiasi sito in cui siano presenti batteri, ammine secondarie e nitriti o nitrati. Un altro aspetto che merita seria considerazione è il trasferimento transplacentare delle nitrosammine; i tumori del tratto respiratorio sono stati prodotti in una percentuale fino al 97% nella prole di topi a

cui era stata somministrata dietilnitrosamina durante gli ultimi 4 giorni di gravidanza (222). È stato dimostrato che l'acido ascorbico esercita un effetto protettivo contro la carcinogenesi mediante la reazione del nitrito con l'amminopirina (123), la morfolina (174), la piperazina (Rif. 174, p. 175) e il pesce crudo (204), oltre a ridurre l'effetto acuto epatotossicità derivante dall'alimentazione di nitrito e dimetilammina (61) o nitrito e aminopirina (Rif. 145, 168 e 169; Rif. 174, p. 160). Studi con nitrosammine preformate hanno dimostrato che l'acido ascorbico esercita un effetto protettivo scarso o nullo (Rif. 174, pag. 175). L'acido ascorbico non reagisce con le ammine, né aumenta la velocità di decomposizione delle nitrosammine; esercita il suo effetto protettivo in gran parte mediante reazione con nitrito e acido nitroso (Rif. 5 e 220; Rif. 174, p. 181). In condizioni gastriche simulate (37°, pH 1,5), un rapporto molare di ascorbato/nitrito di 1/1 ha fornito il 37% di protezione dalla nitrosazione in vitro della metilurea, un rapporto di 2/1 ha fornito il 74% e un rapporto di 4/1 ha fornito una protezione del 93% (Rif. 174, pag.181). Poiché i nitriti si trovano in molti alimenti come normale prodotto di riduzione dei nitrati o deliberatamente introdotti durante la lavorazione (Rif. 174, p. 175), è significativo che l'acido ascorbico aggiunto o presente negli alimenti offra una certa protezione contro la pericolosa formazione di nitrosammine (Rif. 5 e 352; Rif. 174,p.181).

È stato anche dimostrato, utilizzando il test di Ames (148), che l'ascorbato inibisce la mutagenesi batterica da parte della N-metil-N-nitrosoguanidina, e Marquardt, Rugino e Weisburger, utilizzando la stessa procedura di test, hanno dimostrato attività mutagene (e presumibilmente cancerogene) negli alimenti trattati con nitriti e hanno suggerito che il cancro allo stomaco umano potrebbe essere correlato a questo fattore dietetico, che in una certa misura potrebbe essere ridotto dall'ascorbato (204).

**Metaboliti dell'ascorbato e del triptofano nel cancro della vescica.** Gli agenti cancerogeni chimici esogeni o formati per via endogena possono spesso essere implicati nella causa del cancro della vescica umana. La nota relazione tra l'esposizione professionale a 4-amminofenile, benzidina e 2-naftilammina e il cancro della vescica ha stimolato le indagini sulla cancerogenicità delle ammine N-idrossi aromatiche (98, 265) e delle ammine aromatiche o-idrossi (2). Un gran numero di metaboliti dell'o-idrossitriptofano sono noti come cancerogeni (357) e sono stati fatti sforzi per dimostrare un aumento dei metaboliti del triptofano nelle urine dei pazienti con cancro della vescica, ma i risultati sono stati equivoci (2); tuttavia, dopo una dose di carico di L-triptofano, i pazienti affetti da cancro della vescica espellono una quantità significativamente maggiore dei metaboliti chinurenina, acido xanturenico e acido o-aminoippurico, suggerendo che tali soggetti presentano alcune anomalie del metabolismo del triptofano (357).

La chemiluminescenza risultante dalla degradazione non enzimatica del metabolita del triptofano 3-HOA (e che si ritiene rifletta la degradazione dal Composto I al Composto IV come mostrato nel Grafico 2) è significativamente aumentata nelle urine dei pazienti affetti da cancro alla vescica e nelle urine di fumatori pesanti di tabacco (285, 286). La somministrazione di ascorbato (da 1 a 2 g p.o. al giorno) determina una significativa diminuzione della chemiluminescenza e previene completamente la formazione del Composto IV anche nell'urina svuotata a cui è stato poi aggiunto 3-HOA (286).

L'urina di pazienti con cancro della vescica ossida il 3-HOA più velocemente dell'urina di controllo in vitro e l'aggiunta di ascorbato inibisce questa reazione (259, 286). Con l'ipotesi di lavoro generale che i metaboliti del 3-HOA siano cancerogeni per l'uroepitelio, l'aumento delle quantità di tali metaboliti, in particolare del Composto IV, riscontrati nelle urine dei forti fumatori di tabacco spiega la loro maggiore suscettibilità al cancro della vescica. Il 3-HOA impiantato direttamente nella vescica del topo è cancerogeno e questo effetto può essere prevenuto dall'ascorbato (259, 284). L'intero concetto secondo cui l'ascorbato supplementare ha un valore protettivo e inibitorio nel cancro della vescica è stato sviluppato da Schlegel (284) e dai suoi associati nel Dipartimento di Urologia dell'Università di Tulane. Gli aspetti sperimentali, biochimici e clinici del loro lavoro sono

stati oggetto di una recente revisione (284).

**Ascorbato e fumo di sigaretta.** La relazione tra fumo di sigaretta e cancro alla vescica è stata già menzionata in precedenza. Di gran lunga più importante in termini numerici è la comprovata relazione tra fumo e cancro ai polmoni.

Esistono prove considerevoli che il fumo esaurisce le riserve di acido ascorbico (4, 142, 156, 255-257,269), come dimostrato dalla diminuzione dei livelli di ascorbato nel sangue intero, nel siero e nei leucociti nei fumatori rispetto ai controlli non fumatori. Sarebbe presuntuoso affermare che questa differenza riflette una maggiore utilizzazione che agisce con funzione protettiva. Tuttavia, allo stato attuale delle nostre conoscenze, sembrerebbe una saggia precauzione per il fumatore accanito compulsivo aumentare deliberatamente la sua assunzione di ascorbato.

**Ascorbato e cancerogenesi UV.** L'eccessiva esposizione ai raggi UV è cancerogena. Nell'uomo, ciò è evidente nell'aumentata incidenza di varie forme di cancro della pelle in individui di pelle chiara residenti in aree ad alta intensità solare, come gli Stati Uniti meridionali, il Sud Africa e l'Australia.

Sperimentalmente, gli effetti cancerogeni delle radiazioni attiniche UV non ionizzanti possono essere duplicati e studiati utilizzando topi albini glabri (36). Homer Black e i suoi collaboratori hanno dimostrato che l'esposizione della pelle di tali animali ai raggi UV ad alta intensità provoca la formazione dello sterolo cancerogeno colesterolo-5a,6a-eossido e il cancro della pelle e che il processo può essere soppresso alimentando gli animali con un numero di antiossidanti, compreso l'acido ascorbico (32-36, 65, 199).

### **Altri effetti rilevanti dell'acido ascorbico**

**Ascorbato e produzione di energia.** I citocromi P-450 e b5 sono diminuiti dalla privazione di ascorbato nella cavia, e poiché i citocromi sono intimamente associati al trasporto di elettroni, e quindi alla fosforilazione ossidativa, è possibile che il danno respiratorio cellulare possa derivare da una relativa carenza di ascorbato; e, naturalmente, un aumento della glicolisi anaerobica, abbinato ad una diminuzione della respirazione ossidativa, è riconosciuto come un cambiamento biochimico fondamentale nel processo del cancro (334).

La trasformazione virale delle colture cellulari diminuisce il consumo di ossigeno e aumenta la produzione di lattato (29, 30). Un aumento del tasso di gluconeogenesi è stato dimostrato in una varietà di tumori animali (297) ed è stato collegato alla sindrome da perdita di peso progressiva dei pazienti affetti da cancro (157), poiché si ritiene che le cellule neoplastiche in fermentazione attiva soddisfino il loro aumentato fabbisogno di glucosio a scapito dell'ospite.

Tutti gli enzimi glicolitici aumentano di quantità durante la carcinogenesi (37, 346). La glucochinasi è aumentata al 570% del suo valore di controllo nel fegato di animali esposti al cancerogeno 3'-metil-4-dimetilamminoazobenzene (12).

Queste alterazioni nei percorsi cellulari possono in una certa misura essere corrette dall'ascorbato. Takeda e Hara (318) hanno riportato una diminuzione dell'ossidazione del citrato e una diminuzione dell'attività dell'aconitasi nelle cavie scorbutiche, indicando un ciclo dell'acido tricarbossilico alterato. L'aggiunta di ascorbato a colture di tessuto osseo embrionale (266) o a colture di leucociti polimorfonucleati (113) determina un aumento del consumo di ossigeno e una diminuzione della produzione di lattato. Studi di Benadeet al. (25, 26) hanno dimostrato un'inibizione del 72% della glicolisi anaerobica nelle cellule tumorali ascite di Ehrlich mediante ascorbato; Si ottenne un'inibizione del 96% quando al 3-ammino 1,2,4-triazolo fu aggiunto l'ascorbato e queste aggiunte si rivelarono altamente tossiche per le cellule tumorali. La citotossicità è stata attribuita principalmente alla produzione intracellulare di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e all'effetto sinergico dell'aminotriazolo con la sua inibizione della catalasi (25).

**Ascorbato come antiossidante.** Le proprietà antiossidanti dell'acido ascorbico sono note sin dalla sua scoperta (151, 308, 328), e poiché altri antiossidanti sembrano possedere una certa attività

antitumorale, anche l'ascorbato potrebbe funzionare a questo riguardo. Pertanto, Wattenberg ha dimostrato l'inibizione della tumorigenesi da parte di numerosi agenti cancerogeni noti, come 7,12-dimetilbenz(a)antracene, benzo (a)pirene, uretano, uracile mostarda, dimetilidrazina, 4-nitrochinolina N-ossido e dietilnitrosamina, da diversi antiossidanti, tra cui butilidrossitoluene, butilidrossianisolo, etossichina e alcuni composti reattivi che contaminano lo zolfo (337-345). Slaga e Bracken (304) hanno riferito che l'acido ascorbico così come altri antiossidanti prevengono l'insorgenza di tumori cutanei in seguito all'applicazione di 7,12-dimetilbenz(a)antracene.

Come accennato in precedenza, Black ha descritto il colesterolo- $\alpha$ -ossido, un precancerogeno che si forma nella pelle durante l'esposizione a raggi UV ad alta intensità, e ne ha prevenuto la formazione in topi senza pelo mediante l'aggiunta di ascorbato,  $\alpha$ -tocoferolo, glutazione e idrossitoluene butilato. alla dieta. Gli antiossidanti possono esercitare i loro effetti proteggendo contro la rottura cromosomica indotta da agenti cancerogeni (294), riducendo la perossidazione indotta da agenti cancerogeni (293), alterando il metabolismo microsomiale epatico (306), o mediante una combinazione di queste e altre azioni, come esaminato da Passwater (250) e da Wattenberg (344).

**Acido deidroascorbico.** I prodotti di ossidazione dell'acido ascorbico hanno attività antitumorale *in vivo*. L'acido deidroascorbico (150 mg/kg di peso corporeo) e l'acido 2,3-dichetogulonico (115 mg/kg di peso corporeo) hanno inibito la crescita del sarcoma 180 solido nei topi rispettivamente dell'88 e del 54% (355). Negli stessi esperimenti, l'attività antitumorale dell'acido ascorbico (46% di inibizione) è stata potenziata dall'aggiunta di un composto di rame (fino al 69% di inibizione), indicando che l'agente attivo è un prodotto di ossidazione. L'attività antitumorale dell'acido deidroascorbico, e in misura minore di altri metaboliti dell'acido ascorbico, dell'acido eritorbico e dell'acido deidroeritorbico, è stata recentemente confermata utilizzando il Sarcoma 180 solido (245, 246). Un altro metabolita, il 5-metil-3,4-diidrossitetrone, inibisce la crescita del Sarcoma 180 solido del 50% (244, 322). Si ritiene che l'attività di questi agenti sia mediata dall'interazione con il DNA ed è stata dimostrata la decomposizione dell'acido apurinicico in acido desossicitidilico, nonché la decomposizione della forma oligo dei nucleotidi pirimidinici (235, 244, 247, 355). È stato anche suggerito che l'acido deidroascorbico funzioni come un accettore di elettroni nella regolazione della mitosi (111, 112).

**Ascorbato e nucleotidi ciclici.** Molte attività biologiche sono potenziate da azioni ormonali che utilizzano il 3':5'-AMP ciclico e il 3':5'-GMP ciclico come "secondi messaggeri". Lewin (195) ha esaminato numerose prove che dimostrano affermando che l'ascorbato potenzia la formazione di 3':5'-AMP ciclico ed è coinvolto nell'inibizione di processi che riducono la concentrazione sia di 3':5'-AMP ciclico che di 3':5'-GMP ciclico idrolizzandoli a 5'-AMP e 5'-GMP, rispettivamente. Il ruolo di questi nucleotidi ciclici nel cancro è incerto, ma è stata notata una diminuzione dell'attività dell'adenilato ciclasi nelle cellule trasformate dal virus del pollioma (45), ed è stato dimostrato che l'AMP ciclico 3':5' inibisce la moltiplicazione cellulare *in vitro* (195). ) e la crescita del tumore *in vivo* (130).

**Ascorbato ed eritropoiesi.** L'anemia è una caratteristica comune del cancro. È noto che l'ascorbato promuove l'assorbimento e l'utilizzo del ferro ingerito ed è necessario per una risposta eritroblastica completa. Pertanto l'anemia da cancro verrebbe aiutata aumentando l'assunzione di ascorbato.

**Ascorbato e potenziale di ossidoriduzione.** Si ritiene che il sistema acido ascorbico-acido deidroascorbico svolga un ruolo importante nel mantenimento di condizioni ottimali di ossidoriduzione nei tessuti. Il potenziale di ossidoriduzione, come l'equilibrio acido-base e il pH, deve essere bilanciato entro limiti abbastanza ristretti per una salute normale. Qualsiasi disturbo del potenziale di ossido-riduzione, come potrebbe risultare dall'esaurimento delle riserve di ascorbato nel cancro, potrebbe avere effetti sistemici deleteri (3).

**Studi in vitro contro le cellule tumorali.** Poiché l'acido ascorbico non è tossico per i tessuti normali, pochi hanno indagato se sia altrettanto non tossico per i tessuti neoplastici, e le prove disponibili tendono ad essere contraddittorie. Pertanto, Vogelaar ed Erlichman (329) hanno riferito

che l'ascorbato ha potenziato la crescita delle cellule di Sarcoma 180 di topo in vitro, mentre Parket al. (249) hanno dimostrato la stimolazione di una linea cellulare di plasmocitoma murino. D'altra parte, l'ascorbato a una concentrazione piuttosto elevata è citotossico per le cellule di carcinoma ascite di Ehrlich (25, 26), e ad una concentrazione "fisiologica" molto più bassa per la coltura tissutale di cellule 3T3 (85). È stato riportato che l'acido ascorbico aumenta il metabolismo del glucosio nelle cellule neoplastiche ma non nelle cellule normali in identiche condizioni in vitro (257a).

**Studi su tumori sperimentali in animali da laboratorio.** Omura e i suoi associati in Giappone (232,245, 246, 322, 354, 355) hanno riferito che l'acido ascorbico e i suoi metaboliti mostrano effetti inibitori significativi contro la "presa" e la crescita del Sarcoma 180 nei topi. Altri esperimenti con tumori di topi e ratti hanno prodotto risultati equivoci (41, 305,336,349,351). Anche con l'animale sperimentale scelto, la cavia, gli effetti riportati sono contraddittori. Così, Russell et al. (274) hanno riferito che la deprivazione di ascorbato aumentava la suscettibilità delle cavie alla carcinogenesi del metil colantrene e promuoveva la crescita e la diffusione del tumore, mentre Migliozi (216) trovavano che la deprivazione di ascorbato ritardava la crescita del tumore e l'integrazione di ascorbato la aumentava. Ci sembra importante che questi esperimenti sulle cavie siano ripetuti utilizzando diversi livelli di assunzione di ascorbato; è possibile che risultati contraddittori possano derivare da punti diversi su una curva dose-risposta.

**Studi epidemiologici sul cancro umano.** Un certo numero di studi epidemiologici hanno dimostrato qualche relazione tra i modelli di assunzione di ascorbato nella dieta in grandi gruppi di popolazione e la loro incidenza di cancro di vario tipo e cancro in generale (27, 31, 70, 86, 107, 143, 144, 149, 154, 158, 180, 353). Proponiamo di rivedere questi e studi simili altrove.

**Sperimentazioni cliniche nella gestione del cancro umano.** L'uso dell'ascorbato da parte di Schlegel per ritardare il cancro della vescica umana è già stato menzionato (259, 284-287). DeCosse e i suoi associati nel Wisconsin (95) hanno riferito che l'ascorbato per bocca ha indotto una certa regressione nella poliposi coloretale familiare, una condizione precancerosa ben riconosciuta (42, 105, 200, 209), e ne raccomandano l'uso come misura profilattica. Questo consiglio trova sostegno nella dimostrazione che, nella stessa condizione clinica, l'ascorbato assunto per via orale riduce la quantità di steroidi fecali mutageni (e presunti cancerogeni) (188).

Questi però sono disturbi neoplastici specifici. Lo scopo di questa revisione suggerisce che l'ascorbato supplementare può esercitare un effetto antitumorale generale.

Come sottolineato nell'introduzione, non è stato ancora condotto alcuno studio clinico prospettico adeguatamente progettato per valutare il valore dell'ascorbato supplementare nella gestione generale del cancro. Tuttavia, per coloro che sono interessati a progettare un simile studio, esiste un incoraggiante background di pubblicazioni, che vanno da casi clinici individuali, attraverso resoconti aneddotici, a studi pilota che coinvolgono un gran numero di pazienti con cancro avanzato (64,68,100,114, 129, 146, 159, 164, 177, 184, 214, 248, 261, 283, 287, 288, 289, 320, 327, 330, 331, 332), tutti riportano un certo grado di beneficio clinico conferito dall'ascorbato supplementare. I nostri studi clinici, discussi in diverse pubblicazioni (51-53, 56-59, 226), indicano fortemente che la supplementazione di ascorbato non solo aumenta il benessere ma produce anche un aumento statisticamente significativo nei tempi di sopravvivenza dei pazienti con cancro avanzato. Le prove attuali ci suggeriscono che l'assunzione supplementare di ascorbato può offrire un certo grado di beneficio a tutti i pazienti affetti da cancro in stadio avanzato e un beneficio davvero notevole per pochi fortunati e che ha un valore potenziale ancora maggiore nel trattamento di supporto di pazienti precoci e più favorevoli.

## Conclusione

Esistono prove sia da studi sull'uomo che su animali da esperimento che lo sviluppo e il progresso del cancro evocano un aumento del fabbisogno di acido ascorbico. L'acido ascorbico è essenziale

per l'integrità della matrice intercellulare e la sua resistenza alla crescita infiltrativa maligna, e vi sono prove evidenti che sia coinvolto nell'inibizione degli enzimi tumorali invasivi. È necessario per la formazione di nuovo collagene, consentendo al paziente resistente di avvolgere le sue cellule tumorali in una barriera di nuovo tessuto fibroso.

Esistono buone prove che elevate assunzioni di ascorbato potenziano il sistema immunitario in vari modi. L'ascorbato può anche offrire una certa protezione contro una varietà di agenti cancerogeni chimici e fisici e contro virus oncogeni ed è anche coinvolto in una serie di altri processi biologici che si ritiene siano coinvolti nella resistenza al cancro.

L'evidenza collettiva suggerisce che l'aumento dell'assunzione di ascorbato potrebbe produrre benefici misurabili sia nella prevenzione che nel trattamento del cancro, e studi clinici pilota tendono a supportare questa visione. L'acido ascorbico ha un vantaggio unico rispetto ad altri rimedi contro il cancro; è quasi completamente sicuro e innocuo anche se somministrato a dosi elevate e prolungate per periodi di tempo prolungati. I rischi associati a tali regimi terapeutici nel trattamento del cancro sono stati discussi altrove e si ritiene che siano accettabili (52, 54, 55, 252, 254); questi sono (a) un sospetto clinico che, nel rarissimo paziente con un tumore a crescita molto rapida esistente ai limiti estremi del supporto nutrizionale attraverso i sinusoidi e la diffusione assistita da enzimi, l'improvvisa esposizione a grandi dosi di ascorbato può far precipitare un'emorragia tumorale diffusa e una necrosi con effetti reali pericolo per il paziente, (b) un sospetto molto più forte che l'improvvisa interruzione di un regime così stabilito produca un effetto di rimbalzo di un precipitoso calo di ascorbato tissutale con una rapida riattivazione del processo neoplastico fino a quel momento controllato, e (c) il teorico ma estremamente rischio remoto che alcuni di questi pazienti suscettibili possano sviluppare calcoli di ossalato nel tratto urinario. Precedenti preoccupazioni che elevate assunzioni di ascorbato potessero indurre carenza di vitamina B12 si sono rivelate fallaci e il risultato dell'interferenza dell'ascorbato con il test di laboratorio (Rif. 254, p. 114; Rif. 133).

I rischi, reali o teorici, sono minimi e accettabili per il malato di cancro e per qualsiasi oncologo esperto.

Tenendo questo in mente, Anderson (3) ha recentemente affermato: "Il rapporto rischio/beneficio relativo alla gravità della malattia, nonché ad altri trattamenti disponibili per il cancro, è così pesantemente sbilanciato a favore della vitamina C in questa situazione che la convalida o la confutazione da parte di altri gruppi avverrà presumibilmente abbastanza rapidamente".

Siamo d'accordo e crediamo che sia essenziale che vengano effettuati senza indugio studi approfonditi sull'acido ascorbico nel cancro.