

Titolo: Riposizionamento della vitamina C per il trattamento del cancro: il microambiente tumorale come bersaglio - Repurposing Vitamin C for Cancer Treatment: Focus on Targeting the Tumor Microenvironment

Codice: ASC010

Autore: Li et al.

Data: 2022

Rivista: *Cancers* 14(11), 2608

Argomento: acido ascorbico

Accesso libero: si

DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14112608>

URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/11/2608>

BLOG: <https://www.metododibellaevidenzescientifiche.com/2024/10/23/asc010-li-et-al-2022/>

Parole chiave: vitamina C; anti-immunità; intervento dietetico; riposizionamento dei farmaci; microambiente tumorale

Tumore: n/a

Traduzione: totale e fedele con minime semplificazioni

Punti di interesse: Il microambiente tumorale (TME) è un microecosistema altamente eterogeneo composto da cellule immunitarie, fibroblasti, vasi e matrice extracellulare (ECM). Fornisce segnali costanti di stimolazione della crescita e supporto nutrizionale alle cellule tumorali incorporate. L'immunosoppressione è uno dei tratti distintivi più importanti del TME. Pertanto, il TME è considerato un nuovo bersaglio terapeutico. Sulla base delle caratteristiche del TME, il team di autori di questo articolo ha recentemente suddiviso l'intero complesso del TME in sei microambienti specializzati, vale a dire, microambiente immunitario, microambiente metabolico, nicchia ipossica, nicchia acida, nicchia innervata e microambiente meccanico. Prove crescenti suggeriscono che il microbiota intestinale e i suoi metaboliti svolgono ruoli complessi nella tumorigenesi, sia direttamente che indirettamente. Pertanto, il microambiente microbico sta emergendo come un settimo TME specializzato che determina la direzione della progressione del cancro. Questa classificazione non riflette compartimenti fisicamente separati. Il TME è un'unità complessa con parti, simili ad organi, che dialogano tra loro, funzionano all'unisono e interagiscono con l'intero organismo. La classificazione è utile per capire le funzionalità del TME e sviluppare nuovi approcci terapeutici.

La vitamina C (VitC) o acido ascorbico (AA) non è solo un nutriente dietetico essenziale, ma un agente naturale con molteplici proprietà terapeutiche. Negli ultimi anni, si è scoperto nuovi meccanismi della VitC nella citotossicità epigenetica, immunomodulatoria e selettiva. La VitC mostra un potenziale antitumorale eccezionale: due studi molto recenti (2021 e 2022) mostrano che 1) l'assunzione di VitC è negativamente associata all'incidenza di 11 tumori in più sistemi di organi e migliora i risultati terapeutici e 2) l'integrazione di VitC porta a riduzioni dose-dipendenti della mortalità per tutte le cause e del rischio di vari tumori. Un numero ampio e in graduale aumento di studi su linee cellulari, animali e clinici ha riportato risultati positivi e messo in luce i diversi meccanismi con cui la vitamina C esercita la sua attività. La VitC esercita la sua attività antitumorale agendo non solo direttamente sulle cellule tumorali, ma anche direttamente sul TME.

VitC e microambiente immunitario. La VitC regola i processi epigenetici e le vie di segnalazione per riprogrammare ulteriormente il microambiente immunitario tumorale (TIME). Numerosi studi hanno indagato il potenziale della VitC nella modulazione delle cellule immunoreattive e immunosoppressive e delle loro secrezioni. Pertanto, la VitC è considerata un farmaco promettente per trasformare il cancro freddo (immunosoppressore) in caldo (immunoreattivo).

VitC e microambiente metabolico. Nel microambiente con nutrienti limitati, le cellule tumorali e le cellule stromali hanno una forte competizione per le fonti energetiche limitate di glucosio e glutammina. La glicolisi aerobica (effetto Warburg) e la dipendenza da glutammina conferiscono un vantaggio di crescita selettiva alle cellule tumorali. Sotto la spinta del fattore inducibile dall'ipossia (HIF) avviene una riprogrammazione del metabolismo del glucosio dalla fosforilazione ossidativa a glicolisi in varie cellule tumorali. La VitC contrasta questa riprogrammazione e promuove anche la degradazione della glutammina sintetasi inducendo uno squilibrio redox, attenuando così la crescita tumorale endogena dipendente dal glutammato. Oltre al metabolismo energetico, la regolazione precisa dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari ed extracellulari decide anche il destino delle cellule tumorali. Sebbene il sistema di difesa ossidativa all'interno delle cellule tumorali possa regolare con precisione i livelli di ROS entro l'intervallo appropriato, la VitC utilizza molteplici meccanismi per contrastare questo sistema e distruggere il tumore.

VitC e microambiente ipossico. L'ipossia è comunemente osservata nei tumori solidi a causa di una discrepanza tra vascolarizzazione e crescita tumorale. L'angiogenesi tumorale tende a essere permeabile e discontinua sotto il microambiente ipossico. Questo fenomeno promuove metastasi tumorali a distanza ostacolando al contempo l'infiltrazione delle cellule immunitarie e la somministrazione di farmaci. È stato dimostrato che la VitC inibisce sia l'angiogenesi anomala sia promuove la normalizzazione dei vasi.

VitC e microambiente acido. A seconda del sistema tampone intracellulare e del sistema di esocitosi, i tumori possono mantenere un pH intracellulare stabile ($pH_i \geq 7,4$) e un pH extracellulare più basso ($pH_e = 6,7-7,1$) in condizioni di stress metabolico. Questo fenomeno è noto come inversione del pH. Un pH disregolato influenza quasi ogni aspetto della malignità, tra cui immunosoppressione, degradazione stromale, diffusione metastatica e resistenza ai farmaci. La VitC agisce come inibitore della glicolisi, riduce i prodotti metabolici acidi endogeni, principalmente lattato e H^+ . I ROS generati dal trattamento con VitC esercitano un effetto sinergico con altri inibitori della glicolisi, fornendo una strategia terapeutica combinata. È stato recentemente scoperto che il microambiente acido agisce a sua volta sull'omeostasi della VitC. Alcuni fattori, come il gradiente di pH e il potenziale locale, possono influenzare il trasporto diffusivo passivo della VitC e regolare le concentrazioni intracellulari. Questo modello di trasporto transcellulare, sebbene non sia quello dominante, fornisce una spiegazione plausibile per la tossicità selettiva del cancro della VitC.

VitC e nicchia innervata. Attualmente mancano prove a sostegno dell'effetto della VitC sulla nicchia innervata, ma un possibile meccanismo è come neuromodulatore. La VitC è altamente arricchita nei neuroni, suggerendo il suo ruolo cruciale nella neurobiologia. Può promuovere lo sviluppo neurale, la crescita dei neuriti, modula la plasticità sinaptica e facilita l'immagazzinamento e il rilascio di altri neurotrasmettitori, come dopamina, acetilcolina, glutammato, neuropeptidi. La sintesi del collagene indotta dalla prolina idrossilasi era stata precedentemente dedotta come il meccanismo primario di promozione della formazione di mielina da parte della VitC. Recentemente, è stata evidenziata anche un'azione diretta, in quanto la VitC aumenta la demetilazione del DNA di geni coinvolti nella mielinizzazione.

VitC e microambiente meccanico. La metastasi del cancro è un processo complesso e multifase. Durante le fasi iniziali della metastasi, le cellule tumorali possono percepire cambiamenti nella rigidità della matrice extracellulare (ECM) e trasmettere segnali meccanici nella cellula, innescando il riarrangiamento del citoscheletro. La VitC svolge un ruolo importante nel microambiente meccanico, regolando le cellule stromali e la matrice extra cellulare e la segnalazione meccanica cellulare. La rigidità dell'ECM dipende principalmente dall'equilibrio tra la produzione di collagene e la degradazione da parte delle proteasi; quest'ultima influenza l'integrità della matrice e coordina le metastasi del cancro. La vitamina C oltre ad essere necessaria per la corretta formazione del collagene, inibisce anche una varietà di mRNA delle metalloproteinasi (MMP), che degradano l'ECM e rilasciano fattori di crescita che guidano le metastasi tumorali. Il trattamento con VitC

altera il profilo di espressione genica nei fibroblasti associati al cancro (CAF) contrastando così la loro promozione dell'invasione tumorale. VitC inoltre inibisce anche transizione epitelio-mesenchimale (EMT) controllando alcuni percorsi di segnalazione.

VitC e microambiente microbico. Il microambiente microbico è una rete ecologica costituita dal microbiota intestinale e dal microbiota intratumorale, nonché dai loro metaboliti. La VitC regola l'omeostasi microbica intestinale. Vari studi dimostrano che l'assunzione di vitamina C orale determina cambiamenti del microbiota intestinale e dei loro metaboliti con aumento degli acidi grassi a catena corta (SCFA), dei metaboliti del butirrato e da una diminuzione del pH. I metaboliti batterici, come gli SCFA, possono migliorare l'immunogenicità in situ e di una varietà di tumori a distanza. Questi risultati aprono nuove possibilità per la VitC di migliorare l'immunità anticancro. La VitC è anche un parametro che influenza i microbi all'interno del tumore e svolge un ruolo cruciale nel preservare l'integrità della barriera fisica contro la diffusione e la colonizzazione microbica.

Un ampio corpus di prove precliniche e cliniche mostra grandi prospettive per l'applicazione terapeutica di VitC da sola o in combinazione con altre terapie anche dietetiche come la chetogenesi e il digiuno. Il cancro non è statico ma un processo dinamico multistadio e la VitC può svolgere ruoli diversi in fasi diverse. Il valore della VitC nella terapia anticancro è riemerso, sollecitando ulteriori ricerche in futuro per sfruttare il suo potenziale nel colpire il TME e le cellule tumorali.

Traduzione articolo

Riassunto

Riepilogo semplice

Il microambiente tumorale (TME) è una rete complicata e promettenti terapie mirate al TME, come l'immunoterapia e le terapie specifiche, stanno ora affrontando problemi per bassi tassi di risposta e resistenza ai farmaci. La vitamina C (VitC) è stata ampiamente studiata come nutriente dietetico e farmaco naturale multi-target per combattere le cellule tumorali. L'attenzione si è recentemente concentrata sulle sue funzioni cruciali nel TME. Qui, discutiamo i potenziali meccanismi della VitC in diversi microambienti specializzati, caratterizziamo lo stato attuale delle sue applicazioni precliniche e cliniche e offriamo suggerimenti per studi futuri. Questo articolo intende fornire ai ricercatori di base e ai medici un quadro dettagliato della VitC che mira al microambiente tumorale.

Riassunto

Sulla base delle maggiori conoscenze sul microambiente tumorale (TME), è emerso un panorama di trattamento più completo per il targeting del TME. Questo microambiente fornisce molteplici target terapeutici grazie alle sue diverse caratteristiche, portando a numerose strategie mirate al TME. Con attività multiformi mirate ai tumori e al TME, la vitamina C è nota come un candidato promettente per la terapia combinata. In questa revisione, presentiamo nuovi progressi nel modo in cui la vitamina C rimodella il TME nelle dimensioni immunitaria, ipossica, metabolica, acida, neurologica, meccanica e microbica. Queste scoperte apriranno nuove possibilità per molteplici vie terapeutiche nella lotta contro il cancro. Esaminiamo anche le prove precliniche e cliniche disponibili della vitamina C combinata con terapie consolidate, evidenziando la vitamina C come adiuvante che può essere sfruttata per nuove terapie. Infine, discutiamo questioni irrisolte e direzioni che meritano ulteriori indagini.

1. Introduzione

Il cancro è una malattia sistemica complessa e le attuali strategie per il trattamento del cancro

combinano chirurgia, radioterapia, chemioterapia e altre modalità. Il microambiente tumorale (TME) è un microecosistema altamente eterogeneo composto da cellule immunitarie circostanti, fibroblasti, vasi e matrice extracellulare (ECM). Fornisce segnali costanti di stimolazione della crescita e supporto nutrizionale alle cellule tumorali incorporate [1]. Pertanto, il TME è considerato un nuovo bersaglio terapeutico per inibire la crescita tumorale, le metastasi e la resistenza ai farmaci. Attualmente, il modello per il trattamento del cancro è gradualmente passato da un modello incentrato sul cancro a uno incentrato sul TME. Tra questi, l'immunoterapia e le terapie mirate hanno ottenuto un successo impressionante, ma sono anche ostacolate da varie barriere.

L'immunosoppressione è uno dei tratti distintivi più importanti del TME. Le cellule T regolatorie (TREG), macrofagi associati al tumore (TAM) e cellule soppressorie derivate dai mieloidi (MDSC) si infiltrano nel TME e secernono grandi quantità di mediatori immunosoppressivi. Questo processo contribuisce all'esaurimento delle cellule effettrici del tumore e alla conversione del fenotipo M1 in M2. Inoltre, la scarsa angiogenesi è spesso correlata all'ipossia intratumorale, al basso pH e all'alta pressione. Sulla base delle caratteristiche del TME, il nostro laboratorio ha recentemente suddiviso l'intero complesso TME in sei microambienti specializzati, vale a dire, microambiente immunitario, microambiente metabolico, nicchia ipossica, nicchia acida, nicchia innervata e microambiente meccanico [2]. La classificazione del TME in base alle sue caratteristiche apre la strada a ulteriori progetti di strategie terapeutiche mirate. Prove crescenti suggeriscono che il microbiota intestinale e tumorale e i loro metaboliti svolgono ruoli complessi nella tumorigenesi e nella risposta al trattamento, sia direttamente che indirettamente. Pertanto, il microambiente microbico sta emergendo come un settimo TME specializzato che determina la direzione della progressione del cancro [3]. Questi microambienti specializzati dialogano tra loro e interagiscono con l'intero organismo per formare un ecosistema canceroso (Figura 1).

La vitamina C (VitC) (o acido ascorbico (AA)) non è solo un nutriente dietetico essenziale, ma un agente naturale con molteplici proprietà terapeutiche. Tuttavia, il dibattito sulla capacità della VitC di combattere il cancro è in corso da decenni, sebbene i risultati rimangano incerti e controversi [4,5]. Negli ultimi anni, studi preclinici hanno scoperto i nuovi meccanismi della VitC nella citotossicità epigenetica, immunomodulatoria e selettiva. Quindi, la VitC è tornata in prima linea come adiuvante per supportare vari trattamenti contro il cancro. Il riscoprire della VitC è un'opzione di combinazione efficace e promettente per colpire il TME.

In questa revisione, descriviamo brevemente il potenziale antitumorale della VitC come farmaco e poi spieghiamo i nuovi meccanismi con i quali la VitC colpisce i microambienti specializzati. Infine, riassumiamo e discutiamo i più recenti progressi nella sua monoterapia e terapia adiuvante.

2. La VitC come un esempio di riposizionamento di farmaci con attività antitumorale

Il riposizionamento di farmaci è diventato un concetto attraente grazie al suo basso costo e all'elevato profilo di sicurezza. La VitC mostra un potenziale antitumorale eccezionale tra i farmaci convenzionali correlati. Chen et al. hanno recentemente implementato una revisione generale per valutare l'associazione tra assunzione di VitC e incidenza e prognosi del cancro. Questo studio di 3562 articoli (da revisioni sistematiche e meta-analisi) su 22 tumori ha dimostrato che l'assunzione di VitC era negativamente associata all'incidenza di 11 tumori in più sistemi di organi, insieme a migliori risultati del cancro nei pazienti con cancro al seno quando integrati con VitC [6]. In linea con questa conclusione, un altro studio generale che includeva 76 meta-analisi ha dimostrato che l'integrazione di VitC ha portato a riduzioni dose-dipendenti della mortalità per tutte le cause e del rischio di vari tumori [7]. Tuttavia, due studi sulla salute degli infermieri condotti rispettivamente per 32 e 22 anni non hanno mostrato alcuna associazione tra assunzione di VitC e rischio di cancro al seno. Questa scoperta è coerente con la maggior parte degli studi prospettici precedenti [8]. Le attuali prove epidemiologiche sulla prevenzione o il trattamento dei tumori da parte della VitC sono incoerenti e richiedono un ulteriore supporto da studi di laboratorio e clinici. Un numero ampio e in

graduale aumento di linee cellulari, studi sugli animali e clinici ha riportato risultati positivi (Tabella 1). In varie linee cellulari tumorali, in particolare nel linfoma, la dose farmacologica di VitC agisce come un profarmaco H_2O_2 nei tessuti, inducendo selettivamente l'apoptosi o la necrosi nelle cellule tumorali senza compromettere le cellule normali [9]. Nelle cellule tumorali del colon-retto mutanti KRAS e BRAF, Yun et al. hanno chiarito che l'acido deidroascorbico (DHA) entra nella cellula tramite GLUT1 e viene quindi ridotto ad AA a spese dell'ossidazione del GSH e dell'inattivazione del GAPDH. Questo fenomeno porta a danni ossidativi letali e crisi energetiche [10]. Per i tumori ematologici e alcuni tumori solidi, come il melanoma, la VitC inibisce la crescita tumorale e persino inverte la trasformazione maligna attraverso la regolazione epigenetica dei profili di espressione genica [11,12]. Il melanoma e il cancro al seno nei topi con carenza di VitC hanno mostrato una maggiore propensione all'invasività e alle metastasi, mentre la VitC ripristinata ha inibito quei comportamenti maligni [13]. Nel cancro ovarico, la combinazione di VitC con carboplatino e paclitaxel sopprime la crescita dello xenotrapianto e possiede un'efficienza notevolmente più forte della sola chemioterapia. La VitC per via endovenosa (IVC) allevia anche gli effetti avversi correlati alla chemioterapia nei pazienti clinici [14]. Inoltre, molti studi clinici controllati randomizzati completati e in corso sono stati progettati per esplorare l'impatto di IVC o VitC orale sul trattamento e sulla prognosi del cancro (disponibile online: <https://clinicaltrials.gov> (accesso il 20 maggio 2022)). Questi risultati suggeriscono che gli effetti biologici della VitC sono apparentemente dose-dipendenti, con diverse concentrazioni raggiunte tramite somministrazione orale o parenterale, esercitando effetti antitumorali multiformi. In termini di meccanismi di trasporto, i trasportatori transmembrana sodio dipendenti (SVCT) e GLUT trasportano rispettivamente acido ascorbico e DHA e promuovono l'accumulo intracellulare nelle cellule tumorali e in altre cellule normali. I livelli di espressione di questi due trasportatori variano a seconda dell'organo e corrispondono alle concentrazioni plasmatiche, alle esigenze metaboliche e ad alcune mutazioni genetiche specifiche [33]. Il meccanismo è alla base delle funzioni come cofattore per potenziare HIF, TET, JHMD e altre idrossilasi, coinvolgendo così una varietà di reazioni enzimatiche (Figura 2).

3. La VitC non colpisce solo i tumori ma anche il TME per esercitare attività anticancro

La maggior parte degli studi precedenti si è concentrata sul ruolo della VitC nel colpire le cellule tumorali in isolamento. Man mano che emergono gli effetti sulle cellule non tumorali vicine e sulle loro secrezioni, gli studi sui meccanismi alla base del microambiente tumorale specializzato contribuiranno a una comprensione più approfondita dell'impatto della VitC nel microambiente complesso (Figura 3).

3.1. VitC e microambiente immunitario

La VitC regola i processi epigenetici e le vie di segnalazione per riprogrammare ulteriormente il microambiente immunitario tumorale (TIME). Numerosi studi hanno indagato il potenziale della VitC nella modulazione delle cellule immunoreattive e immunosoppressive e della loro secrezione. Pertanto, la VitC è considerata un farmaco promettente per trasformare il cancro freddo (immunosoppressore) in caldo (immunoreattivo).

La VitC può invertire il TME immunosoppressivo a livello cellulare e molecolare. La VitC aumenta l'infiltrazione delle cellule T nel TME e promuove la formazione della memoria immunitaria. Ulteriori studi hanno scoperto che i linfociti T infiltrati hanno un rapporto CD8+/CD4+ elevato, che riflette un significativo miglioramento nell'effetto antitumorale [18,34]. Durante la differenziazione precoce delle cellule Natural Killer (NK), la VitC aumenta la frequenza dell'espressione del gene KIR, un marcatore delle cellule NK mature, migliorando la demetilazione del promotore KIR [24]. Si osserva inoltre che la VitC ad alte dosi migliora la secrezione di perforina e granzima B da parte delle cellule NK attivate [35]. I macrofagi associati al tumore (TAM) vengono convertiti in un

fenotipo M2 in risposta alle citochine immunosoppressive all'interno del TME, aiutando così il cancro a superare la sorveglianza immunitaria. Xu et al. hanno dimostrato che la VitC induce l'apoptosi dei TAM di tipo M2 infiltranti nei noduli tumorali e inibisce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) in un modello murino di cancro ovarico epiteliale [26]. Recenti scoperte di Ang et al. suggeriscono che l'espressione genica e proteica correlata al fenotipo dei monociti è influenzata dalla disponibilità intracellulare di VitC. Sebbene gli effetti esatti debbano ancora essere determinati, gli autori hanno trovato alcune alterazioni nell'espressione genica associata a M2 e nella secrezione proteica quando viene aggiunta VitC [25]. Le cellule T regolatorie (TREG) sono considerate le cellule primarie che mantengono uno stato di tolleranza immunitaria e anche per la loro robusta capacità immunosoppressiva è coinvolta la VitC [20, 36]. Questi risultati mostrano la complessità del targeting di VitC su TIME. La VitC influenza anche la funzione di altre cellule immunitarie innate (ad esempio, DC e neutrofili). Inoltre, anche i prodotti cellulari immunosoppressivi nel microambiente (ad esempio, IL6, IL17 e lattato) sono soggetti alla VitC e questi prodotti svolgono un ruolo essenziale nel rimodellamento TIME [13,22,37].

3.2. *VitC e microambiente metabolico*

Nel microambiente con nutrienti limitati, le cellule tumorali e le cellule stromali hanno una forte competizione per le fonti energetiche limitate di glucosio e glutammina. La glicolisi aerobica (effetto Warburg) e la dipendenza da glutammina conferiscono un vantaggio di crescita selettiva alle cellule tumorali, inibendo così l'attività delle cellule stromali circostanti. La VitC contrasta la riprogrammazione del metabolismo del glucosio, spinta dal fattore inducibile dall'ipossia (HIF) dalla fosforilazione ossidativa (OXPHOS) a glicolisi in varie cellule tumorali. Inoltre, la VitC promuove la degradazione della glutammina sintetasi inducendo uno squilibrio redox, attenuando così la crescita tumorale endogena dipendente dal glutammato in vitro e in vivo [38,39]. Pertanto, la VitC può influenzare la ripartizione dei nutrienti nel TME, mentre l'effetto su altre cellule TME in un contesto tumorale deve essere ulteriormente esplorato.

Oltre al metabolismo energetico, la regolazione precisa dei livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) intracellulari ed extracellulari decide anche il destino delle cellule tumorali. Sebbene il sistema di difesa ossidativa all'interno delle cellule tumorali possa regolare con precisione i livelli di ROS entro l'intervallo appropriato, la VitC ad alto dosaggio utilizza molteplici meccanismi per contrastare questo sistema e distruggere il tumore. L'accumulo di ROS nei fibroblasti contribuisce alla conversione in un fenotipo di fibroblasti associato al cancro, che spinge il tumore verso l'invasività e la progressione [40]. La dose fisiologica di VitC previene il fenotipo miofibroblastico indotto dalle radiazioni eliminando i ROS nei fibroblasti [41]. La matrice extracellulare (ECM) è anche sotto costante stress ossidativo a causa della stimolazione infiammatoria cronica nel cancro. Le cellule, come Treg e MDSC, possono rilasciare ROS nel microambiente, mentre i ROS elevati promuovono la crescita del tumore e l'angiogenesi e stimolano a loro volta la proliferazione cellulare immunosoppressiva [42]. I ROS svolgono anche un ruolo critico nel rimodellare l'ECM e modulare l'interfaccia tra ECM e cellule tumorali, specialmente durante il distacco dell'ECM [43]. L'uso delle proprietà antiossidanti della VitC per combattere i tumori è controverso perché gli studi hanno scoperto che alcuni tumori possono aumentare la regolazione degli antiossidanti per neutralizzare le ROS e alleviare lo stress ossidativo.

3.3. *VitC e microambiente ipossico*

L'ipossia è comunemente osservata nei tumori solidi a causa di una discrepanza tra vascolarizzazione e crescita tumorale. L'angiogenesi tumorale tende a essere permeabile e discontinua sotto il microambiente ipossico. Questo fenomeno promuove metastasi tumorali a distanza ostacolando al contempo l'infiltrazione delle cellule immunitarie e la somministrazione di farmaci [44]. È stato dimostrato che la VitC inibisce sia l'angiogenesi anomala sia promuove la

normalizzazione dei vasi. La somministrazione orale di alte dosi di VitC ha soppresso l'angiogenesi tumorale nei topi affetti da cancro al colon, riducendo l'espressione e la secrezione di VEGF-A e VEGF-D [45]. La VitC compromette l'attività della COX-2 e inibisce l'espressione dell'mRNA del VEGF nelle cellule del melanoma in modo dipendente dal tempo [46]. In termini di architettura vascolare, la VitC attenua la permeabilità vascolare inducendo la retrazione delle cellule endoteliali e prevenendo epigeneticamente l'apoptosi delle cellule endoteliali [37,47].

Il microambiente ipossico offre anche opportunità uniche per la terapia IVC. L'elevata espressione di HIF stimolata dall'ipossia aumenta la sensibilità delle cellule tumorali alla VitC [48]. Ad esempio, la vascolarizzazione tumorale anomala prolunga il tempo di residenza della VitC all'interno del tumore. Il GLUT1 indotto da HIF aumenta l'accumulo intracellulare di DHA e rende le cellule tumorali più sensibili al trattamento con VitC. L'adattamento ipossico indipendente da HIF delle cellule tumorali aumenta anche la vulnerabilità al cancro. La risposta a proteine dispiegate (UPR) viene attivata per alleviare lo stress del reticolo endoplasmatico (ER) in risposta a ipossia grave e persistente. Se l'UPR non è sufficiente ad alleviare efficacemente lo stress eccessivo dell'ER, indurrà le cellule tumorali a subire l'apoptosi. La VitC aumenta l'apoptosi del cancro al seno mediata dallo stress dell'ER tramite l'attivazione un effetto indipendente dalle ROS [49]. Di conseguenza, la sovraespressione di HIF, GLUT e l'elevato stress dell'ER possono funzionare da biomarcatori per predire l'efficacia del trattamento con VitC.

3.4. VitC e microambiente acido

A seconda del sistema tampone intracellulare e del sistema di esocitosi, i tumori possono mantenere un pH intracellulare stabile ($pH_i \geq 7,4$) e un pH extracellulare più basso ($pH_e = 6,7-7,1$) in condizioni di stress metabolico. Questo fenomeno è noto come inversione del pH [50]. Un pH disregolato influenza quasi ogni aspetto della malignità, tra cui immunosoppressione, degradazione stromale, diffusione metastatica e resistenza ai farmaci. La VitC agisce come inibitore della glicolisi per ridurre i prodotti metabolici acidi endogeni, principalmente lattato e H^+ . Da un lato, la VitC inibisce direttamente l'espressione dei geni correlati alla glicolisi mediata da HIF-1 α e i metaboliti acidi a valle [51]. D'altro canto, i ROS generati dal trattamento con VitC esercitano un effetto sinergico con altri inibitori della glicolisi, fornendo una strategia terapeutica combinata [15,52]. Anche l'anidrasi carbonica 9 (CAIX) indotta dall'ipossia e il trasportatore monocarbossilato (MCT) sono due fattori cruciali a valle dell'HIF, che catalizzano l'idratazione della CO_2 per produrre protoni e guidare l'esportazione di H^+ e lattato. Un'analisi retrospettiva dei tessuti del cancro al seno derivati dai pazienti ha mostrato che il gruppo a basso contenuto cellulare di VitC ha espresso livelli più elevati di HIF e CA-IX rispetto al gruppo ad alto contenuto, il che implica un grado di malignità più elevato e una prognosi sfavorevole [53]. L'inibitore della pompa protonica (PPI) può inibire la V-ATPasi, che a sua volta regola il gradiente di pH intracellulare ed extracellulare e resiste alla resistenza ai farmaci indotta dal microambiente acido. È stato anche riportato che il PPI riduce il rilascio di esosomi dalle cellule del melanoma in risposta alla stimolazione a basso pH [54]. Li et al. hanno dimostrato che la VitC agisce in sinergia con il pantoprazolo per superare la resistenza ai farmaci nel cancro alla prostata e inibire la secrezione di esosomi [55]. È stato recentemente scoperto che il microambiente acido agisce a sua volta sull'omeostasi della VitC. Alcuni fattori, come il gradiente di pH e il potenziale locale, possono influenzare il trasporto diffusivo passivo della VitC e regolare le concentrazioni intracellulari [56]. Questo modello di trasporto transcellulare, sebbene non sia quello dominante, fornisce una spiegazione plausibile per la tossicità selettiva del cancro della VitC.

3.5. VitC e nicchia innervata

Attualmente mancano prove a sostegno dell'effetto della VitC sulla nicchia innervata, ma un possibile meccanismo è come neuromodulatore. L'effetto protumorale della noradrenalina è uno dei

risultati relativamente espliciti in questo campo poco studiato [57]. La biosintesi della noradrenalina delle cellule nervose dipende dalla dopamina β idrossilasi e la VitC può agire come cofattore per l'enzima per migliorare l'attività [58]. Inoltre, la VitC modula la plasticità sinaptica e facilita l'immagazzinamento e il rilascio di altri neurotrasmettitori, come dopamina, acetilcolina, glutammato, neuropeptidi [59,60,61].

Oltre ai neuroni, le cellule gliali, come le cellule di Schwann e gli oligodendrociti, svolgono un ruolo non trascurabile nelle comunicazioni neuro-tumorali. Un esempio recente nel cancro al pancreas indica che l'autofagia delle cellule di Schwann è attivata e promuove l'invasione perineurale (PNI) [62]. La sintesi del collagene indotta dalla prolina idrossilasi era stata precedentemente dedotta come il meccanismo primario di promozione della formazione di mielina da parte della VitC. Recentemente, Huff et al. hanno riferito che la VitC aumenta la demetilazione del DNA dei geni coinvolti nella mielinizzazione delle cellule di Schwann e nella formazione della ECM [63].

La VitC è altamente arricchita nei neuroni, suggerendo il suo ruolo cruciale nella neurobiologia. La VitC può promuovere lo sviluppo neurale, promuovere la crescita dei neuriti e mediare l'accoppiamento metabolico tra cellule gliali e neuroni attraverso il ciclo AA [64,65].

Contrariamente ai risultati precedenti, Ferrada et al. hanno dimostrato in uno studio in vitro che dosi fisiologiche di VitC (200 μ M) hanno indotto apoptosi necrotizzante nei neuroni [32].

Collettivamente, questi studi esistenti indicano almeno che la VitC è necessaria per la funzione neurobiologica nel TME.

3.6. VitC e microambiente meccanico

La metastasi del cancro è un processo complesso e multifase che coinvolge una serie di eventi maligni. Durante le fasi iniziali della metastasi, le cellule tumorali possono percepire cambiamenti nella rigidità della matrice extracellulare (ECM) e trasmettere segnali meccanici nella cellula, innescando il riarrangiamento del citoscheletro. La VitC svolge un ruolo importante nel microambiente meccanico, regolando dalle cellule stromali e dall'ECM alla segnalazione meccanica cellulare. La rigidità dell'ECM dipende principalmente dall'equilibrio tra la produzione di collagene e la degradazione da parte delle proteasi, che influenza l'integrità della matrice e coordina le metastasi del cancro [66]. La vitamina C migliora l'idrossilazione dei residui di prolina e lisina essendo il cofattore della prolil-idrossilasi del collagene e della lisil-idrossilasi per formare la corretta conformazione a tripla elica [30]. La vitamina C inibisce una varietà di mRNA delle metalloproteinasi (MMP), che degradano l'ECM e rilasciano fattori di crescita che guidano le metastasi tumorali [13,67]. I fibroblasti associati al cancro (CAF), le principali cellule stromali che costituiscono l'ECM, sono importanti nel rimodellamento dell'ECM secernendo molteplici tipi di collagene e MMP. Rispetto ai fibroblasti normali, i CAF spesso ottengono caratteristiche immortali e una maggiore capacità secretoria per promuovere l'invasione del tumore. Il trattamento con VitC altera il profilo di espressione genica nei fibroblasti embrionali di topo immortalizzati (MEF), dove i geni associati alla sintesi del collagene, all'adesione cellulare e alla matrice extracellulare erano stati significativamente sottoregolati. Ancora più importante, VitC ha mostrato un duplice effetto dose-dipendente su i MEF immortalizzati, simile alle cellule cancerose [68]. VitC inibisce anche transizione epitelio-mesenchimale (EMT) controllando alcuni percorsi di segnalazione. Nel complesso, la biomeccanica e i segnali meccanici della ECM potrebbero rappresentare un bersaglio per la VitC per ostacolare l'invasione maligna e le metastasi.[69, 70, 71, 72].

3.7. VitC e microambiente microbico

Il microambiente microbico è una rete ecologica costituita dal microbiota intestinale e dal microbiota intratumorale, nonché dai loro metaboliti. In particolare, l'asse immuno-oncologia-microbioma (IOM) è una delle direzioni più promettenti e un bersaglio terapeutico.

La VitC regola l'omeostasi microbica intestinale. Pham e Otten et al. hanno condotto indipendentemente due studi pilota esplorando gli effetti della somministrazione mirata delle vitamine sulla composizione e sul metabolismo della flora. Pham et al. hanno utilizzato il sequenziamento del macrogenoma e hanno scoperto che la diversità del microbiota α e l'abbondanza relativa di *Collinsella* fecale erano aumentate rispetto al pretrattamento, accompagnate da un aumento degli acidi grassi a catena corta (SCFA), dei metaboliti del butirrato e da una diminuzione del pH [73]. A differenza di quanto sopra, Otten et al. non hanno analizzato direttamente i metaboliti intestinali, ma hanno riscontrato un aumento significativo ($p < 0,05$) nell'abbondanza relativa di *Lachnospiraceae* nella flora, un microbo che produce anche SCFA [74]. La proporzione di batteri strettamente anaerobici è stata collegata al potenziale redox intestinale e questa scoperta può aiutare a spiegare le alterazioni del microbiota. Dato che i metaboliti batterici, come gli SCFA, possono migliorare l'immunogenicità in situ e di una varietà di tumori a distanza, i risultati aprono nuove possibilità per la VitC di migliorare l'immunità anticancro [75]. La VitC è anche un parametro che influenza i microbi all'interno del tumore. Innanzitutto, la VitC svolge un ruolo cruciale nel preservare l'integrità della barriera fisica contro la diffusione e la colonizzazione microbica [31]. Inoltre, l'aumento della trascrizione retrovirale nelle cellule tumorali da parte della VitC sembra amplificare l'efficacia di immunoterapie specifiche e della terapia epigenetica [35,76]. La morte cellulare immunogenica (ICD) indotta dal virus oncologico è un'immunoterapia anticancro e Ma et al. hanno riferito che i ROS derivate da alte dosi di VitC migliorano l'efficacia di questa terapia [77].

Questi risultati diretti e indiretti producono anche uno scenario interessante: gli integratori alimentari o di VitC possono mirare alla microecologia intestinale per creare sinergia con la terapia antitumorale.

3.8. *L'interazione tra VitC e il complicato TME metastatico*

Per essere precisi, i TME sono più simili a un'unità complessa con parti caratteristiche piuttosto che a compartimenti separati. I focolai tumorali metastatici mantengono le caratteristiche del tumore primario, evolvendosi anche per adattarsi a processi metastatici inefficienti e nuovi organi bersaglio. Ad esempio, l'osso è uno dei siti più comuni di metastasi per tumori avanzati multipli, esibendo caratteristiche complesse e uniche nell'immunosoppressione, nell'ipossia e nel rimodellamento dell'ECM. Sono state fornite prove considerevoli a sostegno del ruolo della VitC nel metabolismo osseo, pertanto vale la pena di esplorare se la VitC influenzi le metastasi ossee. Durante le metastasi ossee, i composti cellulari prodotti dal tumore primario entrano nel flusso sanguigno e agiscono in siti distanti, stimolando l'angiogenesi e l'infiltrazione di Treg, MDSC e altre cellule immunitarie per generare una nicchia pre-metastatica. Le cellule tumorali colonizzate interagiscono quindi continuamente con i microambienti per promuovere il rimodellamento scheletrico e l'immunosoppressione, culminando in metastasi ossee evidenti [78]. Inoltre, l'ipossia e il rimodellamento dell'ECM sono coinvolti nel processo. Attraverso meccanismi epigenetici, la VitC migliora significativamente il metabolismo osseo e la formazione ossea. La VitC modula la differenziazione delle cellule stromali, promuovendo lo sviluppo degli osteoblasti e sopprimendo gli osteoclasti, alleviando possibilmente l'osteolisi aggressiva indotta dal tumore [79,80]. La sintesi del collagene di tipo I è potenziata dalla VitC, che non solo migliora la stabilità della matrice ossea, ma contribuisce anche alla differenziazione degli osteoblasti [81]. Inoltre, Kolke et al. hanno dimostrato che dosi più elevate di VitC (100 μ M) hanno alterato l'espressione dei miRNA per regolare positivamente o negativamente le vie di segnalazione associate all'adesione cellulare, alla differenziazione e alla staminalità cellulare nelle cellule stromali mesenchimali del midollo osseo (BMSC) [82]. Hie et al. hanno riportato che lo stato di carenza di VitC regola positivamente l'espressione di via di segnalazione in vitro e in vivo che accelera le metastasi ossee [83]. Questi

risultati indicano che la VitC può inibire la crescita del tumore agendo sulle metastasi, così come sul tumore principale.

La ricerca esistente sugli effetti della VitC sul microambiente osseo si concentra principalmente sulla prevenzione dell'osteolisi e della perdita ossea. Sono necessarie ulteriori ricerche su questa funzione per alcune metastasi osteogeniche, come il cancro alla prostata [84]. In ogni caso, la VitC può aiutare i pazienti con tumori avanzati a evitare complicazioni come l'osteoporosi e le fratture agendo come trattamento di supporto.

4. Applicazione della VitC come agente singolo o adiuvante per colpire la TME

Visto che le vie di somministrazione diverse corrispondono a diverse biodisponibilità e l'accesso dibattito su i risultati degli studi di Cameron e Pauling, l'interesse per la capacità antitumorale della VitC ha ripreso vigore [85]. Presenteremo le ultime applicazioni della VitC contro i tumori sia come agente singolo che in combinazione (Tabella 2).

4.1. Monoterapia

Sebbene sia stato segnalato che la sola VitC inibisce la vitalità di vari tumori solidi ed ematologici negli studi preclinici, diversi studi clinici di fase I/II non hanno ottenuto risultati di supporto dalla terapia IVC [100,101,102]. Tuttavia, la monoterapia è un'opzione eccellente per indagare la sicurezza e gli effetti avversi della terapia con VitC, in quanto può escludere interferenze farmaco-farmaco e valutare l'effetto terapeutico. Una dose elevata di IVC è ben tollerata dalla maggior parte dei pazienti, con solo lievi effetti avversi. Le reazioni avverse più frequenti includono nausea, diarrea, secchezza e mal di testa e questi effetti si risolvono solitamente alla fine del trattamento [101,103]. Tuttavia, gravi reazioni avverse, come emolisi e calcoli renali in una minoranza di pazienti, devono essere monitorate attentamente. La monoterapia con VitC nelle cure palliative allevia il dolore e l'affaticamento correlati al cancro e migliora la qualità della vita dei pazienti [104]. I risultati della monoterapia sono alla base della logica e della fattibilità della terapia di combinazione. In futuro, dovranno essere condotti studi clinici randomizzati su larga scala per escludere gli effetti placebo, prevedere la reattività nei pazienti e identificare la dose ottimale da somministrare.

4.2. Terapia combinata

La VitC è ampiamente esplorata come strategia di trattamento adiuvante. La sua combinazione con radioterapia e chemioterapia convenzionali amplifica la citotossicità per le cellule tumorali e riduce gli effetti collaterali correlati al trattamento e gli effetti off-target. Diverse revisioni hanno riassunto la ricerca in quest'area [105,106]. In questo articolo, ci concentreremo sulla combinazione di VitC con nuove terapie nei tumori e nella TME.

Per la terapia mirata, la natura multiforme di VitC facilita la sua combinazione con diverse strategie. Le future terapie potrebbero trarre vantaggio da una combinazione di VitC e farmaci anti-angiogenici, come inibitori multi-chinasi a piccole molecole e anticorpi monoclonali VEGF. La VitC migliora l'efficienza di uccisione delle cellule Hep G2 mediante sorafenib a basso dosaggio in vitro. Gli autori hanno anche segnalato un paziente con metastasi alle costole che ha ottenuto una remissione più prolungata dopo aver ricevuto una terapia di combinazione [90]. Per valutare l'efficacia e la sicurezza di IVC in combinazione con erlotinib e gemcitabina, è stato implementato uno studio clinico di fase I su pazienti con cancro pancreatico metastatico. L'aggiunta di VitC non ha aumentato gli effetti avversi ma ha alleviato la progressione del tumore [91]. Bevacizumab inibisce la crescita del tumore bloccando il legame del VEGF al recettore endoteliale vascolare, che ha come bersaglio il sistema vascolare del tumore. Sono stati eseguiti tre studi clinici per indagare l'impatto di VitC combinato con bevacizumab e farmaci chemioterapici per trattare pazienti con cancro avanzato (NCT01891747; NCT02969681; NCT04516681). Le cellule staminali tumorali

(CSC) presentano una sottopopolazione con proprietà simili alle cellule staminali di auto-rinnovamento e differenziazione, che sono considerate la radice della recidiva del cancro e della resistenza ai farmaci. La VitC ad alto dosaggio può uccidere selettivamente le CSC attraverso danni ossidativi e modifica dei geni della pluripotenza [107,108]. Diversi studi recenti hanno suggerito che la VitC agisce in sinergia con gli antibiotici (ad esempio, doxiciolina e azitromicina) prendendo di mira i mitocondri delle CSC per inibire la proliferazione e l'invasione cellulare [93,94]. Questi studi forniscono una strategia metabolica sintetica-letale per colpire specifiche cellule tumorali. Come la VitC, la metformina è un agente antitumorale versatile che prende di mira il metabolismo energetico, stimola l'immunità e rimodella il TME. È attualmente in corso uno studio clinico combinato per valutare gli effetti sinergici di VitC e metformina (NCT04033107). Inoltre, diversi studi si sono concentrati anche sulla VitC orale che migliora l'efficacia antitumorale degli agenti epigenetici [96,97,76]. Per l'immunoterapia, la strategia di combinazione ha prodotto alcuni risultati positivi [35,18,34, 86,21,109]. Per quanto riguarda nutrizione e metabolismo, diversi studi hanno tentato di esplorare l'IVC con terapia nutrizionale nei pazienti oncologici. La dieta che imita il digiuno e la dieta chetogenica ritardano la progressione del tumore riducendo il glucosio nel TME e migliorando l'immunità. Di Tano et al. hanno dimostrato che la dieta che imita il digiuno e il trattamento con VitC hanno esercitato un effetto sinergico sul danno ossidativo e sulla citotossicità indotta dalla chemioterapia nei tumori KRAS-mutanti [99]. In un altro studio, i pazienti che hanno ricevuto IVC dopo la terapia chetogenica avevano livelli aumentati di corpi chetonici e un'inflammatione generalizzata ridotta rispetto al pretrattamento [98]. Nonostante i risultati incoraggianti, la sicurezza di questa strategia di restrizione calorica rimane discutibile, considerando che i pazienti oncologici spesso soffrono di malnutrizione e di un aumento del dispendio energetico.

5. Conclusioni

Abbiamo fornito una prospettiva multilivello e sfaccettata sull'attività antitumorale di VitC. Abbiamo discusso molti aspetti, come l'immunità tumorale, il metabolismo, la neuromodulazione e il microbioma. Un ampio corpus di prove precliniche e cliniche mostra grandi prospettive per l'applicazione terapeutica di VitC, in particolare con immunoterapia, terapie mirate e terapie dietetiche. Nonostante i nuovi progressi nei meccanismi anticancro della VitC, alcune sfide meritano un'indagine approfondita: (1) se le proprietà antiossidanti della VitC promuovano la diffusione del tumore; (2) se la VitC possa essere combinata con terapie dietetiche, come la chetogenesi e il digiuno; e (3) l'effetto della VitC sul microbioma e l'efficacia della VitC derivata dai batteri. Il cancro non è statico ma un processo dinamico multistadio e la VitC può svolgere ruoli diversi in fasi diverse. Il valore della VitC nella terapia anticancro è riemerso, sollecitando ulteriori ricerche in futuro per sfruttare il suo potenziale nel colpire il TME e le cellule tumorali.