



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Biomediche**

CICLO XXXIII

COORDINATORE Prof. Stefani Massimo

**Un aiuto dalla natura
nella lotta contro i tumori:
proprietà antineoplastiche di prodotti derivanti
da piante di olivo**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/12

Dottorando

Dott. Ruzzolini Jessica

Tutore

Prof. Nediani Chiara

Coordinatore

Prof. Stefani Massimo

Anni 2017/2020

INDICE

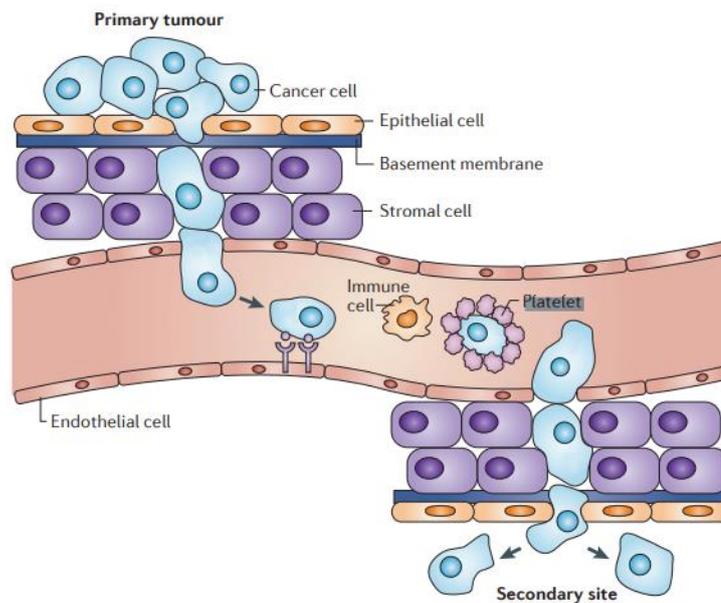
INTRODUZIONE	3
Sviluppo e progressione neoplastica	3
Metabolismo tumorale	5
Terapia antitumorale	8
Resistenza farmacologica	11
Nutraceutica	15
SCOPO DELLA RICERCA	25
MATERIALI E METODI	27
RISULTATI	36
1. Oleuropeina glucoside e melanoma	36
1.1 Effetti del trattamento con Oleuropeina (Ole) glucoside su cellule di melanoma	36
1.2 Effetti del co-trattamento Vemurafenib (PLX4032) + Ole glucoside su cellule di melanoma A375.....	39
1.3 Effetti del co-trattamento Dacarbazina (DTIC) + Ole glucoside su cellule di melanoma A375.....	40
1.4 Effetti del co-trattamento Everolimus (RAD001) + Ole glucoside su cellule di melanoma A375.....	42
1.5 Effetti del co-trattamento Everolimus (RAD001) +Ole glucoside su cellule di melanoma A375 resistenti a PLX4032.....	44
2. Estratto da foglia di olivo arricchito in Oleuropeina (OLEO) e melanoma	45
2.1 Effetti del trattamento combinato di DTIC, PLX4032, RAD001 + OLEO su cellule di melanoma A375	46
2.2 Caratterizzazione delle cellule di melanoma A375 trattate con OLEO	47
2.3 Effetti del trattamento con OLEO sul metabolismo glicolitico di cellule di melanoma	50
2.4 Effetti del trattamento con OLEO sul metabolismo glicolitico di cellule di tumore del seno, del colon e su cellule di leucemia	52
3. Estratto da foglia di olivo arricchito in Oleuropeina (OLEO) e tumore del colon: valutazione in vitro e in vivo	53
3.1 Valutazione degli effetti di OLEO in cellule di tumore del colon HCT116	53
3.2 Valutazione di una dieta arricchita in OLEO su ratti Pirc.....	54
3.3 Valutazione degli effetti di OLEO su macrofagi murini RAW264.7.....	56
4. Estratto da foglia di olivo arricchito in Oleuropeina (OLEO) + Oleocantale (OC) e leucemia mieloide cronica	57
DISCUSSIONE	62
CONCLUSIONI	76
BIBLIOGRAFIA	77

INTRODUZIONE

Sviluppo e progressione neoplastica

Nonostante la medicina abbia fatto passi da gigante nel ridurre la mortalità e aumentare la sopravvivenza media della popolazione, il cancro rimane una delle principali cause di morte nel mondo. Il cancro si forma a partire da lesioni pre-maligne come displasie e iperplasie che possono interessare diversi organi; a livello di queste lesioni le cellule possono andare incontro a proliferazione incontrollata dovuta all'accumulo di mutazioni genetiche, in alcuni casi favorita da fattori esterni come le infezioni virali [1]. Agli inizi degli anni '90 studi genetici condotti su diversi tipi di tumore hanno condotto all'ipotesi che sono necessari 6 tipi di mutazioni per convertire una cellula normale in tumorale [2,3]; tali mutazioni portano a i) non dipendenza dai segnali di crescita, ii) proliferazione incontrollata, iii) resistenza all'apoptosi, iv) capacità di replicazione infinita v) capacità angiogenica sostenuta, vi) capacità di invadere e dare metastasi.

L'accumulo di mutazioni porta le cellule ad acquisire un fenotipo maligno con la conseguente formazione del tumore primario. Nella maggior parte dei casi, la morte da tumore non avviene direttamente a causa del tumore primario, bensì delle metastasi. Le metastasi sono causate da cellule dal carattere particolarmente invasivo che si staccano dal tumore primario per andare a colonizzare un sito secondario. La formazione di metastasi è un processo molto articolato che prevede una serie di eventi che costituiscono la cosiddetta "cascata metastatica"; alcune cellule facenti parte del tumore primario perdono contatto con le cellule vicine, quindi si distaccano dalla massa tumorale e invadono i tessuti circostanti fino a raggiungere i vasi ed entrare nel circolo sanguigno. Le cellule maligne che riescono a sopravvivere in circolo aderiscono poi al tessuto endoteliale e fuoriescono dai vasi sanguigni per andare a colonizzare siti secondari. Una volta stanziata negli organi bersaglio, le cellule tumorali iniziano a proliferare creando un tumore secondario, detto appunto metastasi [4].

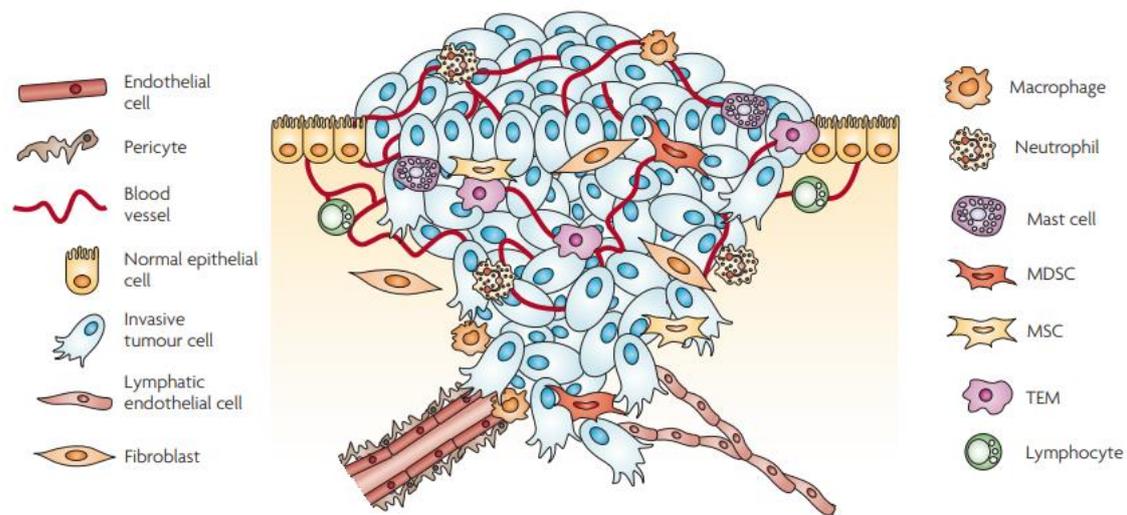


Formazione di metastasi. *Cellule tumorali maligne si distaccano dal tumore primitivo ed entrano in circolo per andare ad insediarsi in siti secondari e dare metastasi. Immagine ripresa da:[4]*

Il microambiente tumorale gioca un ruolo fondamentale nella progressione e nella diffusione metastatica; esso costituisce un sistema molto complesso che ospita diverse componenti sia cellulari che no. Al suo interno si ritrovano cellule immunitarie, vasi sanguigni, matrice extracellulare, fibroblasti, linfociti, cellule infiammatorie derivanti dal midollo osseo e molecole di segnalazione [5,6]. Le interazioni che si instaurano tra cellule maligne e componenti del microambiente tumorale sono determinanti per lo sviluppo e la progressione tumorale [7,8].

Le cellule endoteliali, e in particolare i progenitori endoteliali, promuovono il sostentamento e lo sviluppo tumorale formando nuove reti di vasi sanguigni a partire da vasi preesistenti [9], mentre le cellule immunitarie come granulociti, linfociti e macrofagi contribuiscono a favorire la sopravvivenza tumorale creando un ambiente infiammatorio favorevole per il tumore.

La componente immunitaria più rappresentata nel microambiente tumorale è quella dei macrofagi [9,10]; i macrofagi hanno diverse funzioni tra cui quella di promuovere l'immissione delle cellule tumorali nel circolo sanguigno e di sopprimere le risposte immunitarie contro il tumore [10]. Diversi studi hanno messo in luce come i macrofagi aiutino le cellule tumorali che si trovano nei vasi sanguigni ad uscire da questi per andare a formare metastasi [5,6,11] e sono anche risultati implicati nel ridurre l'azione antitumorale di radiazioni e farmaci citotossici.



Microambiente cellulare. Il tumore si trova immerso in un complesso microambiente dove coesistono diverse componenti cellulari e non che ne promuovono lo sviluppo e il sostentamento. Immagine modificata da [12]

Tutte queste componenti del microambiente tumorale, dunque, forniscono al tumore un ambiente ideale in cui crescere e propagarsi.

Metabolismo tumorale

Il tumore è per definizione una condizione morbosa caratterizzata da una proliferazione incontrollata; le cellule tumorali sono in grado di replicarsi un numero infinito di volte eludendo i meccanismi regolatori della proliferazione, mentre nelle cellule normali la proliferazione si limita ad un numero definito di cicli replicativi ed è finalizzata al mantenimento dell'equilibrio di un organo [2]. L'intensa attività replicativa nei tumori è sostenuta dal metabolismo che fornisce alla cellula tutto il necessario per proliferare molto e in tempi brevi.

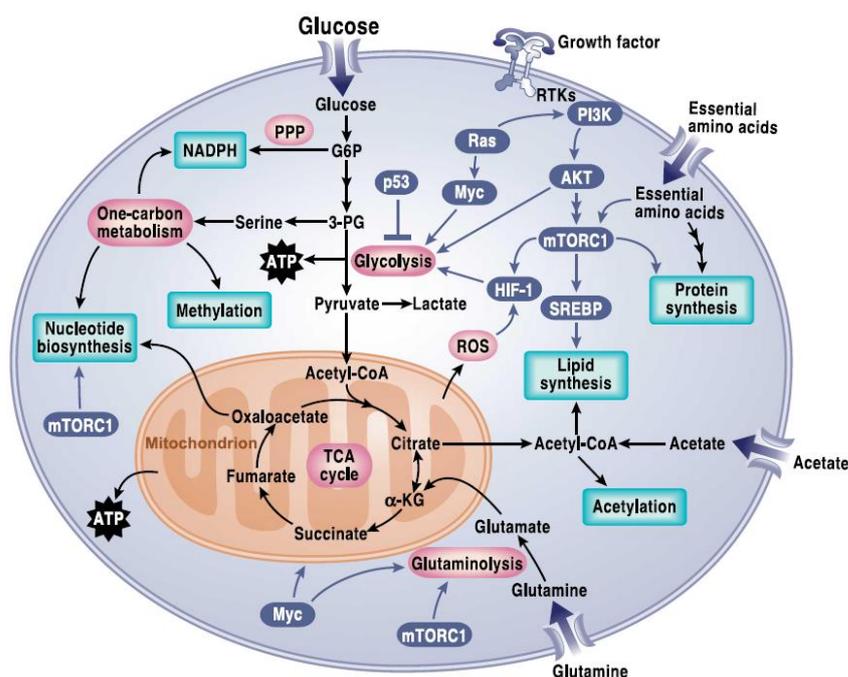
Otto Warburg negli anni 20 osservò per la prima volta una differenza significativa nel comportamento metabolico di cellule normali e cellule tumorali. Misurando il consumo di ossigeno e quantificando la produzione di lattato, non notò differenze tra cellule normali e tumorali esposte a condizioni di carenza di ossigeno, ma in presenza di ossigeno, si rese conto che mentre le cellule normali prediligevano un metabolismo di tipo ossidativo, le cellule tumorali continuavano a produrre elevate quantità di lattato [13]. Questo fenomeno da allora è noto con il nome di "effetto Warburg" o glicolisi aerobia e consiste nel fatto

che anche in presenza di ossigeno le cellule tumorali prediligono un metabolismo di tipo glicolitico, quindi consumano glucosio producendo piruvato il quale poi viene convertito in lattato tramite l'enzima lattico deidrogenasi (LDH). Questo fenomeno si contrappone all' "effetto Pasteur", per cui in cellule normali la presenza di ossigeno induce l'inibizione della glicolisi [14]: in presenza di ossigeno il glucosio viene incorporato dalle cellule e convertito in piruvato e due molecole di ATP, dopo di che il piruvato entra nel ciclo di Krebs producendo CO₂, H₂O e 36 molecole di ATP

Dunque, nel cancro si parla di "metabolismo riprogrammato" ad indicare un metabolismo alterato rispetto a quello di cellule normali e finalizzato al mantenimento della malignità del tumore.

Nonostante il metabolismo ossidativo sia più vantaggioso da un punto di vista energetico, portando ad una maggior produzione di molecole di ATP, la glicolisi fornisce in tempi più rapidi gli intermediari necessari alla sintesi del DNA e delle altre componenti cellulari. Accanto alla glicolisi, le cellule tumorali presentano una spiccata attività glutamminolitica dal momento che la glutammina è fondamentale per la produzione di biomassa [15]. La "riprogrammazione" del metabolismo tumorale è dovuta a mutazioni che colpiscono oncogeni e oncosoppressori tra cui MYC, TP53, KRas, AMPK, EGF, mTOR e HIF1-alfa [16,17]. In cellule normali, la presenza di fattori di crescita determina l'attivazione di PI3K e quindi delle vie di AKT e di mTOR che si trovano a valle, promuovendo un aumento della glicolisi e della sintesi di acidi grassi [18]. Nelle cellule tumorali la via di PI3K-AKT-mTOR risulta maggiormente attiva e minimamente dipendente da fattori di crescita, con conseguente up-regolazione della via glicolitica [19]. Anche la via di MYC risulta spesso iperattivata nei tumori, con conseguente aumento dell'espressione di molti geni, tra cui quelli coinvolti in glicolisi e glutamminolisi [20].

La proteina p53 codificata dal gene TP53 è mutata o deleta nel 50% dei tumori; la sua funzione è quella di regolare i meccanismi di riparazione del DNA, il ciclo cellulare, la senescenza e l'apoptosi cellulari, ma è stato osservato che la perdita della funzione di questa proteina si ripercuote anche sul metabolismo cellulare inducendo un aumento della glicolisi.



Metabolismo glicolitico tumorale. Le cellule tumorali esibiscono un metabolismo di tipo glicolitico che le rende particolarmente avida di glucosio e di glutamina. [21]

Alla luce di tutte queste considerazioni, sarebbe sbagliato pensare al metabolismo tumorale in senso univoco e omogeneo; al contrario il metabolismo tumorale è estremamente eterogeneo, così come eterogenei sono il tumore stesso e il microambiente in cui si trova. Il tumore si trova immerso in un contesto molto variabile in cui si hanno zone con diversa perfusione e con diverso pH; questo fa sì che le cellule sviluppino differenti assetti metabolici per adattarsi alla condizione in cui si trovano; un esempio di questo atteggiamento della cellula è quello della “simbiosi metabolica” che si instaura tra cellule esposte ad un ambiente ipossico e cellule che respirano [22]. L’ipossia è un fenomeno che si verifica quando si ha una riduzione della concentrazione di ossigeno e si instaura quando le cellule tumorali si trovano lontano dai vasi sanguigni; in tale situazione si ha la stabilizzazione dei livelli di HIF 1 α , che in condizioni di normossia viene idrossilato e ubiquinato. Nelle cellule tumorali HIF 1 α svolge svariate funzioni e in generale determina un aumento della malignità tumorale; da un punto di vista metabolico, HIF 1 α , migliora l’efficienza di *uptake* di glucosio da parte delle cellule mediante un aumento dell’espressione dei trasportatori del glucosio e incrementa l’espressione degli enzimi coinvolti nella glicolisi aerobia [23]. L’intensa attività delle cellule esposte all’ipossia si traduce nella produzione di molte molecole di lattato che vengono estruse dalla cellula con conseguente acidificazione dell’ambiente extracellulare. L’esposizione ad un ambiente acido fa sì che le cellule tumorali adottino un metabolismo di tipo ossidativo [24], per cui utilizzano il lattato rilasciato dalle cellule ipossiche come substrato della fosforilazione ossidativa [22].

Il microambiente tumorale è un sistema molto dinamico, soggetto a continue e repentine modificazioni; la propensione delle cellule tumorali ad adattarsi a tali cambiamenti si traduce in cambiamenti metabolici continui che rendono difficile la comprensione in toto del metabolismo tumorale. Tuttavia, vista l'importanza che il metabolismo riveste nella progressione neoplastica esso costituisce un valido target terapeutico e per questo motivo ad oggi è oggetto di molti studi.

Terapia antitumorale

Laddove possibile il trattamento di prima scelta contro un tumore è senza dubbio la rimozione chirurgica totale o parziale; accanto alla chirurgia esistono anche altri validi trattamenti che possono essere utilizzati anche in combinazione tra loro, ovvero la radioterapia e la chemioterapia.

La chemioterapia è stata ed è tutt'ora ampiamente utilizzata per la sua indubbia efficacia, ma il suo utilizzo comporta dei limiti notevoli. Esistono centinaia di farmaci utilizzati in chemioterapia che possono essere classificati in modo diverso; in generale si possono distinguere farmaci ad azione non mirata e farmaci ad azione mirata [25].

Farmaci ad azione non mirata

Il meccanismo d'azione alla base dei farmaci tradizionali utilizzati in chemioterapia è quello di andare a distruggere cellule in rapida proliferazione, come le cellule tumorali.

Tra questi farmaci si annoverano gli agenti alchilanti, che agiscono andando a danneggiare il DNA, anti metaboliti, inibitori della divisione mitotica e i farmaci appartenenti alla classe delle asparaginasi, che sono in grado di bloccare la sintesi proteica [25].

Di questo gruppo fanno parte anche quei farmaci che inibiscono la sintesi del DNA tra cui l'idrossiurea, le topoisomerasi I e II, agenti che si intercalano nel DNA, inibitori della metilazione del DNA, la bleomicina, che induce la rottura del DNA e gli inibitori della poly-ADP polymerase (PARP), cruciale per il mantenimento dell'integrità del DNA e dei suoi meccanismi di riparazione [26].

Alcuni farmaci appartenenti a questa classe non hanno un'azione univoca, ma al contrario possiedono più di un'attività antitumorale.

Il limite maggiore che si associa all'utilizzo di questi farmaci è la loro non specificità di bersaglio che comporta che oltre alle cellule tumorali vengano colpite anche altre cellule dell'organismo caratterizzate da un'intensa attività replicativa, ad esempio le cellule del tratto gastrointestinale, del midollo osseo e dei follicoli piliferi. Di conseguenza l'utilizzo di questi farmaci si associa spesso all'insorgenza di effetti collaterali come infiammazione delle mucose, stomatiti, soppressione delle cellule del midollo e alopecia.

Farmaci ad azione mirata

La terapia di tipo mirato nasce con l'intento di ridurre la tossicità dei trattamenti andando a bersagliare in maniera specifica le cellule tumorali. A questa classe di farmaci appartengono gli anticorpi monoclonali e tutti quegli agenti che agiscono su delle vie di segnalazione che risultano alterate nelle cellule tumorali. Questo tipo di approccio terapeutico richiede la caratterizzazione precisa del tumore che verrà trattato per individuare il bersaglio molecolare da colpire. Il tamoxifene è stato il primo farmaco nato per la terapia selettiva del tumore della mammella ormono-sensibile [27] ed ha aperto la strada ad altri farmaci che inibiscono la conversione degli androgeni in estrogeni e altri analoghi ormonali per la terapia del cancro della mammella e della prostata [28–30].

Il bersaglio comune a molti farmaci ad azione mirata è rappresentato dalle protein chinasi la cui attività è spesso alterata nei tumori.

Nel 95% delle leucemie mieloidi croniche e nel 15-30% delle leucemie acute linfoblastiche si ritrova il cromosoma Philadelphia, un cromosoma anomalo derivante dalla traslocazione t (9;22) (q34;q11) che si traduce nella fusione del gene Bcr presente sul cromosoma 22 con il gene Abl presente sul cromosoma 9 con conseguente formazione della protein chinasi Bcr-Abl che guida lo sviluppo della malattia. La terapia per le forme di leucemia caratterizzate da questa aberrazione cromosomica consiste proprio nell'utilizzo di farmaci che inibiscono selettivamente Bcr-Abl [31]. Altri recettori tirosin chinasi bersaglio dei trattamenti selettivi di patologie neoplastiche sono l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR), ErbB1, il *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs) e i *platelet-derived growth factor receptors* (PDGFRs) [32]. Più recentemente sono stati sviluppati farmaci contro mTOR [33], inibitori delle istone-deacetilasi che agiscono bloccando il ciclo cellulare [34], farmaci che legano i recettori retinoidi [35], analoghi del folato [36] e inibitori del proteasoma utilizzati per inibire la degradazione di fattori pro-apoptotici in cellule di mieloma multiplo e di linfoma mantellare [37,38].

Il limite più grande dell'uso dei chemioterapici consiste negli effetti avversi che questo tipo di trattamento può causare nel paziente; tali effetti possono essere immediati oppure possono manifestarsi in un secondo momento, e in questi casi si parla di "tossicità cronica"[39,40]. L'intensità degli effetti causati dalla chemioterapia può essere lieve, moderata, severa o può raggiungere un livello tale da mettere a rischio la vita del paziente o diventare invalidante. Gli effetti immediati interessano prevalentemente pelle, capelli, midollo osseo, apparato gastrointestinale e reni; in ogni caso tutti gli organi del corpo possono essere colpiti, inclusi organi vitali come cuore, polmoni e cervello. Le manifestazioni più gravi si associano ad eventi come parestesia, paralisi, atassia, spasmi e addirittura coma [41]. Ad esempio, l'utilizzo delle antracicline è molto limitato a causa degli effetti cardiotossici che questi farmaci inducono [42]. Gli effetti cronici, che possono comparire anche a distanza dall'interruzione della terapia, comprendono l'insorgenza della resistenza farmacologica, la carcinogenicità e l'infertilità [41]. I farmaci ad azione mirata, nonostante siano

nati per colpire in modo specifico le cellule tumorali senza danneggiare le cellule dell'ospite, non sono privi di effetti collaterali seppur minori rispetto alla terapia non mirata.

Per rendere la terapia antitumorale più sopportabile per il paziente, accanto alla chemioterapia classica che costituisce un tipo di terapia chimica, sono state sviluppate nuove terapie dette "biologiche".

Le terapie biologiche comprendono:

- Anticorpi monoclonali che agiscono su determinati recettori di fattori di crescita cellulari o su oncogeni
- Anticorpi monoclonali contro l'endotelio vascolare che bloccano l'angiogenesi connessa allo sviluppo tumorale
- Anticorpi monoclonali che bersagliano i recettori inibitori che si trovano sulle cellule T
- Cellule T geneticamente modificate per produrre un recettore delle cellule T da utilizzare nella immunoterapia (terapia con CAR-T)
- Vaccini antitumorali
- Virus oncolitici che inducono la morte selettiva di cellule tumorali.

Anche le terapie biologiche possono indurre effetti nocivi nel paziente, solo i vaccini e le terapie basate sull'uso di virus oncolitici sono ben tollerate ed eventualmente inducono effetti collaterali di scarsa entità.

Type of therapy	C or B	Mechanism of action	Side effects
1. Cytostatic drugs	C	Interfere with cell proliferation	Grade 1-4
2. Small molecule inhibitors ^a	C	Targeted therapy: Interfere with oncogenic signal transduction	Grade 1-4
3. Antitumor MAbs ^b	B	Targeted immunotherapy	Grade 1-3
4. Anti-angiogenesis MAbs ^c	B	Inhibit angiogenesis	Grade 1-3
5. Checkpoint inhibitor MAbs ^d	B	Immune regulation	Grade 1-4
6. CAR-T cells	B	Targeted cytotoxic T lymphocytes	Grade 1-3
7. Antitumor vaccines	B	Active specific vaccination	Grade 0-2
8. Oncolytic viruses ^e	B	Oncolysis, induction of immunogenic cell death	Grade 0-2

Classificazione dei farmaci utilizzati per la terapia antineoplastica. Accanto alla chemioterapia classica sono stati sviluppati dei farmaci di nuova generazione per rendere la terapia più specifica e meno tossica per il paziente. Immagine modificata da [41]

Resistenza farmacologica

Insieme all'insorgenza degli effetti collaterali, un altro grande problema associato alle terapie oncologiche è dato dalla resistenza farmacologica.

Il concetto della resistenza ai farmaci è nato in campo microbiologico quando i batteri risultavano resistenti a determinati tipi di antibiotici e da allora si è espanso anche ad altri campi, tra cui quello oncologico [43]. Esistono essenzialmente due tipi di resistenza: innata e acquisita. La resistenza innata è una proprietà che il tumore sviluppa ancor prima di subire un trattamento, mentre quella acquisita si istaura a seguito del trattamento farmacologico.

Il tasso di mutazioni di una cellula cancerosa è di gran lunga maggiore di quello di una cellula normale e soprattutto in tumori cronici che crescono per anni prima di subire un trattamento, tali mutazioni hanno tempo di svilupparsi, rafforzarsi e determinare poi resistenza farmacologica [44]. D'altra parte il trattamento farmacologico può esercitare una vera e propria pressione selettiva che si traduce in instabilità genomica a carico delle cellule tumorali [45].

La resistenza farmacologica nel cancro può essere causata da vari fattori:

- *Inattivazione del farmaco.* Molti farmaci antineoplastici per poter funzionare richiedono un'attivazione di tipo metabolico; il complesso del citocromo P450 (CYP), la famiglia delle glutatione -S-transferasi (GST) e la famiglia delle uridine difosfo-glucuronosiltransferasi (UGT) sono attivamente coinvolti nell'attivazione dei farmaci [46]. Il complesso del citocromo P450 si divide in CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 e CYP3A4, che sono conservate e quindi non soggette a particolari polimorfismi, e CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2D6 che al contrario sono altamente soggette a polimorfismi [47] e quindi maggiormente implicati nello sviluppo della resistenza farmacologica a causa di un alterato metabolismo del farmaco che si traduce nella sua inattivazione, o mancata attivazione e quindi nella sua escrezione per via renale [48].

La famiglia delle GST è costituita da enzimi ad azione detossificante la cui espressione è particolarmente elevata nei tumori; la loro azione detossificante può alterare l'azione di un farmaco rendendolo meno citotossico [49].

La famiglia delle UGT infine comprende un gruppo di enzimi che hanno la funzione di convertire substrati come steroidi, acidi biliari e xenobiotici in glucuronidi idrofilici inattivi. Il chemioterapico irinotecano è risultato maggiormente attivo in seguito a silenziamento di UGT1A1 [50,51], nel caso contrario però, cioè nel caso in cui si abbia un aumento dell'espressione di UGT1A1, il farmaco diventa meno attivo e quindi meno efficace nel contrastare il tumore.

- *Alterazione dei target farmacologici.* La chemioterapia mirata si avvale di target proteici specifici che contraddistinguono le cellule di un determinato tipo di tumore rispetto che un altro. Le cellule tumorali sono estremamente plastiche e possono sviluppare delle mutazioni a livello di questi target

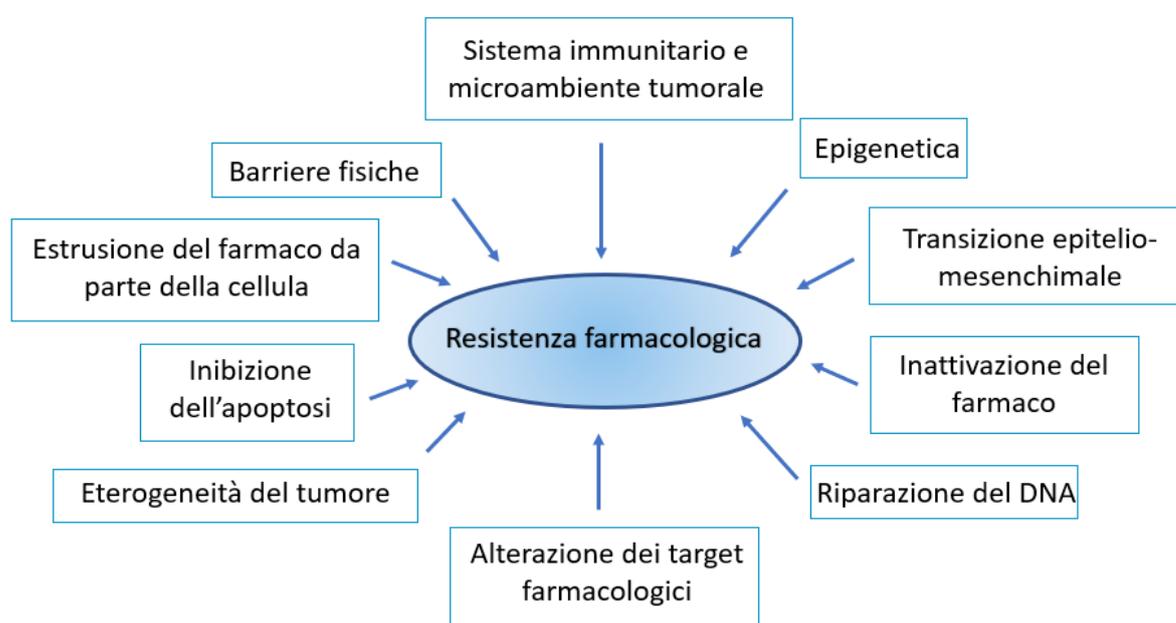
e in particolar modo a carico dei siti di legame con il farmaco che riducono notevolmente l'efficacia del trattamento. EGFR è un recettore tirosin-chinasico la cui espressione risulta aumentata in diversi tipi di tumore, come quello del collo, del colon, del pancreas e del polmone; la mutazione T790M a carico di EGFR determina resistenza al trattamento con inibitori e in pazienti affetti da tumore del polmone rappresenta ben il 60% delle cause di resistenza farmacologica [52]. Imatinib è un farmaco che viene utilizzato nel trattamento della leucemia mieloide cronica ed ha come bersaglio il recettore Bcr-Abl che origina dalla traslocazione cromosomica t(9;22); la mutazione ABL T315I porta a inefficacia del trattamento con imatinib e quindi alla resistenza del tumore [53]. Il tumore gastrointestinale stromale si contraddistingue per la presenza di mutazioni attivanti a carico del recettore chinasi KIT; la mutazione KIT T670I rende il tumore resistente alla terapia con imatinib [54]. Nel tumore della mammella trattato con tamoxifene, che agisce come antagonista del recettore per gli estrogeni, la resistenza al farmaco si instaura a causa dell'aumento dell'espressione di HER2 che porta addirittura a una stimolazione della crescita tumorale da parte di tamoxifene che si comporta come agonista del recettore stesso [55]. Anche mutazioni sulla topoisomerasi che regola gli avvolgimenti dell'elica del DNA durante la replicazione del DNA, comporta la resistenza a molti farmaci in diverse linee cellulari [56,57].

- *Estrusione del farmaco dal compartimento cellulare.* Le cellule sono dotate di proteine di membrane che sono in grado di estrarre direttamente le molecole di farmaco all'esterno della cellula o indirettamente mettendo in atto processi fisico-chimici [58,59]. Esistono essenzialmente due classi di proteine con questa funzione: i) le cassette leganti ATP (ABC) che costituiscono una famiglia di trasportatori che pompano i farmaci idrofobici fuori dalla cellula diminuendo così l'efficacia del farmaco e ii) trasportatori che interferiscono con l'*uptake* di farmaci idrofilici da parte della cellula [58,59]. Tra i trasportatori ABC implicati nella farmaco resistenza si ha la glicoproteina-P che risulta over espressa in molti tipi di cancro [60–62] ed ha una specificità per molti substrati, tra cui antracicline e tassani [63]
- *Meccanismo di riparazione del DNA.* In risposta al danno genetico indotto dai farmaci le cellule tumorali possono mettere in atto meccanismi di riparazione del DNA che diminuiscono l'effetto del farmaco. Il complesso NER (Nucleotide Excision Repair) ad esempio è in grado di riparare i danni al DNA indotti dal cisplatino [64]. Uno dei principali geni correlati a NER è ERCC1, la cui espressione aumenta in seguito al trattamento con platino e agenti alchilanti e si associa a prognosi negativa in pazienti affetti da cancro del polmone non a piccole cellule [65]. I danni al DNA indotti da terapia a base di platino possono essere riconosciuti come errori di appaiamento tra le basi e corretti [66], così come la proteina O₆-metilguanil DNA metiltransferasi (MGMT) ripara i danni indotti da terapia a base di agenti alchilanti inducendo resistenza nei tumori del sistema nervoso centrale [67]. Anche mutazioni a livello di TP53 che si ritrovano in molti tipi di tumore sono

strettamente correlati alla resistenza/sensibilità ad un farmaco [68,69], avendo la funzione di indurre apoptosi cellulare quando il danno genetico risulta irreparabile.

- *Inibizione della morte cellulare.* Nelle cellule tumorali si ritrova spesso l'over espressione di alcune proteine che sono strettamente implicate nel processo di apoptosi cellulare, in molti tipi di tumore gli alti livelli di BCL-2, AKT e altre proteine anti-apoptotiche promuovono la sopravvivenza delle cellule anche se bersagliate da farmaci. L'autofagia è un altro meccanismo di difesa cellulare che permette alla cellula di eliminare i componenti cellulare danneggiati sotto forma di fagolisosomi e quindi di sopravvivere in situazioni avverse.
- *Transizione epitelio-mesenchimale.* La transizione epitelio- mesenchimale è un processo per cui la cellula tumorale acquisisce un fenotipo di tipo mesenchimale correlato ad una maggiore capacità metastatica e ad una maggiore resistenza farmacologica. Uno dei fattori che inducono questa transizione è il microambiente acido; bassi livelli di pH si associano infatti ad una maggiore malignità tumorale e allo sviluppo di una resistenza acquisita ai trattamenti farmacologici [70,71].
- *Eterogeneità delle cellule tumorali.* Le molteplici mutazioni genetiche a cui vanno incontro le cellule tumorali fanno sì che nel tumore si ritrovi una notevole diversità genetica [72]. Tale diversità si associa ad una risposta e ad una sensibilità ai farmaci diversa.
- *Barriere fisiche.* Esistono dei siti che possono essere colonizzati dalle cellule tumorali ma che per questioni anatomiche non sono raggiungibili dai farmaci, ad esempio i tumori del sistema nervoso centrale sono protetti dalla barriera emato-encefalica, così come i tumori del peritoneo possono essere trattati solo tramite chemioterapia intraperitoneale.
- *Sistema immunitario e microambiente tumorale.* La complessità del microambiente tumorale con tutte le sue componenti può concorrere a determinare la resistenza mediante svariati meccanismi; spesso nel tumore si hanno zone di ipossia dove la scarsa perfusione sanguigna fa sì che il farmaco non raggiunga il tumore o che lo faccia solo in parte. Inoltre basse concentrazioni di ossigeno si associano a diminuzione dell'attività proliferativa e di conseguenza ad una minor efficacia dei chemioterapici che colpiscono cellule che proliferano attivamente [73]; anche la glicoproteina-P viene attivata da bassa tensione di ossigeno soprattutto in tumori solidi, con conseguente riduzione della concentrazione del farmaco all'interno della cellula [74]. In aggiunta, il pH è determinante nell'influenzare l'efficacia di un farmaco; infatti la presenza di un microambiente alcalino si associa ad un migliore *uptake* di farmaci come la doxorubicina da parte delle cellule [75,76], al contrario, un ambiente acido si correla ad un peggiore trasporto di alcuni farmaci come il metotrexato [77]. La presenza di cellule T regolatorie, macrofagi, citochine e chemochine contribuisce in modo particolare ad inibire gli effetti della terapia antitumorale immuno-mediata [78].
- *Modificazioni epigenetiche.* Ultimamente le modificazioni genetiche sono state ampiamente studiate e risultano rilevanti anche nel processo di carcinogenesi. I due principali tipi di

modificazioni epigenetiche sono la metilazione del DNA e l'acetilazione/metilazione degli istoni. La metilazione del DNA consiste nell'aggiunta di un gruppo metile alla citosina di regioni chiamate "CpG island" che si trovano principalmente nelle regioni dei promotori. Le modificazioni degli istoni invece determinano dei cambiamenti a livello della cromatina. Le modificazioni epigenetiche contribuiscono ampiamente alla sensibilità cellulare ad un determinato farmaco [79–81]. L'ipermetilazione a livello del promotore di un gene si associa al silenziamento di quel gene [82] e nel cancro dell'ovaio ciò è stato correlato alla resistenza alla terapia con cisplatino [83]. Al contrario la demetilazione di diversi geni ristabilisce la chemiosensibilità nella cellula [84].



Meccanismi di resistenza farmacologica nei tumori. L'insorgenza della resistenza farmacologica nei tumori è riconducibile a varie cause che determinano il fallimento del trattamento.

Qualunque siano le cause, nello sviluppo della resistenza ai trattamenti farmacologici sono quasi sempre coinvolte le cellule staminali tumorali. Le cellule staminali sono cellule capaci di "self renewal"; esse rappresentano la principale fonte di eterogeneità nel tumore, sono dotate di alto potenziale tumorigenico e sono in grado di dare metastasi, al contrario delle cellule differenziate [85,86]. La quota di cellule capaci di self renewal è alta in tumori avanzati, mentre in tumori in fase iniziale risulta ridotta [87].

Una caratteristica che differenzia le cellule staminali tumorali dalle altre cellule tumorali è il ciclo cellulare molto lento che fa sì che, sebbene un chemioterapico riesca a ridurre la massa tumorale andando a colpire la maggior parte delle cellule ad intensa attività proliferativa, rimane nel tumore una popolazione di cellule

non intaccate dal trattamento che sono proprio le cellule staminali tumorali [88–92]; per questo motivo il trattamento farmacologico può non essere risolutivo e la malattia può nuovamente prendere il sopravvento. Le cellule sopravvissute al trattamento, infatti, rimangono nell'organismo in uno stato di dormienza per poi dare origine a metastasi anche a distanza di molti anni dall'insorgenza del tumore primitivo.

Il primo approccio tentato per far fronte al problema della chemioresistenza è stato quello della cosiddetta “polichemioterapia”, ossia l'utilizzo di più chemioterapici con differente meccanismo di azione. Ad oggi la polichemioterapia viene ampiamente utilizzata per contrastare una larga parte di tipi tumorali e prevede corti intervalli di somministrazione della chemioterapia [93,94] e dei periodi di sospensione che servono per permettere la selezione delle cellule resistenti alla terapia che potrebbero portare alla ripresa della malattia [95] in modo da poterle colpire in un secondo tempo con un altro chemioterapico. Un altro metodo usato in clinica è quello di somministrare dosi alte di chemioterapico somministrando contemporaneamente al paziente fattori di crescita per prevenire la continua aplasia del midollo osseo.

La terapia mirata rivolta a colpire selettivamente dei bersagli molecolari di cellule neoplastiche e l'immunoterapia hanno rappresentato un notevole passo avanti nella terapia antitumorale ma purtroppo, così come per la chemioterapia, il loro utilizzo è limitato dall'insorgenza di meccanismi di resistenza nelle cellule tumorali.

La resistenza farmacologica e gli effetti collaterali che si portano dietro le terapie antineoplastiche rappresentano un grande ostacolo al trattamento oncologico ed elaborare una strategia per ridurli ed ottimizzare l'efficacia dei farmaci che abbiamo a disposizione sarebbe estremamente importante.

Nutraceutica

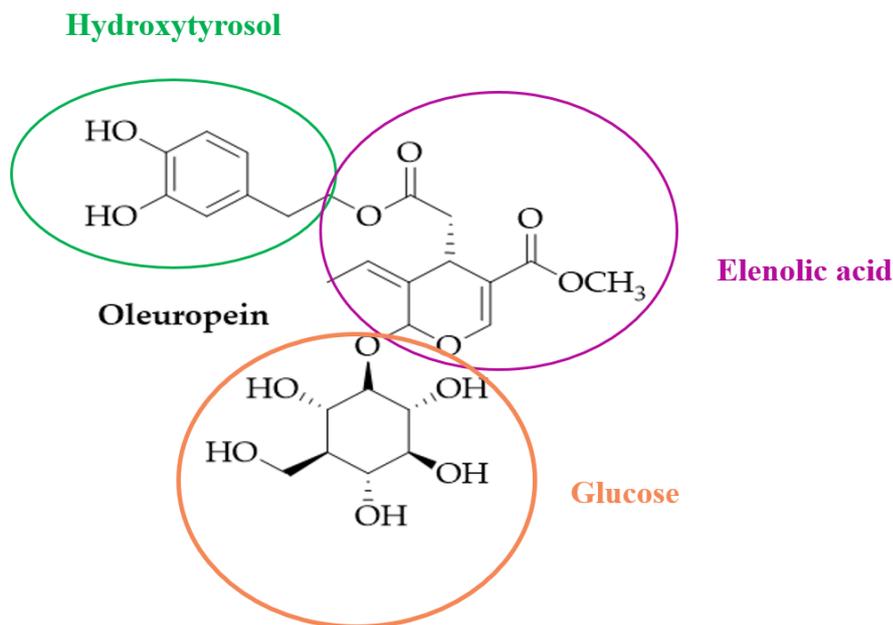
Il termine “Nutraceutica” è stato coniato da Stephen Felice nel 1989 e deriva dalla fusione delle parole “nutrizione” e “farmaceutica”, ad indicare tutti quei prodotti contenuti negli alimenti che esercitano degli effetti benefici sulla salute [96]. L'utilizzo di piante ed erbe per prevenire e curare malattie risale a civiltà antiche come Egiziani, Greci e Romani [97]. I prodotti nutraceutici comportano una serie di vantaggi rispetto ai farmaci: inducono raramente effetti collaterali rilevanti e sono facilmente acquistabili senza ricetta medica [98]. Essi possono essere utilizzati per migliorare la salute dell'organismo, ritardare il processo di invecchiamento, prevenire malattie croniche, aumentare l'aspettativa di vita e supportare la struttura e le funzioni del corpo [99]

Tra i prodotti nutraceutici ampiamente studiati negli ultimi anni ci sono quelli derivanti dall'olio extravergine di oliva (OEVO); OEVO è un componente tipico della dieta Mediterranea ed il suo consumo è stato correlato a numerosi effetti benefici sulla salute come riconosciuto dalla United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (UNESCO) nel 2010 [100,101]. OEVO rappresenta principalmente un

acido grasso monoinsaturo nella forma di acido oleico e contiene composti minori inclusi i polifenoli [102]. Nonostante inizialmente si pensasse che l'azione benefica di OEVO fosse attribuibile esclusivamente alla componente di acidi grassi mono e poli-insaturi come acido oleico e linoleico, ultimamente è stato rivalutato il contributo dei polifenoli, derivati dei secoiridoidi, lignani e flavonoidi [103–106].

Le foglie di olivo presentano un contenuto simile in polifenoli rispetto a OEVO ma in concentrazioni maggiori; questo rende gli estratti da foglia più efficaci di OEVO stesso nel promuovere effetti benefici sull'organismo [107]. Oltre ad essere contenuti in quantità maggiori, i polifenoli negli estratti da foglia, si trovano perlopiù in forma glicosilata [107]. Il fatto che i polifenoli siano in forma glicosilata è molto importante nel contesto tumorale; le cellule tumorali essendo avidi di glucosio, presentano sulla loro superficie un'elevata espressione di trasportatori del glucosio che le rende quindi più suscettibili all'azione di questi composti rispetto a cellule normali che esprimono i trasportatori del glucosio in concentrazioni minori.

L'Oleuropeina è il polifenolo maggiormente rappresentato negli estratti da foglia dove raggiunge concentrazioni di 60-90 mg/g [108]. La molecola di Oleuropeina è composta da 3 subunità: un polifenolo chiamato 4-(2-idrossietil)benzene-1,2-diolo, conosciuto anche come idrossitirosolo, un secoiridoide chiamato acido elenolico e una molecola di glucosio [109].



Struttura chimica dell'Oleuropeina. Immagine ripresa da [110]

Durante il processo di produzione di OEVO, l'Oleuropeina glicata viene convertita in Oleuropeina aglicone grazie all'azione di β -glucosidasi endogene.

La quantità di Oleuropeina presente nelle foglie d'olivo dipende dal metodo di coltivazione, dall'area di produzione e dalla condizione del materiale di partenza da cui viene fatta l'estrazione (fresco,

congelato, essiccato o liofilizzato). Estratti commerciali di *Olea*, standardizzati per contenuto di Oleuropeina, sono stati utilizzati per ottenere integratori dotati di proprietà biologiche e biomediche [111].

L'Oleuropeina si trova in quantità minori anche in OEVO, il cui processo di produzione prevede la conversione della forma glicata nella forma aglicone grazie all'azione di β -glucosidasi endogene.

Negli ultimi anni entrambe le isoforme di Oleuropeina hanno guadagnato l'interesse di molti ricercatori grazie alle loro proprietà, tra cui quella antiossidante, anti-infiammatoria, cardio e neuro-protettiva e anti-tumorale.

- *Oleuropeina come antiossidante.* L'azione antiossidante dell'Ole si deve essenzialmente al suo gruppo orto-difenolico che "donando" uno ione idrogeno stabilizza le specie reattive dell'ossigeno, potenzialmente dannose. La molecola può esercitare direttamente il suo effetto antiossidante come dimostrano studi *in vitro* sull'inibizione dell'ossidazione delle LDL [112,113], dell'acido ipocloroso [114] e dell'ossido nitrico [115], o studi *in vivo* dove conigli alimentati con una dieta arricchita in Ole hanno mostrato alti livelli di antiossidanti nel siero tali da contrastare l'ossidazione delle LDL e una riduzione del colesterolo totale, libero ed esterificato, rispetto a conigli che non erano stati alimentati con la stessa dieta [116]. Da non tralasciare anche l'effetto antiossidante diretto che Ole esercita su tessuto cardiaco danneggiato a seguito di ischemia da occlusione di coronarie [117].

L'azione antiossidante dell'Ole può essere anche indiretta e può avvenire tramite la stimolazione di enzimi anti-ossidanti intracellulari a mezzo dell'attivazione della trascrizione *del nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) [118] o attraverso l'incremento dei livelli di agenti antiossidanti non enzimatici come glutatione, a-tocoferolo, β -carotene e acido ascorbico [119–121].

- *Oleuropeina come antinfiammatorio.* L'infiammazione è un processo che viene messo in atto in risposta ad un danno tissutale o ad una infezione e rappresenta lo scenario di molte malattie tra cui aterosclerosi, diabete mellito, sindrome metabolica, cancro, patologie croniche del rene e malattie neurodegenerative [122]. Paragonata ad altri polifenoli presenti nell'OEVO, l'Ole si è dimostrata particolarmente efficace nell'inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie [123,124], l'attività della lipossigenasi [125] e nel modulare alcuni parametri antiinfiammatori [126].

In particolare, l'Ole ha mostrato di: inibire la produzione di IL1 β da parte di cellule umane del sangue stimulate con LPS [127], ridurre l'espressione di alcuni markers infiammatori come iNOS, COX-2, NF-KB e JNK oltre che delle interleuchine infiammatorie IL-6 e IL-1 β , prodotti da macrofagi murini RAW 264.7 attivati con LPS [128] e promuovere il decremento di fattori pro-angiogenici come l'IL-8 prodotta da fibroblasti senescenti che mostrano caratteristiche simili ai fibroblasti associati ai tumori [129].

Anche studi *in vivo* hanno confermato gli effetti dell'Ole: in topi con colite ulcerosa indotta, il polifenolo si è dimostrato in grado di ridurre i livelli di COX-2, iNOS e MMP-9 [130], mentre in modelli murini con pleurite, la somministrazione di Ole ha portato alla diminuzione dei livelli di TNF- α e IL- β [131], così come in ratti affetti da stress post-traumatico [132] e con trauma della colonna spinale. Inoltre, in modelli di ratti con indebolimento osseo a seguito di ovariectomia e infiammazione, il polifenolo si è rivelato in grado di attenuare la produzione di fibrinogeno e di modulare l'ingrossamento della milza [133]. Larussa ed altri [134] hanno poi dimostrato una diminuzione dei livelli di COX-2 e IL-17 in biopsie di colon derivate da pazienti affetti da colite ulcerosa e trattate con Ole.

- *Oleuropeina come agente protettivo dalle patologie cardiovascolari.* Accanto alle proprietà antiossidante e anti-infiammatoria, Ole ha mostrato anche effetti antilipidemici, oltre ad un'azione anti-ipertensiva e ipoglicemizzante [135–137]. A seguito della somministrazione di un estratto arricchito in Ole per 6 settimane in un gruppo di volontari in stato pre-ipertensivo, Lockeyer e altri [138] hanno osservato una diminuzione della pressione sanguigna, del colesterolo totale e del colesterolo LDL, così come Susalit e altri [139] hanno osservato un effetto sulla diminuzione della pressione sistolica e diastolica dopo somministrazione di un estratto arricchito in Ole per 4 settimane, con effetti del tutto paragonabili a quelli ottenuti con una dose effettiva del farmaco Captopril in un gruppo di volontari con ipertensione al primo stadio.
- *Oleuropeina come agente anti-insulino-resistenza.* Il fenomeno dell'insulino-resistenza si associa a varie patologie, tra cui il diabete mellito di tipo due e la sindrome metabolica. Diversi studi hanno confermato che il polifenolo in questione è in grado di apportare benefici prevenendo la formazione di fibrille amiloidi nel diabete di tipo due [140] e ancora che il trattamento con Ole determina la riduzione dei livelli di glucosio e di colesterolo nel sangue migliorando la sensibilità all'insulina [119,141,142]. L'azione anti-diabetica di Ole è stata testata e confermata anche *in vivo* [143–146]. Una patologia strettamente correlata alla resistenza insulinica è la steatosi epatica non alcolica; in questo contesto il trattamento con Ole su cellule e modelli animali ha mostrato effetti benefici in termini di attività anti-lipidemica [147], protezione e prevenzione del danno epatico [148–150] e diminuzione dei meccanismi di lipogenesi implicati nell'insorgenza della malattia [148].
- *Oleuropeina come induttore di autofagia.* L'autofagia è un processo che prevede l'eliminazione di componenti cellulari danneggiate attraverso la degradazione lisosomiale. I principali marcatori di autofagia sono la beclina-1, LC3 e p62, i primi due coinvolti nella fase iniziale della formazione del fagoforo e il terzo implicato nel riconoscimento del materiale da espellere da parte dei lisosomi [151]. mTORC1 e AMPK sono due proteine che rivestono un ruolo chiave nel controllo dell'autofagia: mentre mTORC1 è un inibitore dell'autofagia, AMPK è un induttore di autofagia.

Alterazioni a carico dell'autofagia si ritrovano in malattie neurodegenerative, sindrome metabolica, diabete, patologie cardiovascolari, malattie gastrointestinali e cancro [152].

Miceli e altri [153] hanno dimostrato che in cellule di neuroblastoma SH-SY5Y, Ole è in grado di indurre autofagia attivando l'asse CaMKKb/AMPK/mTOR mediante un aumento nel citoplasma di ioni Ca⁺ provenienti dal reticolo endoplasmatico e questo effetto è stato confermato anche *in vivo* su modelli animali transgenici.

In modelli di topi transgenici per la malattia da deposito di aggregati abeta, la dieta arricchita con Ole si è mostrata in grado di ripristinare l'autofagia che risultava alterata nella malattia, attraverso l'inibizione dell'asse segnalatorio di mTOR come riscontrato in colture cellulari [154]. La sirtuina 1 NAD-dipendente è un altro enzima coinvolto nell'autofagia e agisce tramite deacetilazione di componenti chiave di questo processo. La funzione di SIRT1 è strettamente correlata a quella di PARP1, la cui attivazione risulta nell'accumulo di polimeri PAR a livello della corteccia cerebrale di topi transgenici TgCRND8; la dieta arricchita il Ole ancora una volta ha mostrato i suoi effetti benefici tramite un incremento dell'espressione di SIRT1 con conseguente riduzione di aggregati PAR [155].

Miceli e altri [153] hanno studiato il ruolo di Ole anche su modelli di cardiomiociti caratterizzati da disfunzione autofagica indotta da stress ossidativo e in particolar modo dall'aumentata espressione di mono ammine-ossidasi (MAO) che catalizzano la deaminazione ossidativa di catecolammine e serotonina nel cuore producendo aldeidi, acqua ossigenata e ammoniaca determinando una disfunzione autofagica: gli autori hanno concluso che il polifenolo in esame era in grado di ripristinare l'autofagia alterata dalle MAO promuovendo l'attivazione e la traslocazione nucleare di TFEB che modula la trascrizione di geni coinvolti nell'autofagia.

Anche in modelli murini affetti da steatosi epatica con alterazione autofagica, la dieta con Ole ha migliorato i livelli della malattia ripristinando l'autofagia agendo su AMPK/ULK1 [156].

L'autofagia nei tumori può avere un ruolo sia promuovente che sopprimente [152]; in alcuni casi entra in gioco come meccanismo di difesa dal trattamento chemioterapico [157], mentre in altri è un fenomeno che prelude alla morte cellulare.

In cellule di tumore della mammella triplo negativo l'inibizione dell'autofagia si associa all'aumento dell'invasività e della migrazione; il co-trattamento con Idrossitirosolo e Ole è risultato in grado di ristabilire i livelli di autofagia attenuando la malignità del tumore [158]. In cellule di tumore della prostata invece è stato osservato che Ole, associata alla terapia con doxorubicina, era in grado di potenziare l'azione del farmaco attraverso l'induzione di autofagia [159].

- *Oleuropeina come anti-amiloide*. Le malattie neurodegenerative più conosciute sono senza dubbio l'Alzheimer e il morbo di Parkinson e sono entrambe caratterizzate dal deposito di materiale polimerico fibrillare. Nell'Alzheimer gli aggregati fibrillari sono formati da peptidi ab che si

accumulano nei neuroni ipotalamici e corticali, mentre nel morbo di Parkinson la componente principale del materiale fibrillare è dato dall' α -sinucleina il cui accumulo porta alla degenerazione dei neuroni dopaminergici.

Ole ha dimostrato di poter ridurre la formazione di oligomeri di peptide abeta e α -sinucleina e di promuovere la disaggregazione delle fibrille su modelli cellulari testati con esperimenti condotti *in vitro* [160–164].

hIAPP è un peptide ormonale che viene secreto dal pancreas con l'insulina; la formazione di aggregati amiloidi di hIAPP a livello delle Isole di Langerhans è un tratto caratteristico del diabete mellito di tipo 2. Ole aglicone è risultata efficace nel promuovere la formazione di aggregati diversi non nocivi per la cellula rispetto agli aggregati di hIAPP [140].

Leri e altri [165] hanno poi correlato il trattamento con Ole alla distruzione delle fibrille di TTR che si ritrovano in forme di patologie da aggregazione amiloide sporadiche o familiari. Gli effetti benefici del trattamento con Ole sono stati confermati anche in forme di amiloidosi familiare date da aggregazione di una variante della β_2 microglobulina umana appartenente al complesso maggiore di istocompatibilità di tipo I (MHC I), dove il polifenolo è risultato efficace nel modificare l'assetto conformazionale di aggregati con conseguente diminuzione del danno cellulare [166].

- *Oleuropeina come agente antitumorale*. Molteplici studi condotti sia *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che Ole è in grado di esercitare un effetto antitumorale su molti tipi di tumore e agendo su meccanismi cellulari diversi.

La bassa incidenza di tumori al seno nei paesi mediterranei fa pensare che un alto consumo di OEVO offra protezione contro il tumore della mammella. Nel tumore della mammella l'attività anti-proliferativa e pro-apoptotica del polifenolo è stata riscontrata su varie linee cellulari [167]. Tramite inibizione della ciclina D1 in cellule MCF7, estratti da foglie di olivo hanno determinato blocco del ciclo cellulare [168]; sulle stesse cellule Han e altri [168] hanno osservato l'inibizione del ciclo cellulare indotto da Oleuropeina e Idrossitirosolo. Inoltre, altri studi sperimentali hanno mostrato che Ole può indurre apoptosi in cellule di tumore mammario agendo su NF-kB, un fattore trascrizionale strettamente coinvolto nel controllo di geni che guidano lo sviluppo e la crescita tumorali [169], attraverso l'inibizione della via di ERK 1/2 [170], tramite riduzione dell'attività fosfatase di PTP1B [171] e modulando l'espressione di miR-21 e miR-155 [172] e di miR-221 - 29a e -21[173]. Il ruolo anti cancro esercitato da Ole su cellule di tumore mammario è stato osservato anche su molecole direttamente coinvolte nell'invasione e nella diffusione metastatica, ovvero le metalloproteasi, MMP, di tipo 2 e 9 mediante l'incremento dell'attività degli inibitori delle MMP, i TIMP, di tipo 1,3 e 4 [174]. Menendez e altri [175] lavorando con cellule MCF7,

HER2- negative e SKBR3 BC, HER-2 positive, hanno scoperto un effetto maggiore di Ole su cellule HER 2 positive piuttosto che negative.

Per quanto riguarda il tumore del colon, il trattamento con Ole ha mostrato un significativa inibizione della proliferazione, l'arresto del ciclo e induzione di apoptosi in cellule HT29 e SW620 [176], mentre Cardeno e altri [177] hanno mostrato che Ole insieme all'Idrossitirosole era in grado di inibire in modo significativo HIF-1 α e promuovere l'espressione di p53 in cellule HT29. Studi condotti in modelli *in vivo* hanno poi rivelato che una dieta arricchita in Ole era in grado di prevenire l'insorgenza del cancro del colon indotto da azossimetano riducendo la displasia e il danno al DNA [178]; in modo simile Ole somministrata a topi esposti contemporaneamente a sodio destrano solfato e azossimetano portava a diminuzione di infiammazione e riduzione dello sviluppo di tumore del colon [179].

L'effetto antineoplastico del polifenolo verso il cancro del fegato è stato messo in luce da studi condotti su cellule HepG2 e Huh7 dove Ole ha causato un effetto inibitorio sulla proliferazione portando a riduzione dei livelli di AKT fosforilato e inducendo apoptosi a causa dell'aumento dei livelli intracellulari dei ROS [180].

Recentemente gli effetti di Ole sono stati valutati sul cancro del polmone; in particolare Wang e altri [181] hanno mostrato che in cellule H1299 il composto induceva apoptosi mitocondrio-mediata attraverso l'attivazione di p38.

In cellule di tumore della prostata, LNCap e DU145, Ole ha portato a riduzione della vitalità cellulare e induzione di morte necrotica andando a diminuire l'attività di AKT [182]. Più recentemente è stato riportato che Ole inibiva la motilità in cellule di prostata bloccando i canali al sodio [183].

In cellule di prostata MiaPaCa-2 Ole ha portato a riduzione della vitalità a dosi molto basse ma con una efficacia di molto superiore a quella del chemioterapico gemcitabina [184]; sempre nel tumore prostatico, Goldsmith e altri [185] hanno dimostrato che l'apoptosi indotta da Ole passava attraverso il coinvolgimento di c-Jun e c-Fos.

L'esposizione di cellule Tpc-1 e BCPAP di cancro della tiroide a Ole ha comportato una significativa inibizione della proliferazione riducendo i livelli di fosforilazione di ERK e AKT facendo diminuire i livelli di H₂O₂ [186].

In aggiunta, l'effetto pro-apoptotico di Ole è stato osservato in cellule HL60 di leucemia umana promielocitica [187], mentre in cellule di leucemia mieloide cronica K562 il trattamento con il polifenolo ha portato a differenziamento in senso monocitario [188].

L'arresto del ciclo cellulare e l'induzione di autofagia tramite inibizione di mTOR e attivazione di AMPK è stata riscontrata in cellule di neuroblastoma [189], inoltre Secme e altri [190] hanno riportato una ridotta attività proliferativa e un'aumentata apoptosi in cellule di neuroblastoma

SHSY5Y attraverso la riduzione dell'attività della ciclina D1, D2, D3, del complesso chinasi-ciclina-dipendente CDK-4 e dell'espressione genica di CDK6 e al contrario un aumento dell'espressione genica di p53 e dell'inibitore del complesso ciclina-chinasi oltre che una minor capacità cellulare di migrazione, invasione e di formare colonie dopo trattamento con Ole.

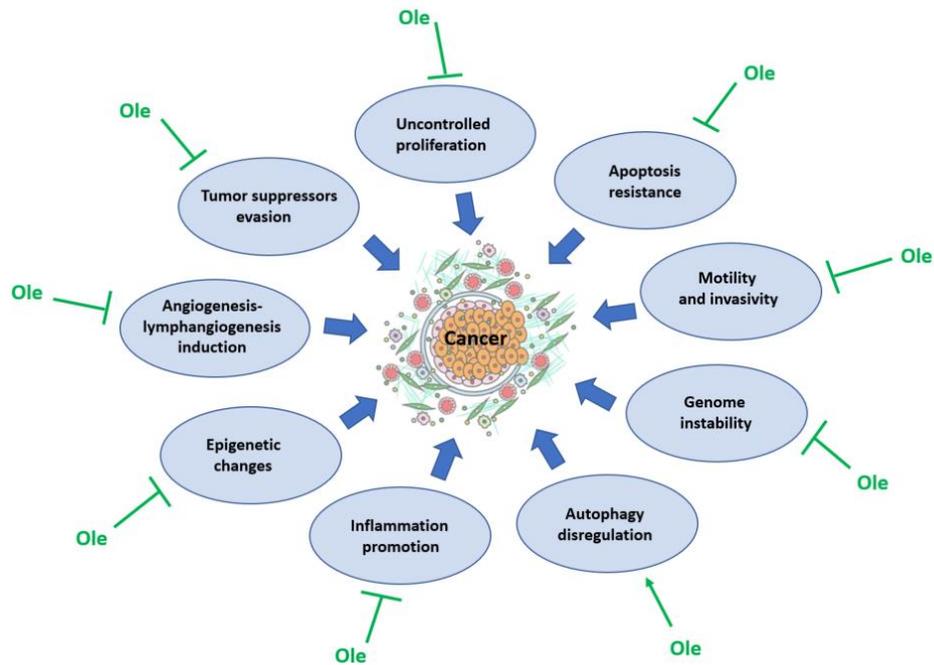
In cellule di mesotelioma l'azione di riduzione della proliferazione è stata associata all'alterazione dei canali del calcio di tipo T con conseguente aumento del calcio intracitoplasmatico [191].

Studi condotti da Tezcan [192] e altri hanno invece ribadito l'efficacia di Ole del modulare l'espressione dei miRNA, infatti hanno riscontrato in cellule staminali di glioblastoma multiforme una modulazione dei miRNA-137, -145 e -153.

Nel melanoma è stato riscontrato che l'utilizzo del polifenolo in esame era in grado di agire su una via molto importante per la progressione e lo sviluppo neoplastico, quella di JAKs/STATs, in particolare su STAT3 [193]; studi condotti su cellule di melanoma murino e su tessuto linfonodale metastatico hanno poi messo in luce l'inibizione da parte di Ole dei meccanismi di angiogenesi e linfo-angiogenesi a seguito dell'inibizione del recettore PPAR di tipo γ e dell'infiltrazione macrofagica, responsabili rispettivamente della produzione di VEGFA e di VEGFD [194].

Samara e altri [195] hanno condotto uno studio su 51 analoghi di Ole e l'analogo 24 si è dimostrato particolarmente efficace sia *in vitro* in cellule di tumore del colon, seno e della cervice sia *in vivo* su cellule di melanoma murino B16F10; l'analogo 24 ha indotto anche la promozione di cellule della risposta immunitaria.

Infine su varie linee cellulari, quali glioblastoma, adenocarcinoma renale, tumore del seno e adenocarcinoma colonrettale, la diminuzione della proliferazione, della motilità e dell'invasività sono stati causati dalla distruzione dei filamenti di actina indotto da Ole [196].



Azione antitumorale di Ole. Ole si è dimostrata in grado di esercitare un effetto antitumorale notevole, andando a colpire varie attività delle cellule tumorali. Immagine modificata da [110]

Le evidenze sulle proprietà antitumorali di Ole hanno spinto molti ricercatori a condurre studi volti a testare l'efficacia di un trattamento combinato basato sull'utilizzo di farmaci convenzionali associati al polifenolo in questione. Un trattamento di questo tipo sarebbe particolarmente vantaggioso perché potrebbe potenziare l'attività citotossica del farmaco e, a parità di effetto, permettere di ridurre le dosi, così come gli effetti collaterali.

Il co-trattamento Ole-doxorubicina in cellule di prostata si è rivelato più efficace del trattamento con il solo chemioterapico nell'indurre l'autofagia che nel cancro può precludere alla morte della cellula [159]. Sempre affiancata al trattamento con doxorubicina, Ole ha mostrato un'attività protettiva dall'azione cardi tossica del cuore [197].

Nel trattamento del glioblastoma con bevacizumab, un anticorpo monoclonale anti-VEGFA, la somministrazione di Ole ha migliorato l'effetto anti-angiogenetico e anti-migratorio indotto dal farmaco inibendo l'attività di VEGFA, MMP-2 MMP-9 [192].

In cellule di epatocarcinoma multicellulare HepG2, il polifenolo ha incrementato l'azione citotossica del cisplatino andando a ridurre l'espressione genica di MMP-7, implicata nell'attivazione di NGF, cruciale per la sopravvivenza e lo sviluppo del tumore [198].

Per poter esercitare i suoi effetti sull'uomo e su qualsiasi altro organismo, è necessario che Ole una volta assunta, raggiunga i suoi bersagli molecolari nei vari tessuti; i dati sul metabolismo di Ole da OEVO o da estratti di foglia sono pochi e contrastanti [199–201]. La ragione di ciò è che la biodisponibilità è influenzata da numerosi fattori, come il metodo di somministrazione, il genotipo, il genere, l'età, le interazioni con alimenti e dai diversi procedimenti di estrazione e di analisi [202]. Una volta ingerita, Ole riesce a resistere al basso pH dello stomaco e viene rapidamente assorbita (55-60%) nell'intestino raggiungendo la massima concentrazione plasmatica dopo 23-30 minuti, mentre i suoi metaboliti, idrossitirolo, glucuronidati e solfati, si ritrovano 64-93 min dopo l'ingestione e costituiscono il 96-99% dei metaboliti fenolici ritrovati in plasma e urina [203]. Il maggior limite degli studi *in vitro* è dato dalle concentrazioni di Ole usate che sono di gran lunga maggiori ($\mu\text{mol/L}$ - mmol/L) di quelle che si ritrovano nel plasma (nmol/L) [204]. Per ovviare a questo problema sono stati condotti vari studi tesi all'individuazione del miglior metodo per aumentare la biodisponibilità dei polifenoli; tali metodi permetterebbero ai polifenoli di conservarsi e di raggiungere più facilmente i loro bersagli e si basano ad esempio sull'esterificazione, lipofilizzazione e incapsulamento dei fenoli o sull'utilizzo di liposomi o nanoparticelle [205–208].

SCOPO DELLA RICERCA

Alla luce della necessità di escogitare nuovi approcci terapeutici contro i tumori, questa ricerca ha la finalità di valutare l'utilizzo di prodotti naturali in vari modelli tumorali sia *in vitro* che *in vivo*.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di testare un tipo di trattamento combinato in cui prodotti naturali, nella fatti specie prodotti derivanti dalla pianta di olivo, possano essere affiancati alla terapia chemioterapica standard in modo da potenziarne gli effetti senza causare effetti tossici nell'ospite.

Infatti, la maggior parte dei trattamenti combinati, attualmente in uso, si basa sull'impiego di due o più farmaci che a vantaggio di efficacia, comportano notevoli disagi per il paziente in termini di effetti collaterali. L'utilizzo di prodotti naturali non tossici potrebbe rappresentare una vera svolta nel trattamento antitumorale e potrebbe anche prospettare una diminuzione della quantità di farmaco utilizzato a parità di efficacia.

In particolare, in questo studio, ci siamo proposti di:

- Valutare gli effetti dell'Ole glicoside di sintesi su cellule di melanoma A375 verificando se il polifenolo sia in grado di per sé di inibire la vitalità cellulare. Il melanoma è un tumore della pelle molto aggressivo ed esiste la necessità di sviluppare nuovi approcci terapeutici per incrementare l'efficacia dei trattamenti farmacologici
- Valutare se Ole di sintesi sia in grado di potenziare l'effetto dei farmaci utilizzati per il trattamento del melanoma, Vemurafenib (PLX4032), Dacarbazina (DTIC), ed Everolimus (RAD001)
- Indagare se estratti naturali da foglie di olivo (OLEO) utilizzati in concentrazioni equi molari di Oleuropeina abbiano attività simile all'Ole di sintesi nel trattamento combinato su cellule di melanoma.
- Testare l'attività degli estratti sul metabolismo di cellule di melanoma, di tumore del seno, di tumore del colon e di leucemia.
- Testare l'efficacia del trattamento combinato OLEO+5-FU su cellule di tumore del colon per poi traslare la ricerca su modelli *in vivo* di tumore del colon (ratti Pirc) valutando anche l'attività antinfiammatoria di Ole sull'infiltrato macrofagico dei tumori del colon, essendo l'infiammazione una condizione favorevole allo sviluppo e alla progressione tumorale, soprattutto del tumore del colon
- Valutare gli effetti di Ole e di un altro polifenolo molto attivo, l'Oleocantale (OC), in associazione e no con Imatinib, in cellule di leucemia mieloide cronica K562. La leucemia mieloide cronica è una patologia caratterizzata dalla presenza della traslocazione 9,22 che comporta l'espressione costitutiva dell'oncoproteina Bcr-Abl, bersaglio del farmaco Imatinib. L'efficacia dell'Imatinib

diminuisce in seguito all'insorgenza di resistenza farmacologica e i composti naturali in studio potrebbero essere utili ad incrementare l'efficacia del farmaco.

MATERIALI E METODI

LINEE CELLULARI, CONDIZIONI DI COLTURA E TRATTAMENTI

In questo studio sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

- cellule umane di melanoma A375, acquistate dall'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD)
- cellule umane di melanoma A375 resistenti al Vemurafenib, gentilmente fornite dalla Dt.ssa Laura Polisenò (Università di Pisa) e ottenute come spiegato nella referenza [209]
- cellule umane di melanoma WM266-4, acquistate dall'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD)
- cellule umane di melanoma M21, gentilmente fornite dal dottor Antony Montgomery, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA
- cellule umane di melanoma A375M6 isolate nel nostro laboratorio da metastasi polmonari di topi SCID bg/bg dopo inoculo di cellule A375
- cellule umane di carcinoma colon rettale HCT116, gentilmente fornite dal Dr. Matteo Lulli (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università di Firenze)
- cellule umane di tumore del seno MDA-MB-231 acquistate dall'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD)
- cellule umane di leucemia mieloide cronica K562 gentilmente fornite dal Prof. Persio dello Sbarba (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università di Firenze)
- macrofagi murini RAW 264.7 gentilmente fornite dalla Prof.ssa Luigia Pazzagli (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università di Firenze)
- cellule mesenchimali staminali umane (MSC) isolate da aspirato midollare di donatori dal Prof. Saccardi (AOUC, Firenze)
- fibroblasti umani fetali di polmone MRC5, gentilmente fornite dalla Dt.ssa Francesca Margheri (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università di Firenze)

Le cellule A375, A375M6, WM266-4, M21, HCT116, MDAMB-231, MRC5 e RAW 264.7 sono state coltivate in terreno DMEM 4500 (*Dulbecco's Modified Essential Medium*, contenente 4500 mg/L di glucosio, EuroClone), integrato con siero fetale bovino (FBS, EuroClone) al 10%, scomplementato a 56°C per 30 minuti), glutammina 2mM all'1% (EuroClone) e sodio piruvato 1 mM (EuroClone).

Le cellule K562 sono state mantenute nel terreno RPMI (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) (EuroClone) integrato con siero fetale bovino (FBS, EuroClone) al 10%, scomplementato a 56°C per 30 minuti), glutammina 2mM (EuroClone) e sodio piruvato 1 mM (EuroClone) a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂

Le cellule MSC sono state coltivate in terreno DMEM 100 (*Dulbecco's Modified Essential Medium*), contenente 1000 mg/L di glucosio, EuroClone) integrato con siero fetale bovino (FBS, EuroClone) al 20%, scomplementato a 56°C per 30 minuti, glutammina 2mM (EuroClone) e sodio piruvato 1 mM (EuroClone) a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 10% di CO₂.

Tutte le cellule sono state rimosse da colture sub-confluenti utilizzando una soluzione di tripsina 0,05%-EDTA 1mM (EuroClone), tranne nel caso delle cellule RAW264.7 che sono state staccate meccanicamente mediante l'utilizzo di scraper.

Il conteggio delle cellule è stato eseguito in una camera conta globuli (Bürker).

In accordo con gli esperimenti, le cellule sono state trattate per tempi diversi con i farmaci Vemurafenib, PLX4032 (MedChem Express, Stoccolma, Svizzera), Dacarbazina, DTIC (Sigma Aldrich, Milano, Italia), Everolimus, RAD001 (MedChem Express, Stoccolma, Svizzera) Imatinib (MedChem Express, Stoccolma, Svizzera), in combinazione o meno con Oleuropeina glucoside (purezza $\geq 90\%$) (Extrasynthese S.A., Lyon, Nord-Genay, Francia), estratti da foglia di olivo e frazione di Oleocantale, preparati e caratterizzati nel laboratorio della Prof.ssa Annalisa Romani (Università di Firenze).

L'estratto da foglie di olivo utilizzato per i test *in vitro* su linee cellulari deriva da foglie di un oliveto situato a Vinci (Firenze). Le foglie sono state raccolte ad aprile 2018 e subito essiccate. L'estrazione della componente fenolica è stata condotta utilizzando il 15% di foglie di *Olea europaea L.* (45 g di foglie/300 g di acqua bidistillata) alla temperatura di 50°C per 60 min e mantenuta a temperatura ambiente tutta la notte (12h). La polvere di foglie di olivo è stata ottenuta attraverso il processo di liofilizzazione utilizzando il sistema LYOVAC GT 2 (Leybold GmbH, Cologne, Germany). L'identificazione della composizione fenolica della polvere di foglie di olivo e il retrotitolo della soluzione ottenuta dopo solubilizzazione della polvere in H₂O e utilizzata per gli esperimenti sono stati eseguiti tramite analisi HPLC-DAD. Tutti i solventi (HPLC grade) e l'acido formico (reagente ACS) sono stati acquistati da Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee, WI, USA). Gli standard molecolari quali, tirosolo, luteolina 7-O-glucoside, acido clorogenico e oleuropeina sono stati acquistati da Extrasynthese S.A. (Lyon, Nord-Genay, France). L'acqua HPLC-grade è stata ottenuta tramite doppia distillazione e purificazione mediante Labconco Water Pro PS polishing station (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA). L'estratto utilizzato in questo studio è stato testato dopo trattamento di 7 giorni in ratti femmina F344 alimentati con una dieta contenente 2.7 g di estratto per chilogrammo di dieta (corrispondente a 100 mg di estratto per chilogrammo di peso corporeo) senza indurre alcun cambiamento ponderale negli animali.

La mancata tossicità dell'estratto è in linea con quanto dimostrato da altri studi: Guex e altri [210] hanno dimostrato che un estratto da foglia d'olivo, testato su ratti ad una concentrazione maggiore di 2000 mg/kg non induceva tossicità. Ancora Sepporta e altri [178] hanno dimostrato la mancanza di effetti collaterali in topi dopo somministrazione di 125 mg di Ole/kg di peso corporeo. La dose standard di Ole utilizzata *in*

vivo su modelli animali che va da 10 a 125 mg/kg non induce effetti tossici valutati in termini di vitalità dell'animale [179] e di biomarkers del fegato come l'alanina e l'aspartato aminotransferasi [211].

La frazione arricchita in Oleocantale deriva dall'OEVO.

CRIOCONSERVAZIONE DELLE CELLULE

Le cellule sono state risospese alla concentrazione di $2-3 \times 10^6$ cellule/mL, in 90% di FCS e 10% di DMSO. Le sospensioni cellulari sono state distribuite in fiale sterili e mantenute a -80°C per 24h. Successivamente, le fiale contenenti le cellule sono state trasferite in appositi contenitori per la criopreservazione e sottoposte all'esposizione a vapori di azoto liquido (-150°C circa).

ACCERTAMENTO DELLA CONTAMINAZIONE DA MICOPLASMI

Per accertare la contaminazione da micoplasma le cellule utilizzate per questo studio sono state mantenute in assenza di antibiotici e la presenza di micoplasma è stata accertata periodicamente. L'analisi si basa sul legame tra la bis-benzamide (fluoro cromo H333258, Hoechst) e le basi adenina e timina del DNA. Il procedimento è stato eseguito su cellule adese su vetrini copri oggetto (Bio-Optica), fissate in acido acetico-metanolo (1:3, v/v) ed esposte per 30 minuti a temperatura ambiente ad una soluzione di bis-benzamide in PBS (0,25 $\mu\text{g/mL}$). I preparati, lavati in acqua distillata e montati su un vetrino portaoggetti (Bio-Optica) sono stati esaminati al microscopio. Tale procedura consentiva di individuare le cellule contaminate da micoplasma in base alla presenza di fluorescenza diffusa (puntiforme o a bastoncino) nel citoplasma.

SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE: TRYPAN BLUE

Le cellule sono state staccate con la tripsina, risospese nel loro terreno e poste poi in una provetta da cui sono stati prelevati 10 μL . A quest'aliquota sono stati aggiunti 10 μL di trypan blu allo 0,4% in NaCl 0,9%. Da questa combinazione 10 μL sono stati caricati nella camera conta-cellule di Burker ed è stata effettuata la conta al microscopio; le cellule blu, morte, sono state discriminate da cellule chiare luminescenti, vive.

SAGGIO DI VITALITÀ CELLULARE MTT

La vitalità cellulare è stata misurata utilizzando l'MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Aldrich, Milano, Italia). Le cellule sono state seminate in *multiwell* da 96 in terreno completo senza rosso fenolo; i vari trattamenti sono stati aggiunti al terreno a tempi e dosi diverse a seconda del tipo di esperimento. Dopo, l'MTT è stato aggiunto al terreno e la piastra è stata mantenuta nell'incubatore per circa due ore. Al termine dell'incubazione l'MTT è stato rimosso e i sali di formazano formati sono stati solubilizzati utilizzando dimetil solfossido (DMSO) (Sigma Aldrich, Milano, Italia). Nel caso di cellule in sospensione, K562, il DMSO è stato aggiunto direttamente al terreno

con l'MTT senza rimuoverlo. Dopo 15 min di incubazione a temperatura ambiente la piastra è stata letta a 595 nm con l'apposito lettore di piastre (Bio-Rad Via Cellini, Segrate (Milano), Italia)

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'ANALISI DI SPETTROMETRIA DI MASSA

Le cellule sono state lavate con PBS freddo contenente Na_4VO_3 1 mM, scapate in PBS, centrifugate 5 minuti a 1200 rpm e lisate utilizzando acqua fredda. Dopo le cellule sono state sonicate 3 volte per 5 minuti e il supernatante è stato raccolto per l'analisi di spettrometria di massa. I campioni sono stati analizzati utilizzando l'HPLC "*High Performance Liquid Chromatography*" accoppiata alla sorgente di Turbo Ion Spray a ioni negativi in accordo con quanto descritto precedentemente [212].

VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI CELLULARE TRAMITE SAGGIO DI INCORPORAZIONE ANNESSINA V/PI

Le cellule sono state lavate con l'"*Annexin binding buffer*", e risospese in 100 μl di *Annexin binding buffer* con l'aggiunta di 5 μl di Annessina V APC o FITC-coniugata (ImmunoTools, Friesoythe, Germania) e di 1 μl di soluzione ioduro di propidio (PI)/ *Annexin binding buffer* alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/ml}$, per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. Dopo sono stati aggiunti 400 μl di *Annexin binding buffer* per campione e le cellule sono state analizzate al citofluorimetro (BD-FACS Canto BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) in modo da quantificare le cellule vive (annessina V e PI negative) in Q3, le cellule in apoptosi iniziale (annessina V positive e PI negative) in Q4, le cellule in apoptosi tardiva (annessina V e PI positive) in Q2 e le cellule in necrosi (annessina negative V e PI positive) in Q1. Per ogni campione sono stati analizzati 10000 eventi.

ANALISI DEL CICLO CELLULARE

La distribuzione del ciclo cellulare è stata analizzata in base al contenuto di DNA rilevato tramite marcatura con PI. Le cellule sono state centrifugate e incubate in una soluzione contenente 0.1% di trisodio citrato e 0.1% di NP40 (o triton x-100) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) con l'aggiunta di PI 50 $\mu\text{g/mL}$ a 4°C al buio per 30 minuti. Le cellule marcate sono state poi analizzate al citofluorimetro (BD-FACS Canto, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)

ESTRAZIONE DELL'RNA e PCR QUANTITATIVA (qPCR)

L'RNA totale dei diversi tipi cellulari è stato estratto mediante l'uso del TRI Reagent® RNA Isolation Reagent (SIGMA). La determinazione del contenuto in RNA è stata effettuata con lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Il grado di purezza dell'RNA estratto è stato determinato in base al rapporto tra il valore di assorbimento a 260 nm (caratteristico degli acidi nucleici) e

quello a 280 nm (caratteristico delle proteine), con un valore ottimale compreso tra 1.8 e 2.0. L'integrità dell'RNA estratto veniva valutata mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2%. L'RNA è stato conservato ad una temperatura di -80°C fino al momento della retro-trascrizione.

Il cDNA è stato retro trascritto incubando 2 µg di RNA totale con 4 U/µL of trascrittasi inversa (Promega, San Luis Obispo, CA, USA) seguendo il protocollo indicato. La PCR quantitativa è stata eseguita usando GoTaq® Probe Systems (Promega). Ogni campione è stato analizzato in triplicato utilizzando Applied Biosystems 7500 Sequence Detector (BioRad, segrate, Milano, Italia) così settato: 40 cicli a 95° C per 15 secondi, 60°C per 60 secondi. I livelli di mRNA sono stati normalizzati in riferimento al 18S. I primer utilizzati sono i seguenti:

Gene	FW	RV
MCT1	5'-GTGGCTCAGCTCCGTATTGT-3'	5'-GAGCCGACCTAAAAGTGGTG-3'
MCT4	5'-CAGTTCGAGGTGCTCATGG-3'	5'-ATGTAGAGGTGGGTTCGCATC-3'
GLUT1	5'-CGGGCCAAGAGTGTGCTAAA-3'	5'-TGACGATACCGGAGCCAATG-3'
GLUT3	5'-CGAACTTCCTAGTCGGATTG-3'	5'-AGGAGGCACGACTTAGACAT-3'
LDHA	5'-AGCCCGATTCCGTTACCT-3'	5'-CACCAGCAACATTCATTCCA-3'
PKM2	5'-CAGAGGCTGCCATCTACCAC-3'	5'-CCAGACTTGGTGAGGACGAT-3'
PDK1	5'-CCAAGACCTCGTGTGAGACC-3'	5'-AATACAGCTTCAGGTCTCCTTGG-3'
HK2	5'-CAAAGTGACAlcGTGGGTGTGG-3'	5'-GCCAGGTCCTTCACTGTCTC-3'
18S	5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT-3'	5'-CGAACCTCCGA CTTTCGTTCT-3'
PDP2	5'-ACCACCTCCGTGTCTATTGG-3'	5'-CCAGCGAGATGTCAGAATCC-3'
CytC	5'-TTGCACTTACACCGTACTTAAGC-3'	5'-ACGTCCCCACTCTCTAAGTCCAA-3'
GLS1	5'-TGCTACCTGTCTCCATGGCTT-3'	5'-CTTAGATGGCACCTCCTTTGG-3'

ANALISI PROTEICA MEDIANTE WESTERN BLOT

Le cellule sono state lavate con PBS freddo contenente Na₄VO₃ 1 mM e lisate in un buffer di lisi (Merck Millipore, Vimodrone, Milano, Italia) contenente PMSF 100 µM (Sigma Aldrich, Milano, Italia), sodio ortovanadato (Sigma Aldrich, Milano, Italia) e cocktail di inibitore delle proteasi (Calbiochem). Il contenuto proteico è stato dosato tramite utilizzo del Bradford (Sigma Aldrich, Milano, Italia). I campioni sono stati preparati in modo da avere una soluzione contenente il 65% di estratto proteico, il 25% di Bolt™ LDS Sample Buffer 4x (Life Technologies, Monza, Italia) e il 10% di Bolt™ Sample Reducing Agent 10X (Life Technologies, Monza, Italia). La separazione delle proteine è stata eseguita utilizzando gel precast Bolt 4-12% Bis-Tris Plus (Life Technologies, Monza, Italia). Il trasferimento delle proteine è stato effettuato su membrane di PVDF (polyvinylidene difluoride) (Life Technologies, Monza, Italia) utilizzando il sistema iBlot2 (Life Technologies, Monza, Italia). Le membrane sono state poi incubate con rosso ponceau per accertarsi dell'avvenuto trasferimento e per verificare di aver caricato la stessa quantità di proteine per ogni campione e successivamente sono state bloccate per 1 ora a temperatura ambiente con l'Odyssey blocking buffer (Dasit Science, Cornaredo, Milano, Italia). Le membrane sono state poi incubate

tutta la notte a 4°C con gli anticorpi primari diluiti in una soluzione 1:1Odyssey blocking buffer/T-PBS buffer.

Gli anticorpi primari utilizzati sono: anticorpi di coniglio anti poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)1 e PARP1 clivato (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti-caspasi 3 clivata (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti pAKT (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti AKT (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti pERK (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti ERK (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) anticorpo di coniglio anti-PKM2 (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti-MCT-4 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo di coniglio anti-GLUT1 (1:1000, Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti-iNOS (1:1000, Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti-COX-2 (1:1000, Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA), anticorpo di coniglio anti Bcr-Abl (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anticorpo di coniglio anti HIF1 α (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) .

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario le membrane sono state lavate con T-PBS e incubate con gli anticorpi secondari di capra anti-coniglio IgG Alexa Flour 750 o anti-topo IgG Alexa Fluor 680 antibody (Invitrogen, Monza, Italy) per 1 ora a temperatura ambiente, dopo di che sono state nuovamente lavate con T-PBS e lette all'Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR® Bioscience Lincoln, NE, USA). Gli anticorpi primari di topo anti-Tubulina (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) e di coniglio anti-vinculina (1:1000, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) sono stati utilizzati per normalizzare i livelli di proteine.

SAGGIO DI FORMAZIONE DELLE COLONIE

Approssimativamente 100 cellule per ml, sopravvissute ai vari trattamenti, sono state selezionate mediante conta con trypan blue, seminate in terreno fresco e incubate per 10 giorni a 37°C. Le cellule sono state poi lavate con PBS, fissate con metanolo freddo e colorate mediante apposito kit Diff Quik kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Le colonie colorate sono state fotografate e contate.

ANALISI DEL METABOLISMO CELLULARE MEDIANTE SEAHORSE

L'acidificazione extracellulare (ECAR) e il consumo di ossigeno (OCR) sono stati determinati con lo strumento Seahorse XF96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA) utilizzando il Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) per misurare il metabolismo glicolitico delle cellule. Le cellule sono state trattate in accordo con gli esperimenti, poi sono state contate e seminate in apposite piastre da 96 dopo aver ricoperto i pozzetti con

poli-D-lisina (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le cellule sono state risospese nel XF Assay Medium (Agilent Technologies) con l'aggiunta di glutammina 1 mM (EuroClone, Paington, UK) e sono state lasciate aderire alla piastra per almeno 30 minuti a 37°C. La piastra con le cellule è stata lasciata ad equilibrare in un incubatore senza CO₂ prima di essere inserita nello strumento per l'analisi. La cartuccia pre-idratata è stata riempita con i farmaci previsti dal kit e calibrata dallo strumento prima dell'analisi sulle cellule. La normalizzazione dei dati ottenuti è stata fatta sulla base del contenuto proteico di ciascun pozzetto analizzato. Il Software in dotazione con lo strumento ha elaborato automaticamente i dati che sono stati poi esportati tramite Excel o Graphpad.

SAGGIO DI GRIESS PER IL DOSAGGIO DI NITRITI (NO₂⁻) NEI TERRENI DI COLTURA

La concentrazione di NO₂⁻ prodotta dalle cellule è stata misurata utilizzando il reattivo di Griess. I terreni di coltura delle cellule sono stati raccolti, centrifugati per eliminare eventuali cellule e trasferiti in una multiwell da 96 insieme al reattivo di Griess in proporzione 1:1. La piastra è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente e poi è stata letta a 540 nm (Bio-Rad Via Cellini, Segrate (Milano), Italia). Il trattamento con LPS o LPS/IFN γ è stato utilizzato come controllo positivo di produzione di NO₂⁻. I valori ottenuti sono stati normalizzati sul contenuto proteico e sono stati espressi in percentuale rispetto a LPS o LPS/IFN γ indicati come 100%.

MANTENIMENTO DEGLI ANIMALI E ANALISI EX-VIVO

Ratti Pirc (F344/NTac-Apcam1137) e *wild type* Fisher F344/NTac sono stati originariamente ottenuti da Rat Resource Research Center (Columbia, MO 65201, USA) NY, USA) e allevati nel CESAL (Università di Firenze, Italia) in accordo con la Commissione per la Sperimentazione Animale del Ministro della Salute Italiano. La colonia è stata mantenuta accoppiando ratti Pirc eterozigoti con individui *wild type* e i cuccioli sono stati genotipizzati a tre settimane di vita [213]. I cuccioli di ratto sono stati tenuti in gabbie in polietilene con le loro rispettive madri fino al raggiungimento di quattro settimane di vita, dopo di che sono stati separati e alimentati con dieta AIN-76 (ENVIGO) e utilizzati per il mantenimento della colonia fino a 11 mesi. All'età di nove mesi i ratti Pirc e *wild type* sono stati assegnati in modo random ad una dieta standard semisintetica AIN-76 (American Institute of Nutrition, 1976) o arricchita in Oleuropeina (2,7 g di estratto/1kg di dieta). Dopo una settimana, gli animali sono stati sacrificati tramite CO₂. Tutte le procedure svolte erano in accordo con le direttive Europee 2010/63/EU per gli esperimenti su animali.

Processamento del colon raccolta e determinazione dei tumori

L'intero intestino è stato sezionato, lavato con soluzione salina e aperto longitudinalmente. I ratti Pirc presentavano tumori macroscopici che sono stati contati e raccolti. Piccoli pezzetti (circa 25 mg) di lesioni tumorali e di mucosa apparentemente normale sono stati raccolti e immediatamente messi in RNAlater™ (RNA stabilization Reagent, Qiagen) e mantenuti a -80°C fino al momento dell'utilizzo. Gli adenomi sono

stati contati e il diametro è stato misurato. Dalla mucosa normale della porzione mediale del colon e dai tumori sono stati raccolti piccoli campioni di circa 9 mm², fissati in formalina e processati per l'analisi istologica della proliferazione, dell'apoptosi e dell'espressione di CD68 in sezioni longitudinali di 4 µm come descritto da Femia e altri [214]

Valutazione della proliferazione, dell'apoptosi e dell'espressione di CD68

L'attività proliferativa delle cellule prelevate dai tumori è stata valutata determinando l'immunoreattività di PCNA "*proliferating cell nuclear antigen*" utilizzando un anticorpo monoclonale di topo (PC-10, Santa Cruz, CA, USA) diluito 1:1000 come precedentemente descritto da Luceri e altri [215].

La valutazione dell'apoptosi cellulare è stata fatta su sezioni di colon incluse in paraffina e colorate con ematossilina-eosina. I preparati sono stati poi osservati al microscopio e sono state contate le cellule presentanti caratteristiche riconducibili all'apoptosi (restringimento della cellula, perdita dei contatti con le cellule vicine, condensazione della cromatina e formazione dei corpi apoptotici, come descritto da Luceri e altri [215]).

L'espressione del CD68 (AbD Serotec, Oxford, Regno unito), marcatore dei macrofagi, è stata determinata quantificando il numero di cellule positive alla marcatura come descritto da Femia e altri [216].

Isolamento di macrofagi peritoneali

I macrofagi sono stati raccolti a partire da essudato peritoneale degli animali. 20 ml di PBS freddo sono stati iniettati nella cavità peritoneale dei ratti e raccolti. Gli essudati peritoneali sono stati lavati e i macrofagi sono stati lasciati aderire su piastre in presenza di terreno DMEM4500 (EuroClone, Paington, UK) senza rosso fenolo contenente 250 µg/ml di albumina sierica bovina. Una volta aderiti, i macrofagi sono stati lavati e trattati per 48 ore con rIFN γ (50U/ml) and LPS (10 ng/ml) (Sigma Aldrich, Milano, Italia). La valutazione della produzione di NO₂⁻ è stata fatta mediante il reattivo di Griess ed espressa in µm di NO₂⁻ prodotto.

Espressione di iNOS mediante RT-PCR

L'RNA totale a partire dai campioni di tessuto è stato estratto utilizzando il TRI Reagent® RNA Isolation Reagent (SIGMA). Approssimativamente 500 ng di RNA di ciascun campione sono stati retrotrascritti utilizzando RevertAid RT Kit (Thermo Scientific) e il cDNA è stato amplificato per la valutazione dell'espressione di iNOS e della β -actina come controllo interno. La reazione è stata fatta in un volume totale di 25 µl contenenti 1X DreamTaq Green Buffer, 0.2 mM di dNTPs mix, 0.1 U di Taq polymerase (ThermoFisher Scientific), 0.4 µM di ciascun primers per iNOS e per la β -actina. La PCR è stata fatta settando lo strumento con questi parametri: 95°C per 5 min e dopo 35 cycles at 95°C per 30 s, 60°C per 30 s, 72°C per 55 s e 72°C for 10 min. I prodotti della PCR sono stati separati su gel d'agarosio all'1,8% e visualizzati tramite colorazione con SafeView (ABC). Gli ampliconi prodotti sono stati acquisiti mediante un transilluminatore e l'intensità delle bande è stata analizzata utilizzando il software Quantity-One (Bio-

Rad, Segrate, Milano, Italia). L'espressione di iNOS è stata normalizzata sui livelli corrispondenti di β -actina. I primers utilizzati sono:

Gene	FW	RV
iNOS	5'-TACTGCTGGTGGTTACAAG-3'	5'-GGTATGCCCCGAGTTCTTT-3'
β-actina	5'-TATGGAATCCTGTGGCATC-3'	5'-GTGTTGGCATAGAGGTCTT-3'

ANALISI STATISTICA

I dati sono espressi come media \pm l'errore standard della media (SEM) indicato da barre verticali su esperimenti rappresentativi di almeno tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica dei dati è stata fatta tramite i test di comparazione multipla ANOVA e Tukey e $p \leq 0.05$ è considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Il melanoma è un tumore della pelle particolarmente aggressivo e sebbene la maggior parte dei pazienti al momento della diagnosi presentino lesioni locali che possono essere rimosse chirurgicamente, la possibilità che si manifestino delle metastasi rimane alta [216]. Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi per quanto riguarda la terapia contro il melanoma, ma vista l'aggressività e l'aumento dell'incidenza di questo tumore, i ricercatori sono costantemente alla ricerca di nuovi stratagemmi terapeutici per ottimizzare l'eradicazione della malattia.

1. *Oleuropeina glucoside e melanoma*

1.1 *Effetti del trattamento con Oleuropeina (Ole) glucoside su cellule di melanoma*

Il primo approccio è stato la valutazione dell'effetto del trattamento con Ole glucoside per 72h sulla vitalità di tre linee di melanoma umano, A375, WM266-4 e M21. Alle dosi più alte di 500 e 800 μM , il trattamento con Ole è in grado di ridurre significativamente la vitalità in tutte e tre le linee cellulari, mentre utilizzata ad una concentrazione intermedia di 250 μM , Ole è in grado di ridurre significativamente la vitalità solo delle cellule WM266-4 e A375 ma non delle M21 (fig. 1a). Rispetto alle tre linee cellulari le A375 presentano una sensibilità a Ole intermedia e per questo motivo abbiamo deciso di utilizzarle per gli esperimenti successivi.

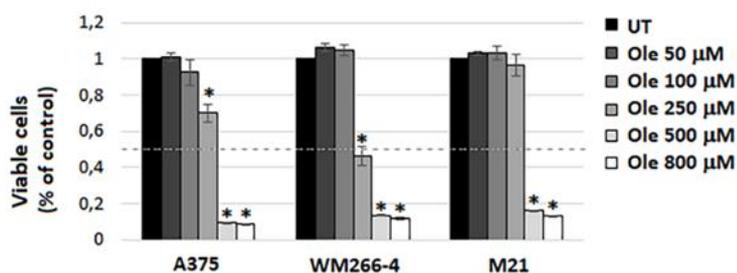


Figura 1. Effetti dell'Ole glucoside su cellule di melanoma umano A375, WM266-4 e M21. Immagine ripresa da [212]

Vitalità cellulare eseguita con saggio MTT dopo 72h di trattamento con Ole a varie dosi. La significatività è indicata con * ($p < 0.05$) e si riferisce al controllo non trattato.

L'Ole durante il processo di produzione di OEVO [217] e durante il processo digestivo a livello della mucosa intestinale, viene convertita nella forma aglicone a mezzo dell'azione enzimatica della β -glucosidasi; sempre durante la digestione, l'Ole aglicone viene metabolizzata a acido elenolico e idrossitirosolo (HT) a cui vengono attribuite gran parte delle proprietà biologiche di Ole [218]. Per capire se gli effetti riscontrati nelle cellule di melanoma fossero dovuti direttamente all'azione dell'Ole glucoside o se fossero da attribuire piuttosto alla forma aglicone o all'idrossitirosolo, abbiamo effettuato una spettrometria di massa a partire dal contenuto proteico di cellule A375 trattate per 15 minuti con Ole glucoside e abbiamo riscontrato la sua presenza all'interno delle cellule, mentre non sono state trovate tracce né di Ole non glicata, né di idrossitirosolo (fig. 2)

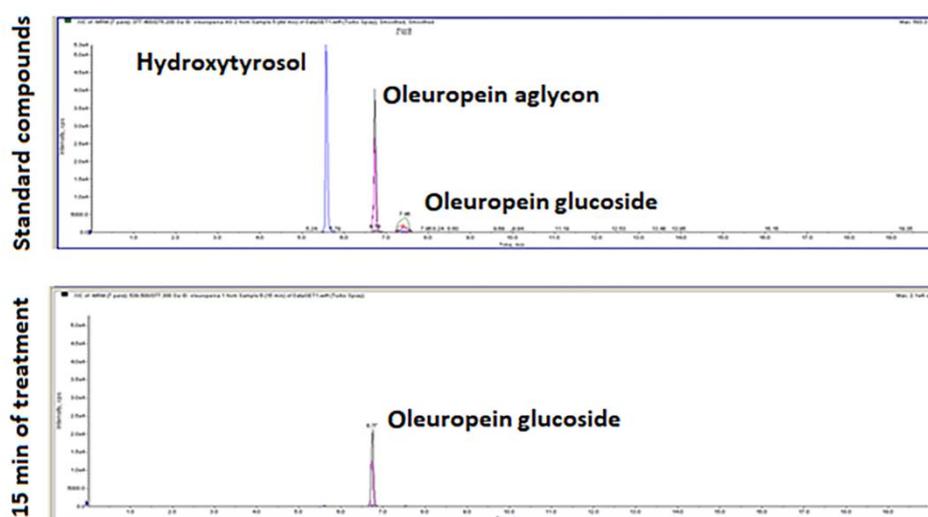


Figura 2. Valutazione della presenza intracellulare di Ole glucoside, Ole aglicone e idrossitirosolo in cellule A375. Immagine ripresa da [212]

Indagine di spettrometria di massa sulla presenza di Ole glucoside e dei suoi metaboliti, Ole aglicone e idrossitirosolo, all'interno di cellule A375 dopo 15 min di trattamento.

Per comprendere meglio il fenomeno della riduzione della vitalità associata al trattamento con Ole su cellule A375, abbiamo eseguito un test di vitalità MTT a tempi e dosi diversi e abbiamo riscontrato che già a 24h la dose maggiore di 800 μ M induce una riduzione significativa della vitalità così come la dose di 500 μ M a 48h. Il trattamento con la dose intermedia di 250 μ M induce una riduzione della vitalità significativa a 48 e 72h, ma meno marcata rispetto alle dosi maggiori di 500 e 800 μ M (fig. 3a).

Analizzando il livello di apoptosi mediante saggio citofluorimetrico di incorporazione di ioduro di propidio e annessina V-FITC abbiamo trovato che mentre alla dose di 250 μ M non si ha alcuna induzione di apoptosi né a 24 che a 48h, dopo trattamento di 48h con Ole 500 μ M si ha un incremento significativo della percentuale di cellule in apoptosi (fig. 3b). A conferma di questo risultato abbiamo valutato i livelli di

PARP1 clivata. PARP1 è una proteina appartenente alla famiglia delle poli ADP-ribosio polimerasi, coinvolte in diversi processi cellulari tra cui l'apoptosi; durante l'inscospicuo del processo apoptotico, PARP1 viene clivata grazie a degli enzimi chiamati caspasi e i livelli dei frammenti clivati possono essere utilizzati per valutare l'apoptosi cellulare. Come si vede dall'immagine (fig. 3c) l'apoptosi viene innescata dopo trattamento con Ole a 500 μM per 48h, data dall'incremento evidente dei livelli di PARP1 clivata. La dose di 250 μM di Ole non risulta invece tossica né a 24 né a 48h.

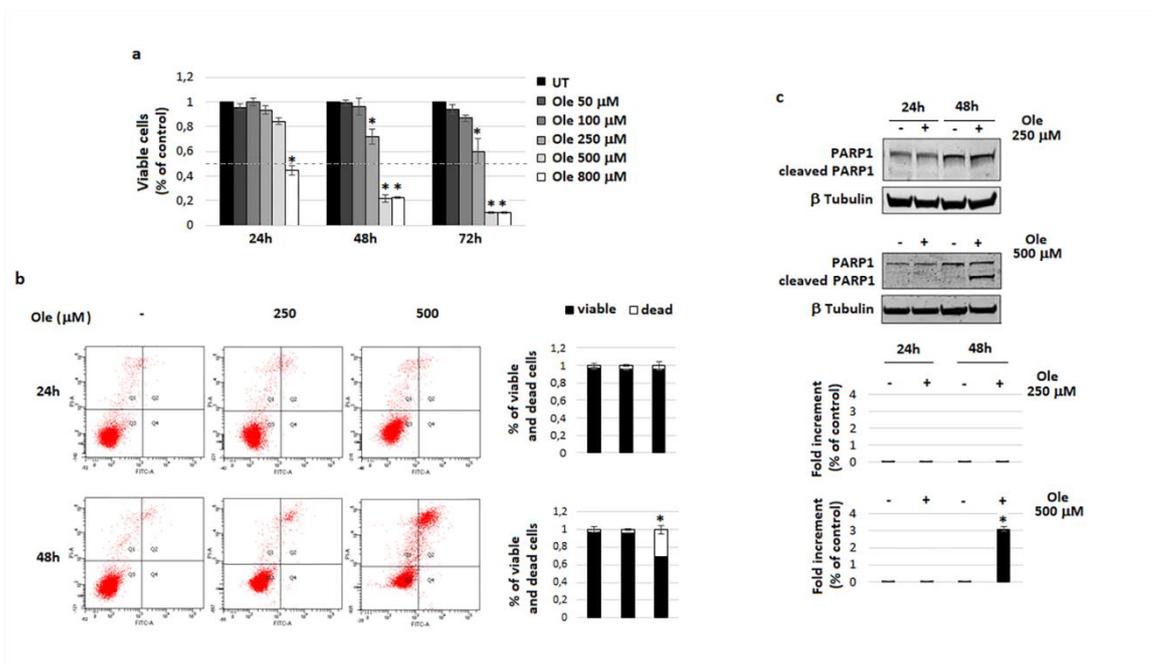


Figura 3. Effetti dell'Ole glucoside 250 e 500 μM su cellule di melanoma A375. Immagine ripresa da [212]

a) Vitalità cellulare valutata a tempi e dosi diverse tramite saggio MTT; **b)** analisi dell'apoptosi cellulare indotta dal trattamento con Ole alle concentrazioni di 250 e 500 μM per 24 e 48h valutata tramite analisi citofluorimetrica basata sull'incorporazione da parte delle cellule di Ioduro di propidio e annessina V - FITC. **c)** Western Blot di PARP1 e PARP1 clivata in cellule trattate per 24 e 48 ore con ole glucoside alle concentrazioni di 250 e 500 μM . I livelli di PARP1 clivata sono stati quantificati mediante analisi densitometrica della forma clivata sulla forma totale di PARP1 e normalizzati poi sui corrispondenti valori di tubulina β . * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato.

Una volta appurato che la dose di 250 μM non fosse tossica per le cellule, siamo andati ad investigare le cause della riduzione della vitalità cellulare dopo trattamento con Ole a quella dose e abbiamo riscontrato una diminuzione significativa dell'attività proliferativa dopo esposizione a Ole per 48 e 72h (fig. 4a). A 48h di trattamento si osserva anche una diminuzione indotta da Ole sull'attività di pAKT e pS6, mentre rimane inalterata quella di pERK (fig. 4b).

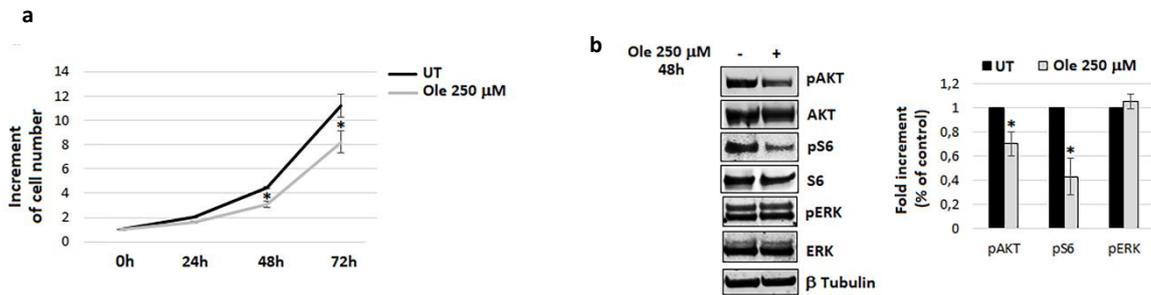


Figura 4. Effetti dell'Ole glucoside 250 μM su cellule di melanoma A375. Immagine ripresa da [212]
a) incremento del numero di cellule dopo trattamento con Ole 250 μM per 24, 48 e 72h **b)** Western Blot di pAKT, AKT, pS6, S6, pERK e ERK in cellule trattate con Ole alla dose di 250 μM per 48h; i livelli di pAKT, pERK e pS6 sono stati quantificati sulla forma di proteina totale, rispettivamente AKT, ERK e S6, normalizzati sui corrispondenti valori di tubulina β ed espressi come percentuale rispetto al controllo UT. * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato.

1.2 Effetti del co-trattamento Vemurafenib (PLX4032) + Ole glucoside su cellule di melanoma A375

Le cellule di melanoma A375 sono caratterizzate dalla presenza della mutazione V600E a carico dell'oncogene BRAF e per questo sono suscettibili alla terapia con Vemurafenib (PLX4032), un farmaco di nuova generazione che agisce selettivamente su BRAF^{V600E}. Abbiamo dunque voluto testare se il co-trattamento PLX4032 + Ole fosse più efficace del trattamento con il solo chemioterapico. I risultati ottenuti suggeriscono che Ole non è in grado di potenziare l'effetto di PLX4032 e questo si evince sia dall'analisi della vitalità cellulare eseguita tramite MTT (fig. 5a) sia tramite il saggio di formazione delle colonie in cui cellule vitali discriminate con conta a mezzo di Trypan blu a seguito del trattamento con PLX4032 ± Ole vengono seminate a bassa densità a dare colonie (fig. 5b).

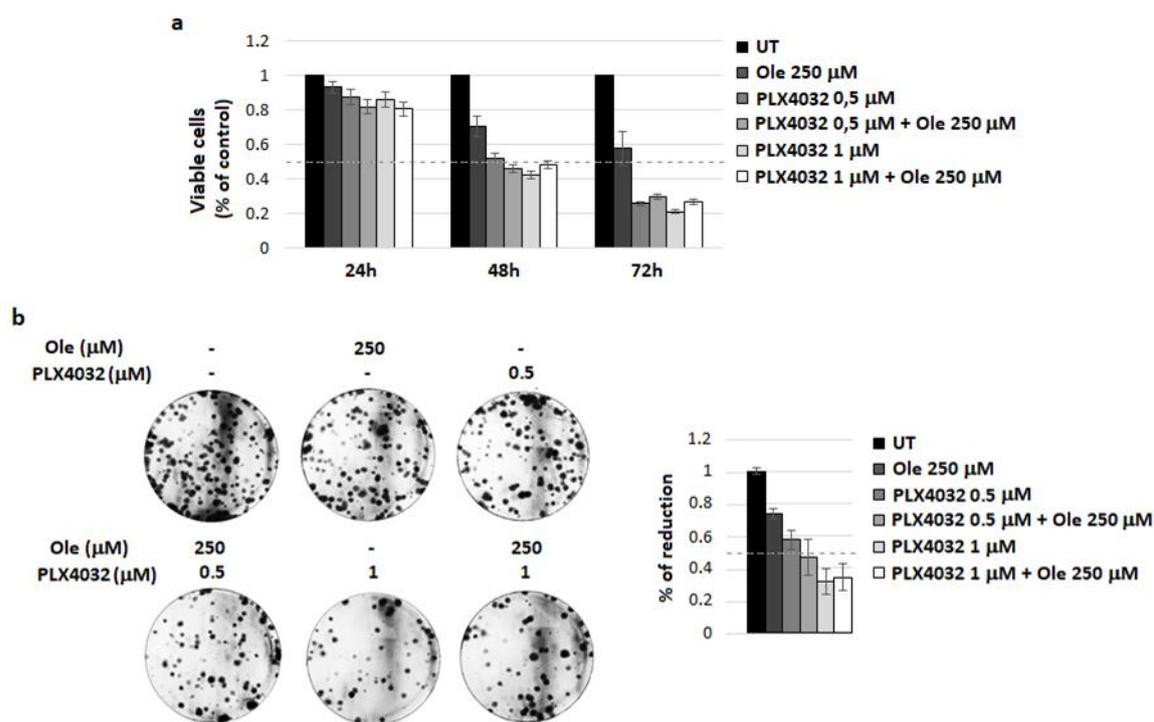


Figura 5. Effetti del co-trattamento Ole + Vemurafenib (PLX 4032) su cellule A375. Immagine ripresa da [212]

a) vitalità dose e tempo dipendente effettuata tramite MTT; **b)** saggio di formazione delle colonie da parte di cellule vitali selezionate mediante conte con trypan blue dopo trattamento di 72h con PLX4032 alle dosi di 0,5 e 1 μ M \pm Ole 250 μ M. [212]

1.3 Effetti del co-trattamento Dacarbazina (DTIC) + Ole glucoside su cellule di melanoma A375

Dal momento che l'associazione PLX 4032-Ole non si è dimostrata efficace nell'incrementare l'effetto del solo PLX4032, ci siamo spostati su un altro farmaco, la Dacarbazina (DTIC). DTIC è un farmaco chemioterapico antitumorale che appartiene alla classe degli agenti metilanti del DNA ed è utilizzato per il trattamento del melanoma in fase avanzata. L'utilizzo di DTIC (270 e 540 μ M) in associazione a Ole (250 μ M) ha mostrato un'efficacia maggiore rispetto al trattamento singolo con DTIC nel ridurre la vitalità cellulare valutata tramite MTT dopo 24,48 e 72h di trattamento (fig. 6a). Anche il saggio di formazione di colonie da parte di cellule sopravvissute ai trattamenti e selezionate mediante saggio di esclusione con trypan blue ha confermato il fatto che Ole è in grado di potenziare gli effetti di DTIC utilizzata sia alla dose di 270 che alla dose di 540 μ M; infatti, il numero di colonie osservato risulta minore quando DTIC viene data in associazione a Ole piuttosto che quando la DTIC viene somministrata singolarmente (fig. 6c).

Per avere ulteriore conferma di questo fenomeno abbiamo effettuato un'indagine di tipo molecolare prendendo in esame 2 marcatori di apoptosi cellulare, la PARP1 clivata e la caspasi 3 clivata, e in entrambi i casi abbiamo riscontrato un aumento nel trattamento combinato rispetto al trattamento singolo con DTIC (fig. 6c). L'indagine molecolare è proseguita con la valutazione di 2 delle vie cellulari maggiormente implicate nella sopravvivenza e nello sviluppo tumorale che sono la via di pAKT e la via di pERK; quello che è stato riscontrato è che sia DTIC che Ole agiscono sulla medesima via di segnalazione di pAKT, mentre non influenzano la via di pERK. L'effetto maggiore sulla modulazione della via di pAKT si ha nel co-trattamento DTIC + Ole (fig. 6c).

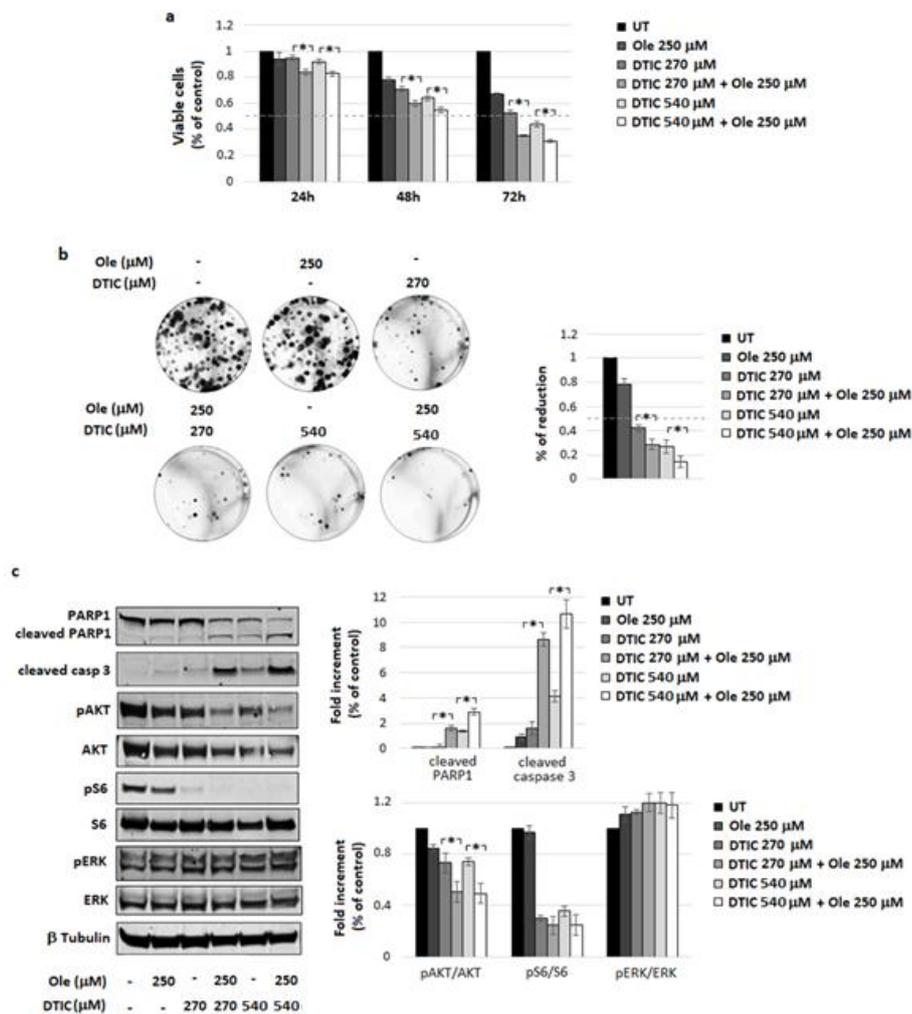


Figura 6. Effetti del co-trattamento Ole + Dacarbazine (DTIC) su cellule A375. Immagine ripresa da [212]

a) vitalità dose e tempo dipendente effettuata tramite MTT; **b)** saggio di formazione delle colonie da parte di cellule vitali selezionate mediante conte con trypan blue dopo trattamento di 72h con DTIC alle dosi di 270 e 540 μ M \pm Ole 250 μ M; a destra la riduzione del numero di colonie rispetto al controllo; **c)** Western

*Blot di PARP1, PARP 1 clivata, caspasi 3 clivata, pAKT, AKT, pS6, S6, pERK e ERK dopo trattamento con DTIC 270 e 540 μ M \pm Ole 250 μ M per 48h. I livelli di pAKT, pERK e pS6 sono stati quantificati sulla proteina totale, rispettivamente AKT, ERK e S6 e normalizzati poi sui corrispondenti valori di tubulina β e sono espressi come percentuale rispetto al controllo UT. * $p \leq 0.05$ si riferisce al co-trattamento DTIC + Ole rispetto al singolo trattamento con DTIC.*

1.4 Effetti del co-trattamento Everolimus (RAD001) + Ole glucoside su cellule di melanoma A375

In diversi tipi di cancro, incluso il melanoma, la via di segnalazione di pAKT è alla base di molti processi cellulari; questa stessa via può essere implicata nei fenomeni di resistenza ai farmaci; studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che nel melanoma pAKT guida la resistenza farmacologica al Vemurafenib in cellule esposte a bassi livelli di pH extracellulare [71]. Per questo motivo abbiamo deciso di testare l'effetto di Ole in associazione con un farmaco che agisce sulla via di pmTOR/AKT, Everolimus (RAD001). Come mostrato in figura 7, il co-trattamento RAD001 + Ole è molto più efficace del singolo trattamento con RAD001 e questo è ancor più evidente sia nel saggio di vitalità cellulare eseguito con MTT (fig. 7a) che nel saggio di formazione delle colonie (fig. 7b). L'indagine molecolare di PARP1 clivata e della caspasi 3 clivata ha confermato ulteriormente l'aumento della morte cellulare indotta dal doppio trattamento rispetto che dal singolo trattamento con RAD001 (fig. 7c) e l'analisi dei livelli di attivazione di pAKT, pS6 e pERK ha messo in luce che, come avevamo già osservato, per il co-trattamento DTIC+Ole, anche il co-trattamento RAD001+Ole coinvolge la via di pAKT mentre la via di pERK risulta ancora una volta inalterata (fig.7c).

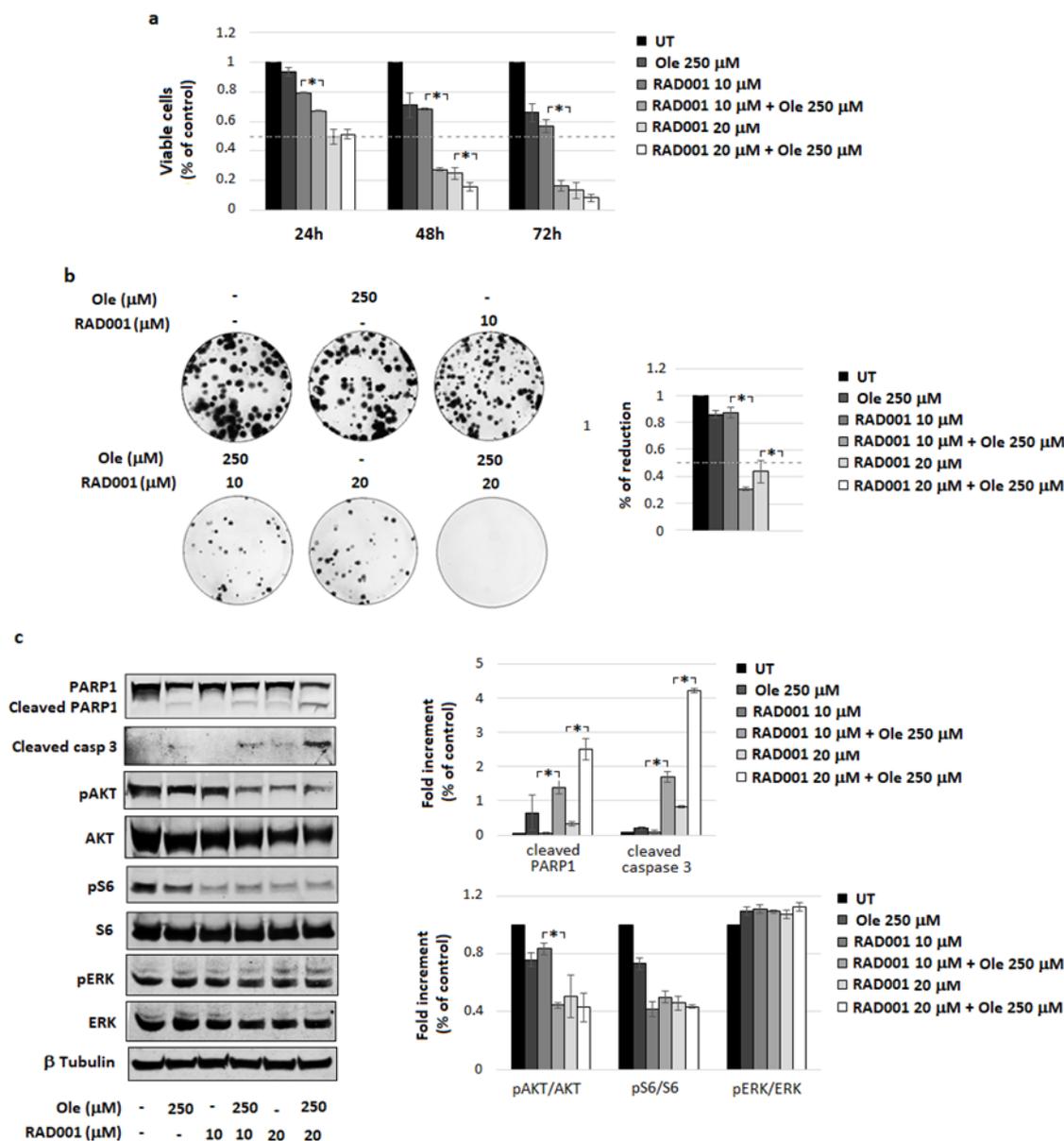


Figura 7. Effetti del co-trattamento Ole + Dacarbazine (DTIC) su cellule A375. Immagine ripresa da [212]

a) vitalità dose e tempo dipendente effettuata tramite MTT; **b)** saggio di formazione delle colonie da parte di cellule vitali selezionate mediante conte con trypan blue dopo trattamento di 72h con RAD001 alle dosi di 10 e 20 μM ± Ole 250 μM, a destra la riduzione del numero di colonie rispetto al controllo; **c)** Western Blot di PARP1, PARP 1 clivata, caspasi 3 clivata, pAKT, AKT, pS6, S6, pERK e ERK dopo trattamento con RAD001 10 e 20 μM ± Ole 250 μM per 48h. I livelli di pAKT, pERK e pS6 sono stati quantificati sulla proteina totale, rispettivamente AKT, ERK e S6 e normalizzati poi sui corrispondenti valori di tubulina β e sono espressi come percentuale rispetto al controllo UT. * $p \leq 0.05$ si riferisce al co-trattamento RAD001 + Ole rispetto al singolo trattamento con RAD001.

1.5 Effetti del co-trattamento Everolimus (RAD001) +Ole glucoside su cellule di melanoma A375 resistenti a PLX4032

Vista l'efficacia del co-trattamento RAD001+ Ole, abbiamo pensato di sperimentarlo su cellule resistenti a PLX4032. La resistenza a PLX4032 è stata indotta nei laboratori della Dottoressa Polisenso esponendo le cellule A375 al farmaco per lunghi periodi [209]. In queste cellule l'esposizione al farmaco non provoca arresto della crescita cellulare (fig. 8a) e non determina un aumento della fase G₀/G₁ del ciclo cellulare, al contrario di quanto avviene in cellule non resistenti dopo 72h di trattamento con PLX4032 (fig. 8b). Da un punto di vista molecolare abbiamo riscontrato che le cellule resistenti esprimono livelli più alti di pAKT/pS6 e invariati livelli di pERK, diversamente da cellule di controllo non resistenti che mostrano una riduzione dell'attività di pERK dopo 2h di esposizione a PLX4230 e di pS6 dopo trattamento di 24h (fig. 8c). Il co-trattamento RAD001-Ole si è rivelato più efficace del singolo trattamento con RAD001 nel ridurre la vitalità delle cellule A375 resistenti a PLX4230 a 24,48 e 72h di trattamento (fig. 8d).

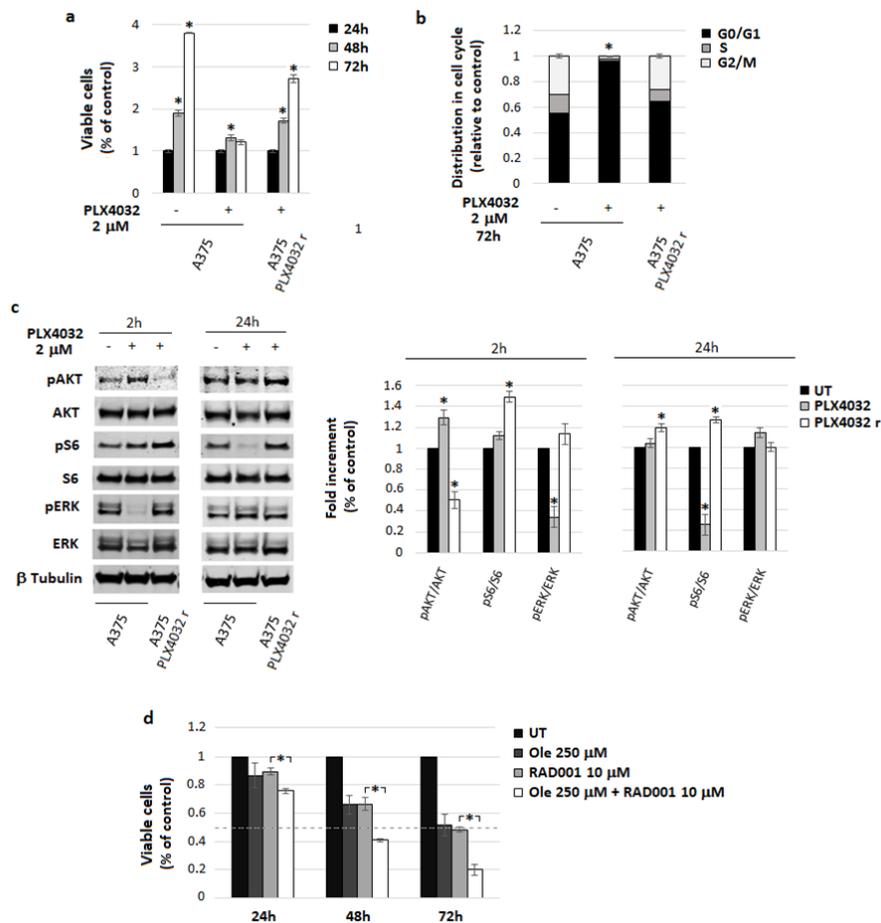


Figura 8. Caratterizzazione delle cellule A375 resistenti a PLX4032 ed effetto del co-trattamento RAD001-Ole su queste cellule. Immagine ripresa da [212].

*a) vitalità cellulare stabilita tramite MTT. * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato; b) distribuzione del ciclo cellulare analizzata tramite analisi citofluorimetrica, * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato; c) Western Blot di pAKT, AKT, pS6, S6, pERK e ERK in cellule trattate con PLX4032 alla dose di 2 μ M per 2 e 24h; i livelli di pAKT, pERK e pS6 sono stati quantificati sulla proteina totale, rispettivamente AKT, ERK e S6, normalizzati poi sui corrispondenti valori di tubulina β ed espressi come percentuale rispetto al controllo UT. * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato; d) vitalità cellulare stabilita tramite MTT; * $p \leq 0.05$ si riferisce al co-trattamento RAD001 + Ole rispetto al singolo trattamento con RAD001.*

2. Estratto da foglia di olivo arricchito in Oleuropeina (OLEO) e melanoma

I risultati incoraggianti ottenuti fino a questo punto ci hanno spinto ad indagare se un estratto da foglia di olivo arricchito in Ole (OLEO) fosse ugualmente efficace nel potenziare l'azione di DTIC e RAD001 rispetto a Ole glucoside di sintesi. L'estratto che abbiamo utilizzato presentava una concentrazione finale di 51.99% p/p (48.56% di secoiridoidi (Oleuropeina glucoside e Oleuropeina aglicone), 0.92% di idrossitirosolo, tirosolo e derivati, 1.93% di flavonoidi, 0.57% di verbascoside e derivati) come mostrato in tabella (tab 1)

	mg/g dry extract powder
Hydroxytyrosol	6.59
Tyrosol and derivatives	2.58
Verbascoside and derivatives	5.72
Flavonols	19.23
Oleuropein glucoside	410.27
Oleuropein aglycone	75.48
Total polyphenols	519.87

Tabella 1. Dati quali-quantitativi di estratto secco in polvere (mg/g) ottenuto da estratti da foglia di Olea. I dati rappresentano la media di 3 determinazioni (deviazione standard <3%). Tabella ripresa da [212].

La soluzione utilizzata per il trattamento delle cellule è stata ottenuta dalla solubilizzazione di 56 mg di polvere in 5ml di soluzione fisiologica.

	mM extract powder solution	% composition
Hydroxytyrosol	0,523	4.16%
Tyrosol and derivatives	0,345	2.74%
Verbascoside and derivvatives	0,057	0.45 %
Flavonols	0,353	2.81 %
Oleuropein glucoside	8,994	71.47%
Oleuropein	2,312	18.37%
Total polyphenols	12,584	100 %

Table 2. Dati quali-quantitativi della soluzione utilizzata per i test sulle cellule espressi in mg/g di estratto secco in polvere. Tabella ripresa da [212]

2.1 Effetti del trattamento combinato di DTIC, PLX4032, RAD001 + OLEO su cellule di melanoma A375

OLEO, utilizzato in quantità tale da avere una concentrazione equimolare di Ole rispetto all'Ole di sintesi testata precedentemente, si è rivelato ancora più efficace nel potenziare gli effetti della DTIC ma soprattutto di RAD001, mentre ancora una volta non è stato in grado di potenziare l'effetto di PLX4032 come mostrato in fig. 9a dalla valutazione della vitalità cellulare tramite MTT. Il saggio clonogenico conferma quanto evinto dall'MTT, cioè che l'estratto ha un alto potenziale di utilizzo in associazione con RAD0001 (fig. 9b)

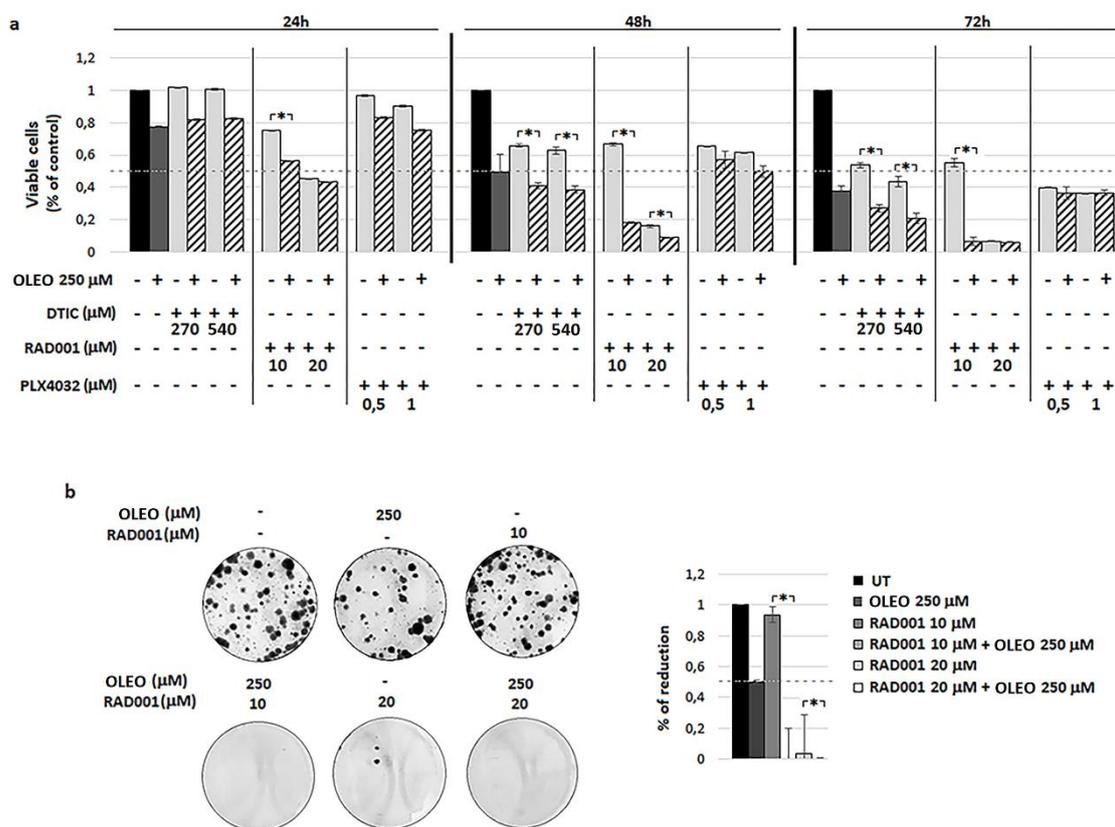


Figura 9. Effetto di un estratto di foglie di olivo arricchito in Ole da solo o in combinazione con DTIC, RAD001 e PLX4032. Immagine ripresa da [212]

a) Vitalità cellulare dose-tempo dipendente valutata tramite saggio MTT; * $p \leq 0.05$ si riferisce al co-trattamento Ole-RAD001/DTIC vs RAD001/DTIC da soli; **b)** saggio di formazione delle colonie da parte di cellule vitali selezionate mediante conte con trypan blue dopo trattamento di 72h con RAD001 alle dosi di 10 e 20 μ M \pm ex. Ole 250 μ M, a destra la riduzione del numero di colonie rispetto al controllo; * $p \leq 0.05$ si riferisce al co-trattamento Ole-RAD001 vs RAD001 da solo.

2.2 Caratterizzazione delle cellule di melanoma A375 trattate con OLEO

Visto e considerato che a parità di concentrazione, l'estratto da foglia (OLEO) è risultato più efficace dell'Oleuropeina glucoside di sintesi, abbiamo valutato la vitalità cellulare su cellule di melanoma A375 trattate con l'estratto per 24, 48 e 72h. Come riportato in fig. 10a, alle dosi di 400 e 800 μ M l'estratto risulta estremamente tossico già a 48h, mentre alla dose di 200 μ M si ha una riduzione di vitalità significativa pari a circa il 30% come osservato per il trattamento con Ole glucoside a 250 μ M per 72h; per questo motivo abbiamo deciso di utilizzare la dose di 200 μ M per gli esperimenti successivi, dose non tossica per cellule umane mesenchimali [219].

OLEO a 110 µg/ml equivalenti a 200 µM, induce una diminuzione non significativa della proliferazione cellulare non alterando il ciclo cellulare (fig. 10b e c), mentre è in grado di ridurre la motilità cellulare come valutato mediante saggio di chiusura della ferita (fig. 10d).

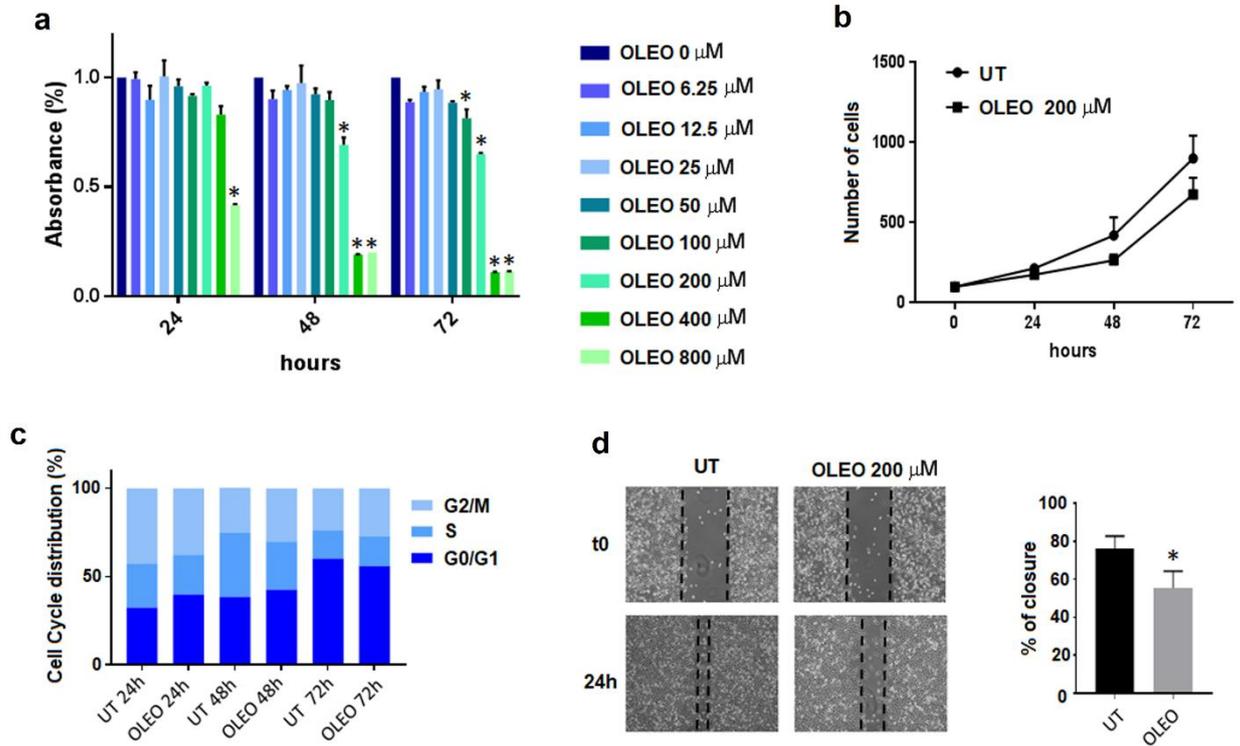


Figura 10. Effetto dell'estratto di foglie di olivo arricchito in Ole (OLEO) su cellule di melanoma A375. Immagine ripresa da [219].

a) Vitalità cellulare dose-tempo dipendente valutata tramite saggio MTT; * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato UT; **b)** proliferazione di cellule trattate con OLEO 200 µM. **c)** distribuzione del ciclo cellulare valutata tramite saggio di incorporazione di ioduro di propidio dopo trattamento con OLEO 200 µM e analizzata al FACS; **d)** valutazione della motilità cellulare tramite saggio di chiusura della ferita; * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato UT.

Al fine di comprendere le ragioni della diminuzione della vitalità cellulare associata alla motilità, abbiamo svolto un'indagine di tipo metabolico poiché motilità cellulare e glicolisi sono strettamente correlate [220]. Per avere una visione più dinamica del comportamento metabolico delle cellule trattate o meno con Ole o con OLEO abbiamo utilizzato uno strumento chiamato *Seahorse Bioanalyzer XF96*. Questo strumento permette un'analisi approfondita del metabolismo cellulare e a seconda del kit utilizzato in sede di analisi, è possibile studiare sia il metabolismo di base che quello in condizioni di stress cellulare ottenuto mediante

somministrazione di agenti specifici che colpiscono delle componenti chiave del metabolismo ossidativo o glicolitico.

In questo studio è stato indagato il metabolismo glicolitico di varie linee cellulari partendo da quelle di melanoma, in condizioni di stress del sistema utilizzando il *Glycolysis stress Test Kit*.

Questo kit permette di misurare il grado di acidificazione del microambiente (ECAR) a seguito dell'aggiunta di glucosio, oligomicina e 2-deossi-glucosio (2-DG).

Le cellule vengono incubate nel mezzo fornito dal kit che è privo di glucosio e piruvato (contiene solo 1mM di glutammina) e viene misurato la prima volta l'ECAR. Questa prima misura si riferisce all'acidificazione non glicolitica, cioè dovuta a processi cellulari diversi dalla glicolisi. Dopo la prima iniezione, quella di **glucosio**, l'ECAR viene nuovamente misurato. Le cellule che hanno ricevuto il glucosio lo captano e lo convertono in piruvato producendo ATP, NADH, acqua e protoni. L'estruzione di protoni porta ad un rapido incremento dell'ECAR. Questa risposta all'iniezione di glucosio è considerata come il tasso di glicolisi in condizioni basali.

La seconda iniezione è quella con l'**oligomicina**, un inibitore dell'ATP sintasi. L'oligomicina inibisce la produzione di ATP mitocondriale e sposta la produzione di energia sulla glicolisi, con conseguente ulteriore aumento dell'ECAR ad indicare la massima capacità glicolitica.

L'iniezione finale è quella con **2-DG**, un analogo del glucosio che inibisce la glicolisi attraverso il legame competitivo con l'esochinasi, il primo enzima della glicolisi. L'iniezione con il 2-DG porta ad una repentina diminuzione dell'ECAR a conferma del fatto che l'aumento dell'ECAR è veramente dovuta alla glicolisi.

La differenza tra glicolisi e capacità glicolitica costituisce la riserva glicolitica.

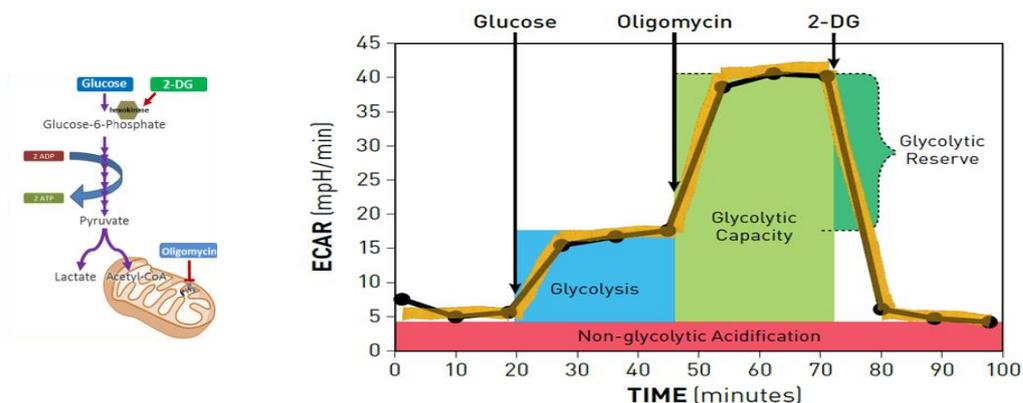


Figura 11. A sinistra un'illustrazione semplificata della glicolisi e dell'azione degli agenti utilizzati per l'analisi con il Seahorse: glucosio, 2-DG e oligomicina. A destra il profilo che si ottiene a seguito dell'analisi con Seahorse che permette di valutare glicolisi, capacità glicolitica, riserva glicolitica e acidificazione non glicolitica. Immagini riprese da Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit User Guide.

2.3 Effetti del trattamento con OLEO sul metabolismo glicolitico di cellule di melanoma

Tramite analisi al *Seahorse* con l'utilizzo del *Glycolysis stress Test Kit* siamo andati a valutare se il trattamento, prima con Ole glucoside di sintesi e poi con OLEO, alterasse l'assetto glicolitico di cellule di melanoma. Sia Ole che OLEO determinano una diminuzione a livello della glicolisi dopo 24h di trattamento in cellule primarie A375, ma non alterano i livelli della capacità glicolitica e della riserva glicolitica (fig. 12a e b). Inoltre, OLEO si è dimostrato efficace anche nell'inibire la glicolisi in cellule di melanoma metastatico A375M6, non intaccando i livelli di capacità glicolitica e riserva glicolitica.

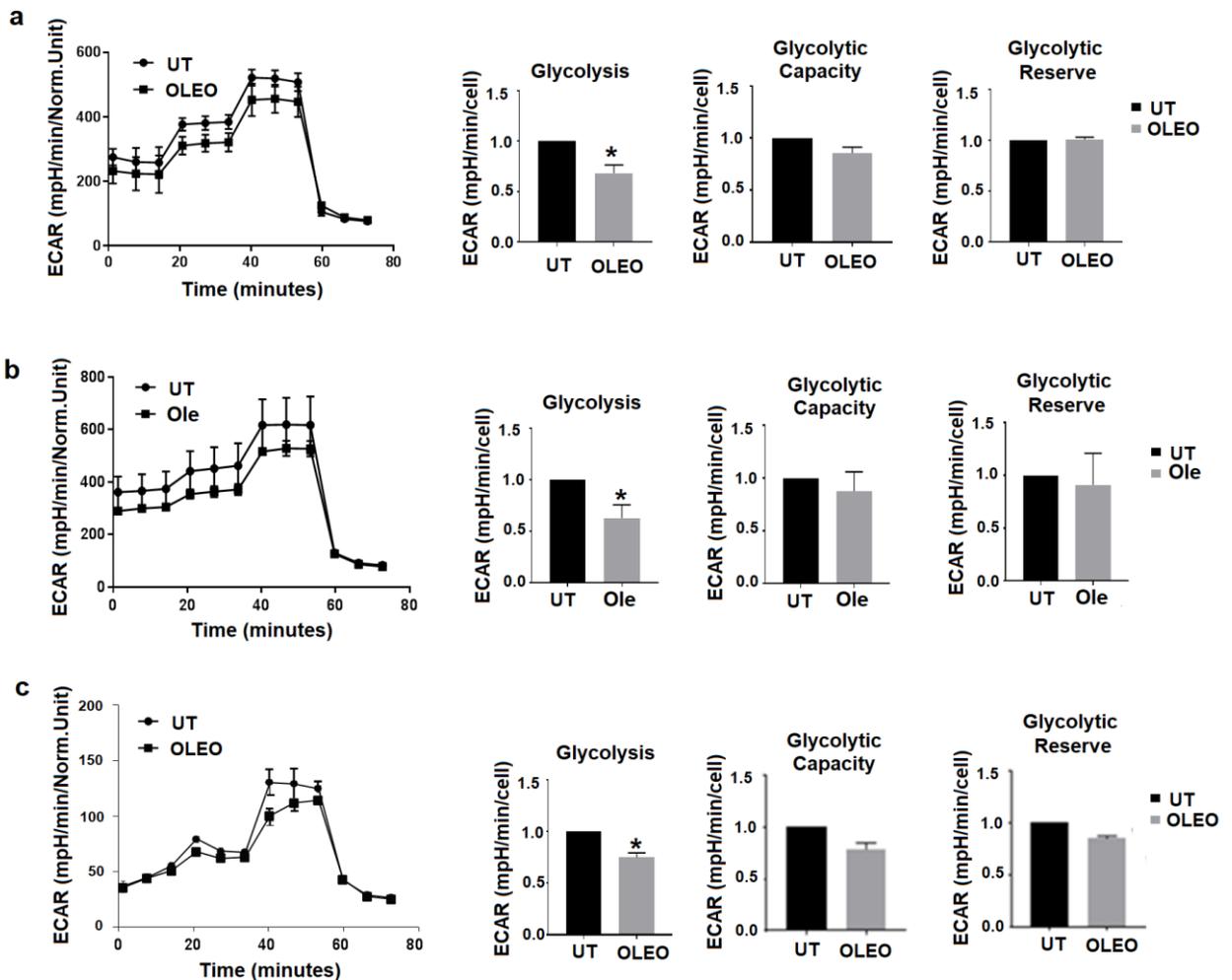


Figura 12. Effetti di Ole e OLEO sul metabolismo di cellule di melanoma. Immagine ripresa da [219] Risultati dell'analisi metabolica mediante Seahorse su cellule A375 trattate con OLEO (a) e Ole (b) 200 μ M somministrato per 24h e su cellule A375M6 trattate con OLEO 200 μ M per 24h (d). La rappresentazione grafica di glicolisi, capacità glicolitica e riserva glicolitica sono stati estratti dal software di analisi dei risultati del Seahorse. * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato UT.

Oltre all'analisi mediante *Seahorse* sono stati analizzati i principali marcatori coinvolti nel metabolismo glicolitico al fine di identificare quali potessero essere modulati dall'estratto. L'analisi dei livelli di mRNA, ottenuti tramite Real time-PCR ha evidenziato l'inibizione significativa di 3 enzimi chiave della glicolisi: MCT4, GLUT1 e PKM2 a seguito della somministrazione di 200 μ M OLEO per 24h (fig. 13a). MCT4 è responsabile dell'estrusione di lattato, prodotto dalla glicolisi, nel compartimento extracellulare; GLUT1 è il principale trasportatore di glucosio in cellule tumorali e PKM2 è un enzima tipicamente tumorale che promuove la glicolisi in modo sostenuto. L'Inibizione di questi tre enzimi è stata confermata dall'analisi delle proteine corrispondenti (fig. 13b).

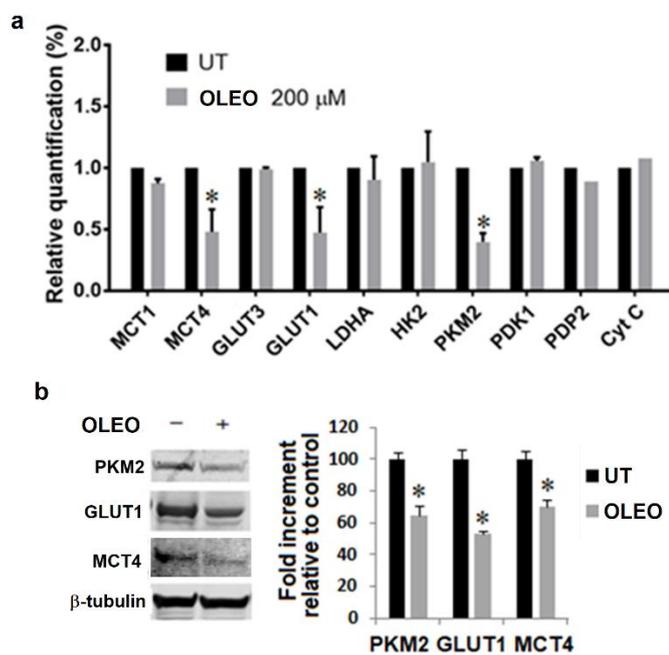


Figura 13. Effetti di OLEO su marcatori metabolici in cellule A375 dopo 24h di trattamento. Immagine ripresa da [219]

a) Valutazione tramite Real time-PCR dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo glicolitico; * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato UT; **b)** Western blot dei livelli di PKM2, GLUT1 e MCT4 quantificati mediante densitometria normalizzata sui livelli di β -tubulina; * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato UT.

2.4 Effetti del trattamento con OLEO sul metabolismo glicolitico di cellule di tumore del seno, del colon e su cellule di leucemia

Per avere ulteriore conferma dell'attività inibitoria dell'estratto sull'attività glicolitica sono state indagate anche cellule di tumore della mammella, MDA-MB, del colon, HCT116, e di leucemia mieloide cronica, K562.

Sebbene la capacità proliferativa di queste cellule risultasse inalterata (fig. 14a, c, e), l'analisi effettuata a mezzo del *Seahorse* ha confermato l'effetto anti-glicolitico di OLEO, efficace a 200 μM nel tumore della mammella così come nel tumore del colon e a 400 μM nelle cellule di leucemia (fig. 14b, d, f).

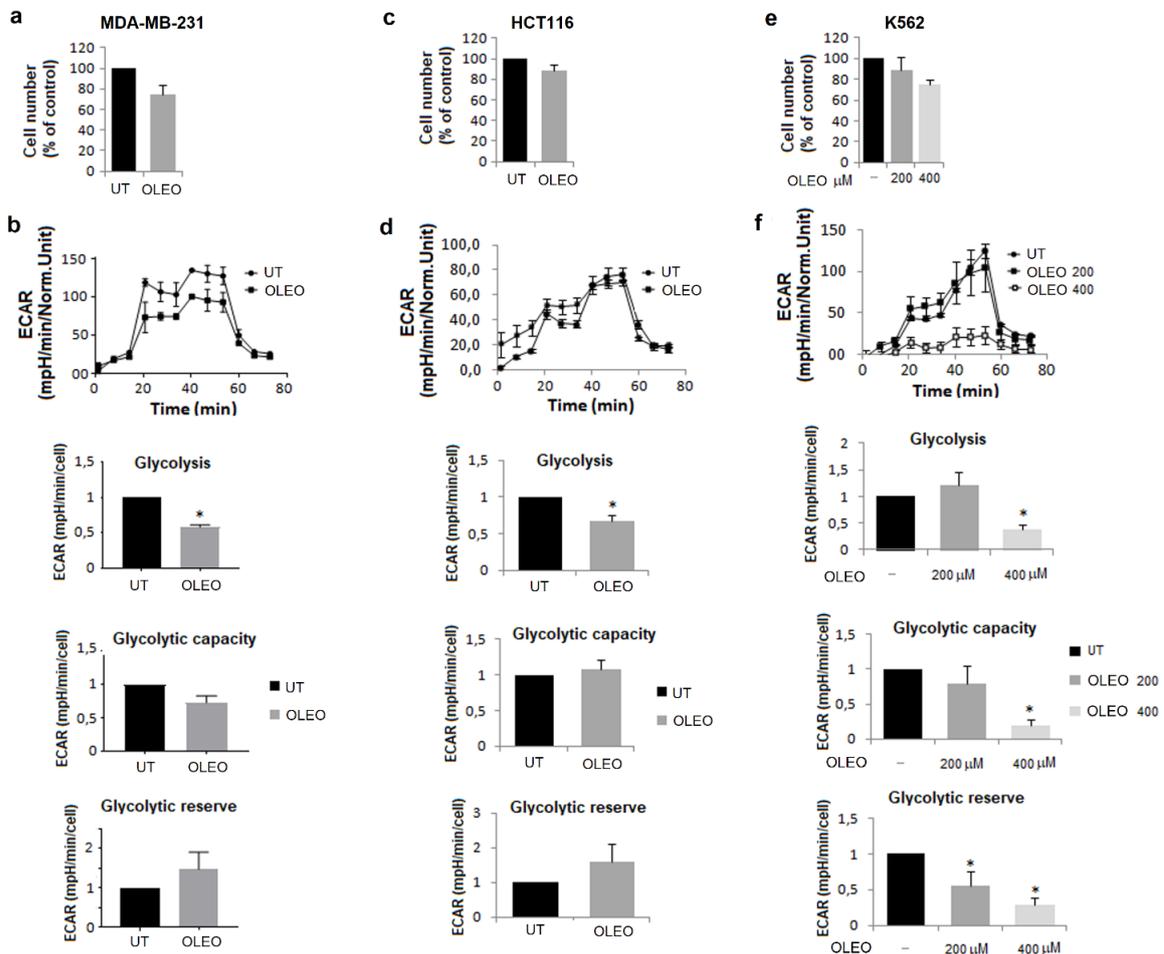


Figura 14. Effetti di OLEO sul metabolismo glicolitico di cellule di tumore della mammella, di colon e su cellule di leucemia mieloide cronica. Immagine ripresa da [219]

Valutazione della proliferazione cellulare dopo trattamento con OLEO 48h (a, c, e) e risultati dell'analisi metabolica mediante Seahorse (b, d, f) dopo trattamento di 48h con Ole alle concentrazioni di 200 μM e

400 μM . La rappresentazione grafica di glicolisi, capacità glicolitica e riserva glicolitica sono stati estratti dal software di analisi dei risultati del Seahorse. * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato UT.

3. Estratto da foglia di olivo arricchito in Oleuropeina (OLEO) e tumore del colon: valutazione in vitro e in vivo.

3.1 Valutazione degli effetti di OLEO in cellule di tumore del colon HCT116

Poiché il tumore al colon rappresenta il terzo tipo di tumore più diagnosticato nel mondo e la seconda causa di morte di morte per tumore in Europa, abbiamo testato l'estratto sulle stesse cellule utilizzate per gli studi del metabolismo, le HCT116.

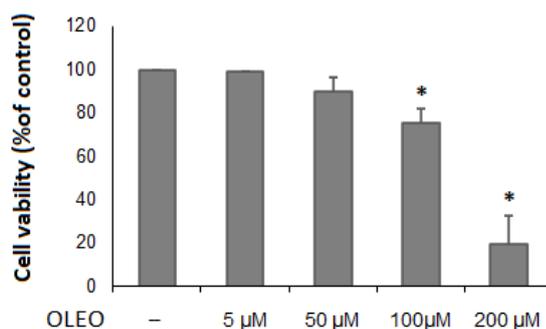


Figura 15. Effetto dell'estratto di foglie di olivo arricchito in Ole (OLEO) su cellule di tumore del colon HCT116.

Vitalità cellulare valutata tramite saggio MTT dopo 24h di trattamento con l'estratto a varie concentrazioni; * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato UT

L'effetto di riduzione più significativo della vitalità cellulare si è ottenuto con le concentrazioni di 100 e 200 μM di OLEO a 72h (fig. 15). Perciò lo studio dell'effetto combinato di OLEO con il chemioterapico, attualmente in uso, il 5-fluorouracile (5-FU) alla dose di 25 μM , si è effettuato partendo dalla concentrazione che determina la minore diminuzione della vitalità, cioè 12 μM fino a 50 μM , settandosi su 50 μM per l'esperimento del saggio clonogenico. Come riportato in fig. 16a il trattamento combinato 5-FU+OLEO ha un effetto migliore del singolo trattamento con il farmaco come confermato anche dal saggio di formazione delle colonie (fig. 16b).

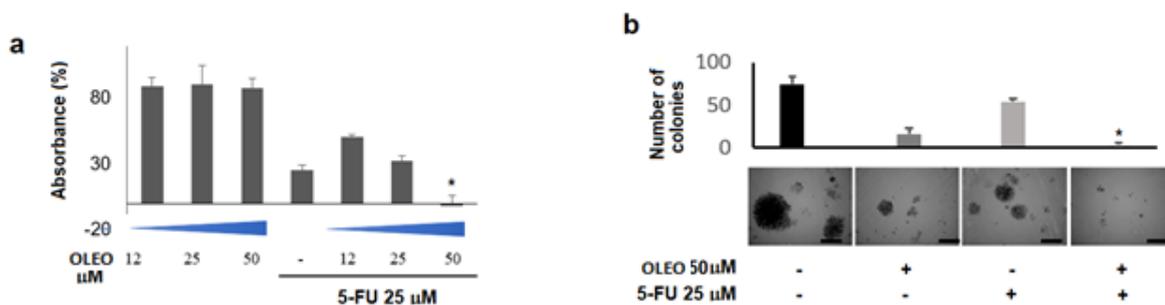


Figura 16. Effetti dell'Ole su cellule di tumore del colon HCT116.

a) vitalità cellulare valutata con saggio MTT dopo 72h di trattamento con OLEO a varie dosi e con 5-FU;
b) saggio di formazione delle colonie. * $p < 0.05$ si riferisce al trattamento combinato 5-FU+Ole rispetto al singolo trattamento con 5-FU.

3.2 Valutazione di una dieta arricchita in OLEO su ratti Pirc

Alla luce delle evidenze raccolte *in vitro* sugli effetti dell'Oleuropeina, è stato deciso di intraprendere uno studio *in vivo* utilizzando un modello animale di ratti Pirc (*Polyposis In the Rat Colon*). I Pirc sono un modello ampiamente utilizzati per lo studio della carcinogenesi intestinale da poliposi adenomatosa familiare, perché a differenza di altri modelli murini, come gli APC^{min}, che si discostano da quello che avviene nell'uomo in quanto sviluppano tumori soprattutto nel piccolo intestino ma non nel colon [221–223], i ratti PIRC presentano una mutazione su un allele del gene APC (F344/NTac-Apc^{am1137}) [224] che comporta lo sviluppo spontaneo di tumori non solo nel piccolo intestino ma anche nel colon, così come avviene nell'uomo.

Un gruppo di ratti Pirc (5 ratti) è stato quindi alimentato con una dieta arricchita in OLEO (100mg/kg pari a circa 300 mg al giorno) per sette giorni mentre un altro gruppo (6 ratti) è stato sottoposto a dieta standard. I ratti sono stati sacrificati e raccolti i vari campioni per le successive valutazioni.

Per prima cosa è stato indagato l'effetto diretto del polifenolo sulle cellule tumorali.

E' stata quindi valutata l'attività proliferativa delle cellule presenti nelle lesioni tumorali, tramite marcatura di PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) delle sezioni istologiche di tessuto tumorale, ed è stata osservata una riduzione significativa del numero di cellule tumorali in ratti Pirc alimentati con OLEO (fig. 17a); sempre su sezione istologiche è stata esaminata l'apoptosi cellulare mediante colorazione con ematossilina e eosina e individuazione delle caratteristiche cellulari di apoptosi; anche in questo caso la dieta con OLEO ha mostrato un effetto significativo nell'indurre l'apoptosi delle cellule tumorali (fig. 17b).

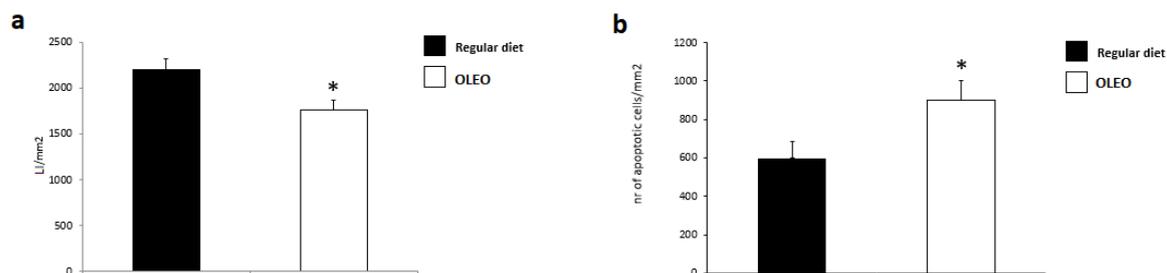


Figura 17. Valutazione degli effetti di Ole su cellule tumorali di ratti Pirc.

a) valutazione dell'attività proliferativa cellulare esaminata tramite marcatura di PCNA, espressa come indice di marcatura "labeling index" (LI)/mm²; **b)** valutazione dell'apoptosi cellulare dopo colorazione dei preparati istologici con ematossilina/eosina e osservazione al microscopio dei parametri cellulari di apoptosi: restringimento della cellula, perdita di contatto con le cellule adiacenti, condensazione della cromatina e presenza di corpi apoptotici. * $p < 0.05$ si riferisce ai ratti alimentati con dieta arricchita in Ole rispetto ai ratti alimentati con dieta standard.

In seguito, è stata esaminata l'infiltrazione macrofagica presente nelle lesioni tumorali, essendo l'infiammazione una componente fondamentale nel determinare lo sviluppo e la progressione neoplastica. Attraverso indagine di tipo immunohistochimico i macrofagi sono stati marcati per CD68 e confrontato il numero di macrofagi presenti nelle lesioni intestinali di ratti Pirc alimentati o meno con dieta arricchita in OLEO senza riscontrare differenza (fig 18a). Dalla valutazione dell'espressione di iNOS valutata in Real Time PCR nella mucosa di tessuto normale o tumorale dei ratti Pirc, è emerso che nei ratti Pirc alimentati con dieta arricchita in OLEO, l'aumento di iNOS, nella mucosa tumorale rispetto a quella sana era minore rispetto a quello presente in ratti PIRC con dieta standard (fig.18b).

Per arricchire ulteriormente la nostra indagine sull'importanza dell'infiltrazione macrofagica e quindi dell'infiammazione nella carcinogenesi, sono stati isolati i macrofagi peritoneali da ratti Pirc e quantificata la produzione di NO₂⁻ nei terreni di coltura. Dopo trattamento con IFN γ /LPS, i macrofagi derivanti da ratti Pirc trattati con dieta a base di OLEO mostravano un aumento di NO₂⁻ minore rispetto a ratti Pirc sottoposti a dieta standard (fig.18c).

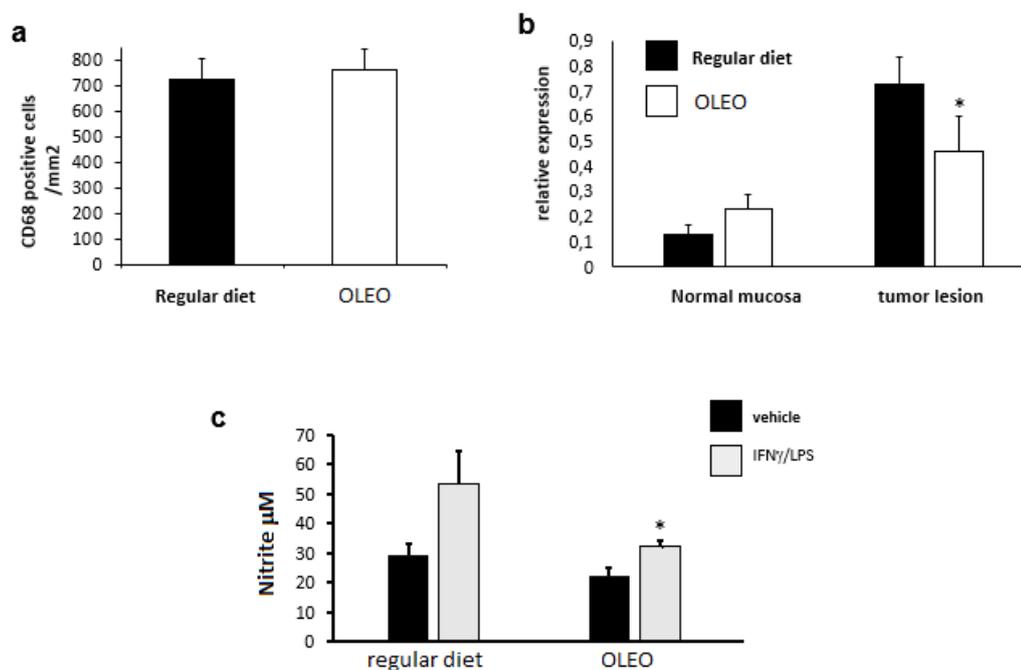


Figura 18. Effetti della dieta arricchita in Ole su macrofagi di ratti Pirc.

a) espressione di CD68 in tumori del colon di ratti Pirc alimentati o meno con dieta arricchita in Ole; **b)** espressione di iNOS nella mucosa normale o tumorale di ratti Pirc alimentati o meno con dieta arricchita in OLEO valutata tramite Real time PCR. * $p \leq 0.05$ si riferisce alla dieta a base di OLEO rispetto alla dieta normale; **c)** produzione di NO_2^- da parte di macrofagi isolati da ratti Pirc alimentati o meno con dieta arricchita in OLEO; il trattamento con $\text{IFN}\gamma/\text{LPS}$ viene utilizzato per stimolare la produzione di NO_2^- . * $p \leq 0.05$ si riferisce al gruppo Pirc OLEO rispetto Pirc regular diet.

3.3 Valutazione degli effetti di OLEO su macrofagi murini RAW264.7

L'effetto antinfiammatorio dell'estratto arricchito in Ole è stato testato anche *in vitro* su un modello di macrofagi murini, RAW264.7 stimolati con LPS per avere un controllo positivo di infiammazione. Il trattamento acuto con OLEO per 24h e, ancor di più, il trattamento cronico per 96h mostravano una significativa riduzione della produzione di NO_2^- (fig. 19a) confermata dai livelli di iNOS analizzati in Western Blot (fig. 19b). Per quanto riguarda un altro importante marcatore di infiammazione, COX-2, il solo trattamento cronico è stato in grado di diminuirne i livelli (fig. 19b). Il trattamento di 96h è stato ottenuto trattando per 72h le cellule somministrando OLEO tutti i giorni, cambiando terreno, e poi per ulteriori 24h in presenza o meno di LPS.

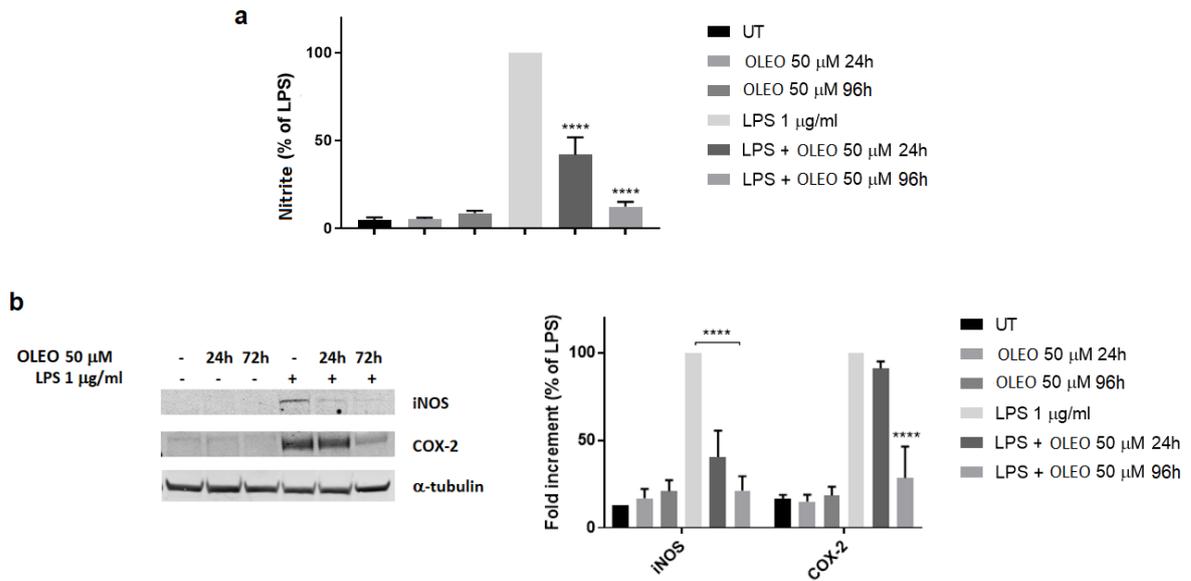


Figura 19. Effetti del trattamento con Ole in macrofagi murini RAW264.7

a) produzione di NO_2^- espressa in percentuale rispetto al controllo positivo dato da LPS. $*p < 0.0001$ si riferisce ai trattamenti con Ole rispetto al controllo positivo LPS; **b)** Western Blot dei livelli di iNOS e COX2 normalizzati sui livelli di α -tubulina corrispondenti; la densitometria sulla destra è espressa in percentuale rispetto al controllo positivo LPS; $*p < 0.0001$ si riferisce ai trattamenti con Ole rispetto al controllo positivo LPS.

Dopo l'analisi dell'azione di OLEO sulla componente infiammatoria, è stato

4. Estratto da foglia di olivo arricchito in Oleuropeina (OLEO) + Oleocantale (OC) e leucemia mieloide cronica.

Il più grande vantaggio di utilizzare dei composti naturali nella terapia antineoplastica è dato dal fatto che tali prodotti sono molto poco tossici per le cellule normali. Questo permette di poter azzardare delle combinazioni di più nutraceutici sfruttando le singole proprietà di ciascuno.

Si è valutato dunque di tentare l'utilizzo combinato di due prodotti naturali, uno con azione antiinfiammatoria, ma al tempo stesso anche antiossidante, l'Oleuropeina, ed uno ad azione prettamente antinfiammatoria, l'Oleocantale (OC). L'Oleocantale è un polifenolo presente solo nelle olive e nell'olio di oliva e che ha mostrato, come Ole, molteplici effetti biologici.

Di seguito riportiamo la caratterizzazione della frazione di Oleocantale ottenuta da miscele di olio di oliva che è stata utilizzata in associazione all'estratto arricchito con Ole da foglie di olivo (tabella 2)

Composto	mM
Idrossitirosolo	0,603
Tirosolo	0,451
10-idrossioleocanatale	12,089
Oleocantale	8,369
Oleuropeina aglicone	3,396
Ligstroside	0,865
Derivati Secoiridoidici	4,807
TOTALE	30,578

Tabella 3. Dati quali-quantitativi della soluzione utilizzata per i test sulle cellule espressi in mg/g di estratto secco in polvere

Su cellule di leucemia mieloide cronica, K562, abbiamo valutato la dose risposta a seguito di stimolazione singola con OLEO e OC per determinare la dose da utilizzare per gli esperimenti futuri. È stato dunque deciso di proseguire lo studio utilizzando una dose intermedia di OLEO (200 μM) pari a quella utilizzata per cellule di melanoma (fig. 20a), e una dose di 15 e 30 μM di OC, in linea con le dosi utilizzate in letteratura su altri tipi cellulari [225,226] (fig. 20b).

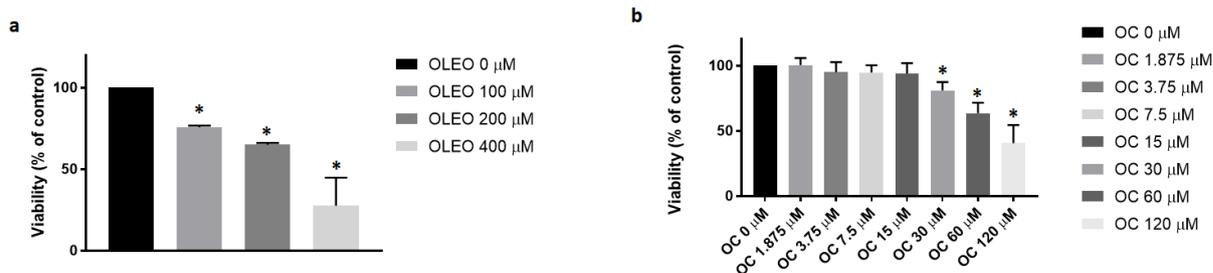


Figura 20. Valutazione della vitalità cellulare dopo trattamento di cellule K562 con OLEO e OC
 Vitalità cellulare valutata con saggio MTT dopo 72h di trattamento con varie dosi di OLEO e OC

Prima di proseguire con gli esperimenti sulle cellule di leucemia, è stato accertato che il co-trattamento OLEO/OC (alla dose massima che utilizzeremo, ovvero 30 μ M) non fosse tossico per cellule normali, utilizzando fibroblasti MRC5 (fig. 21).

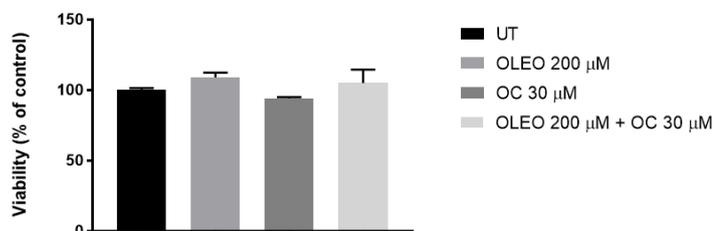


Figura 21. Valutazione degli effetti di OLEO \pm OC su fibroblasti MRC5.

Vitalità cellulare valutata con saggio MTT dopo 72h di trattamento

Successivamente è stato valutato l'effetto del trattamento singolo con 200 μ M OLEO in combinazione con 15 e 30 μ M OC sulle cellule K562, caratterizzate dalla presenza della traslocazione 9,22, che comporta l'espressione costitutiva dell'oncoproteina Bcr-Abl. L'analisi dei marcatori molecolari maggiormente coinvolti nella sopravvivenza e nella malignità delle cellule K562 ha mostrato che OC era più attivo di OLEO ed in grado di determinare un aumento dei livelli di Bcr-Abl, parallelamente ad una diminuzione di HIF1 α (fig. 22a). La valutazione dell'apoptosi ha evidenziato come OLEO e, in misura maggiore, OC, siano in grado di potenziare l'effetto citotossico di 0,5 e 1 μ M Imatinib (IMB) usato a dopo 72h di trattamento (fig. 22b)

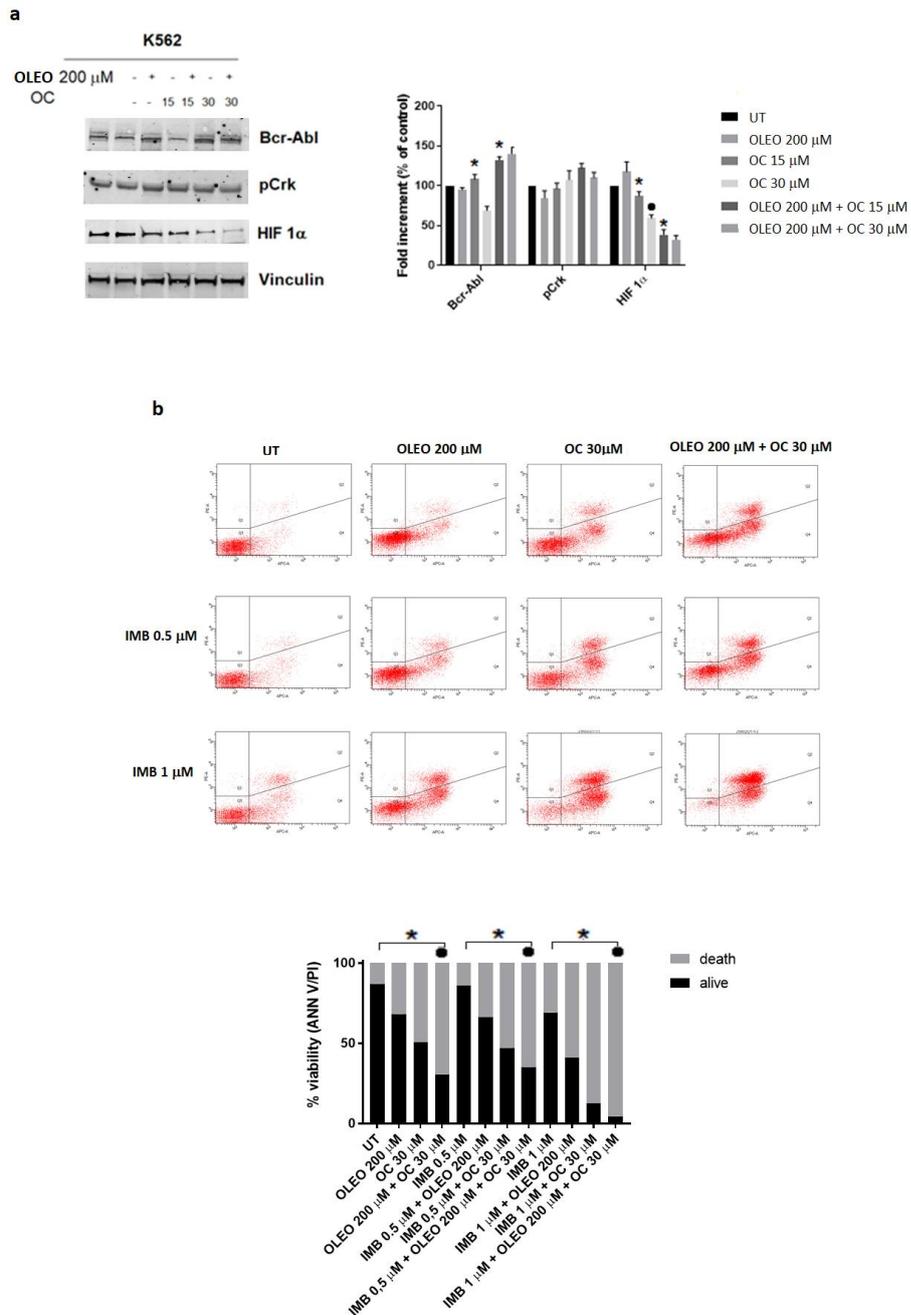


Figura 22. Valutazione degli effetti di OLEO±OC su cellule K562.

a) Western Blot di Bcr-Abl, pCrk e HIF1 α in cellule trattate con Ole±OC per 48h; i livelli di Bcr-Abl, pCrk e HIF1 α sono stati normalizzati sui corrispondenti valori di vinculina ed espressi come percentuale rispetto al controllo UT. * $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato • $p \leq 0.05$ si riferisce al cotrattamento Ole+Oc rispetto al trattamento con solo OC.

b) analisi dell'apoptosi cellulare indotta dal trattamento con Ole ± OC ± Imatinib (IMB) per 72h valutata tramite analisi citofluorimetrica basata sull'incorporazione da parte delle cellule di Ioduro di propidio e

annessina V-APC. A destra il relativo grafico sulla quantità di cellule vive e morte espresse in percentuale.
** $p \leq 0.05$ si riferisce al controllo non trattato*

DISCUSSIONE

Il melanoma è un tumore della pelle particolarmente aggressivo che sebbene costituisca soltanto l'1-4% dei tumori cutanei, si associa alla prognosi peggiore con circa il 60% di mortalità [227].

Il melanoma origina dai melanociti che risiedono nello strato basale dell'epidermide dove producono la melanina, responsabile della pigmentazione della pelle; la funzione principale dei melanociti è quella di offrire protezione dai raggi UV [228]. L'attività e la sopravvivenza dei melanociti sono strettamente dipendenti dalle cellule vicine come cheratinociti e fibroblasti, ma dipendono anche da fattori esterni come l'irradiazione da raggi UV. Secondo il modello di Clark [229], l'insorgenza del melanoma è un processo che parte da un nevo benigno in cui i melanociti portano avanti una proliferazione controllata; l'accumulo di mutazioni a livello dei melanociti si traduce nella formazione di un nevo displastico, melanoma, che può rimanere latente oppure propagarsi. La crescita del melanoma può essere di due tipi: i) radiale, che rimane confinata all'epidermide e ii) verticale, associata all'invasione dermica e che può culminare nella formazione di metastasi da parte delle cellule maligne [229].

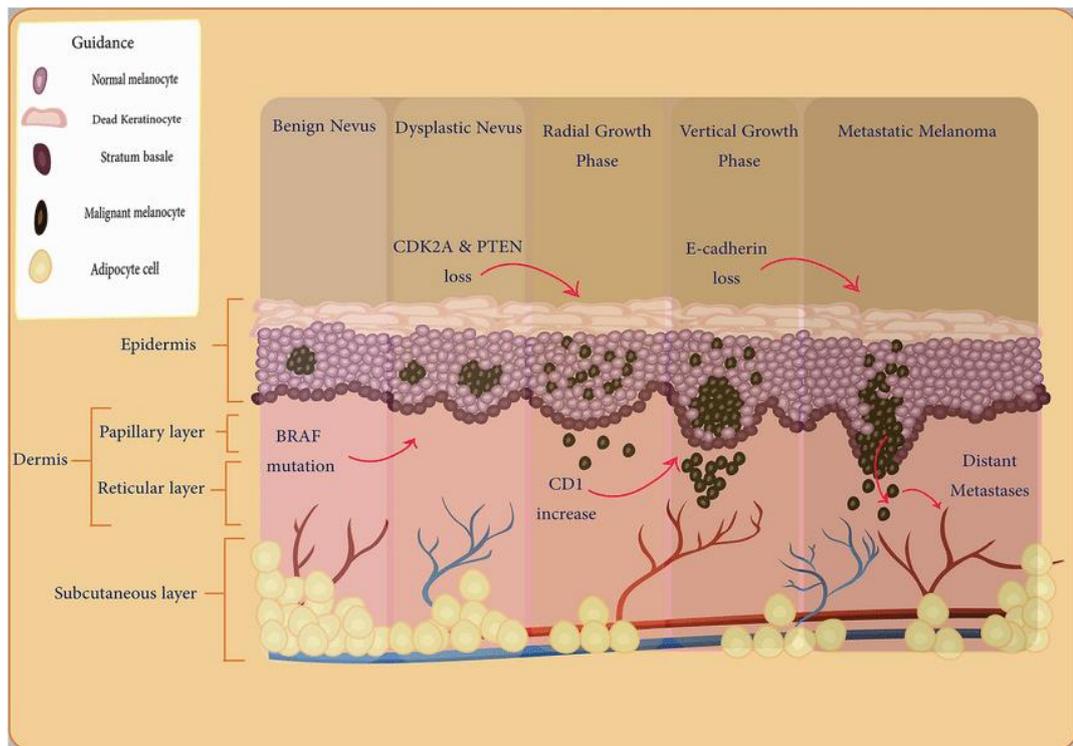


Figura 23. Progressione del melanoma.

La formazione del melanoma avviene a partire da un nevo benigno formato da melanociti che in seguito all'accumulo di mutazioni possono sviluppare un fenotipo maligno e crescere fino ad invadere il derma, entrare nel circolo sanguigno e causare metastasi. Immagine ripresa da [230].

Il melanoma è considerato una patologia multifattoriale la cui insorgenza è determinata dall'interazione tra fattori genetici e ambientali. Il primo fattore di rischio per lo sviluppo del melanoma è dato dall'esposizione ai raggi UV [231], ma anche la familiarità e quindi la predisposizione genetica giocano un ruolo chiave nell'insorgenza della malattia. Nei casi di melanoma familiare le mutazioni responsabili dell'insorgenza della patologia sono soprattutto quelle a carico di CDKN2A e più raramente di CDK4 [232]. Anche un elevato numero di nevi può rappresentare un fattore di rischio, infatti circa il 25% dei melanomi si formano da nevi benigni pre-esistenti [233].

Come per tutti i tumori, le alterazioni genetiche ed epigenetiche sono alla base della formazione e dello sviluppo del melanoma; il 50-70% dei melanomi presentano mutazioni a carico di BRAF [234] per cui la proteina risulta super-attivata, mentre circa il 20% presenta mutazioni a carico del proto-oncogene NRAS [235]. All'interno delle mutazioni su BRAF, la mutazione prevalente (90% di tutte le mutazioni) è la V600E [236].

In condizioni fisiologiche, la via delle MAPK viene attivata a seguito del legame tra un ligando extracellulare e una protein chinasi di membrana. La protein chinasi di membrana, legatasi al suo ligando, dimerizza e i due dimeri che si sono formati si fosforilano reciprocamente; quindi, il recettore attivato si lega al dominio SH2 della proteina adattatrice, Grb2, che tramite il dominio SH3 lega la proteina SOS attivandola. SOS funziona da fattore di scambio nucleotidico (GEF) specifico per RAS, infatti una volta attivato consente la conversione di GDP in GTP da parte di RAS, promuovendone l'attivazione. RAS attiva RAF tramite un processo *multistep* che implica cambiamenti conformazionali, fosforilazione e dimerizzazione. RAF attivato fosforila e attiva MEK1 e MEK2, che a sua volta fosforila e attiva ERK1 e ERK2. Una volta attivato, ERK regola tutta una serie di substrati citoplasmatici e nucleari, inclusi numerosi fattori trascrizionali che controllano i geni responsabili della progressione nel ciclo cellulare e della proliferazione. ERK inoltre fosforila e inattiva direttamente gli intermediari a monte attuando un meccanismo di *feedback* negativo sulla via BRAF→MEK1/2→ERK1/2 MAP. In aggiunta ERK regola l'espressione di geni che codificano proteine come SPRY e DUSPs, che effettuano entrambi *feedback* negativo sulla via. Le proteine SPRY agiscono annientando l'interazione Grb2-SOS, mentre le proteine DUSPs costituiscono delle fosfatasi specifiche per ERK.

L'iperattivazione di ERK determina quindi una proliferazione incontrollata e contribuisce alla resistenza all'apoptosi [237,238].

Sempre nei tumori mutati per BRAF, il *feedback* negativo ERK-dipendente blocca la via di segnalazione innescata dal recettore tirosino-chinasico limitando la formazione di molecole di RAS attivo legato a GTP. In questa situazione RAS è insufficiente a promuovere la dimerizzazione di BRAF, quindi BRAF V600E funziona come monomero anziché come dimero [239].

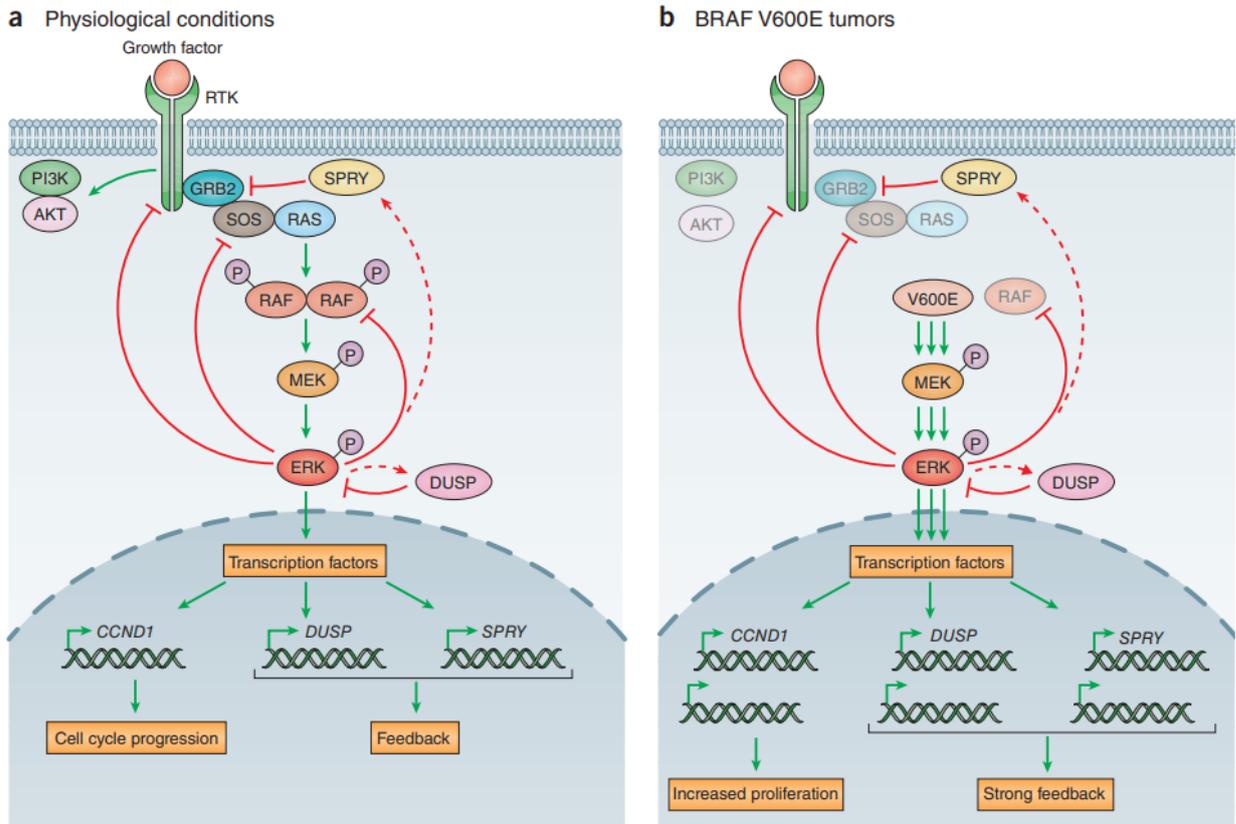


Figura 24. Via di segnalazione di ERK in condizioni fisiologiche e in tumori presentati la mutazione V600E a carico di BRAF.

In condizioni fisiologiche l'attivazione della via di ERK richiede il legame tra recettore di membrana e ligando che innesca un meccanismo di attivazione "a cascata" che culmina con ERK. Uno dei fattori cruciali della via di ERK è RAF che normalmente, una volta attivato da RAS, subisce un processo di dimerizzazione/fosforilazione necessario per attivare MEK e quindi ERK. La presenza della mutazione V600E a carico di RAF, fa sì che la proteina funzioni come monomero indipendentemente dal legame ligando-recettore, per cui comporta un'attivazione massimale della via di ERK. Immagine ripresa da [240].

Accanto alla via delle MAPK, anche la via collaterale di PI3K/AKT è strettamente implicata nel meccanismo di melanogenesi e nella progressione della malattia. L'iperattivazione di questa via nel melanoma si associa all'aumentata espressione dei ligandi per i recettori tirosin chinasi o a mutazioni dei recettori stessi [241–244], o a carico di PI3K/AKT/PTEN/mTOR [241,245–247]. Mutazioni a carico di PTEN, associate all'aumento dell'espressione di AKT si trovano in circa il 10% dei melanomi [248–250].

La rimozione chirurgica rappresenta il trattamento primario per i melanomi localizzati e viene associata a biopsia dei linfonodi sentinella nel caso in cui la lesione superi gli 0.8 mm di spessore o sia ulcerata [251]. In caso di tumore metastatico, il trattamento chirurgico non è risolutivo e richiede delle terapie aggiuntive. La chemioterapia utilizzata comprende essenzialmente due farmaci che sono la Dacarbazina (DTIC) e il Temozolomide. La Dacarbazina è stata approvata dalla FDA per il trattamento del melanoma nel 1975 e, nonostante la sua modesta efficacia, rappresenta il trattamento standard per il melanoma metastatico e costituisce la base per la maggior parte dei trattamenti combinati. Il Temozolomide è un analogo della Dacarbazina e non ha mostrato particolari vantaggi terapeutici rispetto a questa; la scelta tra Temozolomide e Dacarbazina, dunque, ricade essenzialmente sul tipo di somministrazione, visto che il Temozolomide può essere assunto per via orale e la Dacarbazina no e sulla presenza di metastasi cerebrali, dal momento che il Temozolomide è capace di penetrare nel sistema nervoso centrale [252].

Un altro approccio terapeutico al melanoma è costituito dall'immunoterapia che si basa sul potenziamento della risposta immunitaria contro il tumore; l'immunoterapia è anche utile per eliminare le cellule cancerose danneggiate dai farmaci citotossici. I farmaci appartenenti alla classe degli immuno-terapici comunemente utilizzati contro il melanoma sono l'interleuchina 2 (IL-2), l'interferone α (IFN- α), Ipilimumab e timosina α 1 [253]. IL-2 è stata approvata dalla FDA nel 1998 e agisce stimolando la proliferazione e l'attività di cellule T [254]; IFN- α è una citochina che viene rilasciata in risposta a patogeni o in presenza di cellule tumorali ed è stata approvata come terapia adiuvante in pazienti con alto rischio di recidiva dopo resezione chirurgica del melanoma [255]. Ipilimumab è un anticorpo monoclonale che blocca i recettori di CTLA-4, che costituiscono dei recettori di membrana appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline e che sono over espresse nei linfociti T [256]; il suo utilizzo è stato approvato dalla FDA per il trattamento del melanoma nel 2011 dopo che Hodi e altri [257] hanno dimostrato nel 2010 l'effetto significativo del farmaco nell'aumentare la sopravvivenza in pazienti affetti da melanoma metastatico. Alla classe degli agenti immunoterapici appartiene anche Imiquimod, un farmaco ad uso topico che agisce attivando TLR 7/8 e quindi promuovendo la produzione di citochine come IFN- α , IL-2 e TNF che stimolano la risposta immunitaria innata [258].

Accanto alla chemioterapia e all'immunoterapia, nel trattamento del melanoma sono stati introdotti i farmaci ad azione mirata che agiscono selettivamente su bersagli molecolari associati allo sviluppo e alla progressione del tumore. I BRAF inibitori agiscono su BRAF che rappresenta l'oncogene più frequentemente mutato nel melanoma; tra questi si annoverano Sorafenib, Vemurafenib, e Dabrafenib.

Sorafenib agisce su diversi recettori per tirosin chinasi quali BRAF, CRAF, PDGFR, VEGFR, p38 e c-kit; è stato il primo farmaco studiato in pazienti con melanoma, ma non ha dato i risultati attesi, né utilizzato da solo, né utilizzato in combinazione con altri farmaci [259,260]. Vemurafenib è un inibitore assunto per via orale specifico per i tumori presentanti la mutazione BRAF^{V600E} ed è trenta volte più selettivo sulle forme mutate di BRAF piuttosto che sulle forme non mutate [260]. Durante studi clinici ha mostrato

un'efficacia ancora maggiore della Dacarbazina [261] e per questo motivo nel 2011 è stato approvato dalla FDA per il trattamento del melanoma. Nonostante i benefici dati dal trattamento, i pazienti trattati con Vemurafenib vanno presto incontro a resistenza farmacologica e questo rappresenta il limite maggiore a questo tipo di terapia [262].

Dabrafenib è un inibitore di BRAF^{V600E} cento volte più selettivo per la forma mutata piuttosto che per la forma *wild type* [260] e il suo utilizzo nel trattamento del melanoma è stato approvato dalla FDA nel 2013. Dabrafenib ha mostrato un'efficacia simile a quella del Vemurafenib [263] e in aggiunta è risultato attivo contro metastasi al cervello [264]. Come per il Vemurafenib, il limite maggiore per l'utilizzo di Dabrafenib è dato dal repentino sviluppo di resistenza nei pazienti [265].

Oltre a BRAF, altro bersaglio farmacologico è MEK; Trametinib è un inibitore selettivo di MEK assunto per via orale che è stato approvato per il trattamento del melanoma metastatico nel 2013 [262] avendo dimostrato in fase di studio, un'efficacia superiore alla chemioterapia [266,267].

Per aumentare l'efficacia del trattamento farmacologica e ritardare o limitare il fenomeno della resistenza farmacologica in clinica viene spesso tentato l'approccio della terapia combinata che nella maggior parte dei casi si basa sull'utilizzo del chemioterapico Dacarbazina in associazione con altri chemioterapici o con farmaci ad azione mirata. Molto utilizzata in clinica è anche l'associazione tra BRAF e MEK inibitori che ha mostrato un'efficacia maggiore rispetto al trattamento singolo con inibitori di BRAF [268]; il primo trattamento combinato approvato è stato Dabrafenib+Trametinib [269].

Negli ultimi anni sono stati fatti studi anche sul possibile utilizzo di nanoparticelle e nanovesicole nel trattamento del melanoma e i risultati ottenuti fanno ben sperare riguardo alla possibilità di una futura applicazione in clinica finalizzata ad aumentare l'assorbimento e quindi l'efficacia farmacologica.

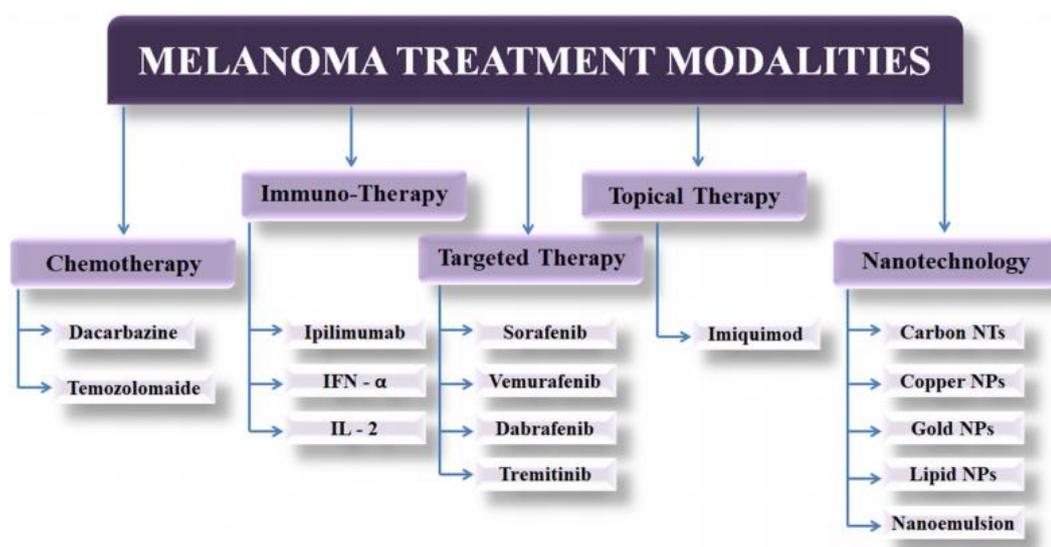


Figura 25. Classificazione dei trattamenti utilizzati contro il melanoma. Immagine ripresa da [269]

Il problema maggiore connesso alle terapie in uso per il trattamento del melanoma è dato oltre che dagli effetti collaterali, dall'insorgenza della farmaco resistenza. La resistenza ai farmaci è un fenomeno che può essere dovuto a numerose cause, tra cui l'over espressione di alcune vie di segnalazione molecolari che guidano la sopravvivenza e la progressione neoplastica. In particolare, molti studi hanno dimostrato che la via di segnalazione di AKT è strettamente associata al fenomeno della resistenza farmacologica. AKT è una serino treonina chinasi appartenente alla via di PI3K-AKT-mTOR, attivata a monte da un recettore di tipo tirosin chinasi [270,271]; la sua funzione è estremamente varia all'interno della cellula, infatti costituisce un mediatore della proliferazione, della sopravvivenza, della glicolisi, della sintesi proteica, della stabilità genomica e si associa anche a fenomeni di inibizione dell'apoptosi in risposta a fattori di crescita o a stimoli extracellulari [272,273]. Nel contesto tumorale, AKT è alla base di processi che portano alla progressione e alla diffusione metastatica, come la motilità cellulare, la chemiotassi e l'angiogenesi [274,275].

AKT è conosciuto anche come protein chinasi B (PKB) a causa dell'alta omologia con la protein chinasi A (PKA). Sono state identificate 3 isoforme di AKT, AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) e AKT3 (PKB γ), tutte implicate in qualche modo nel cancro [276,277].

L'attivazione di tutte le isoforme di AKT avviene nel medesimo modo: in risposta al legame tra fattori di crescita e stimoli extracellulari, come IGF-1, PDGF, citochine, ormoni e mitogeni, [278,279] con il recettore tirosin chinasi, si ha l'attivazione del dominio catalitico di PIP3K che recluta AKT sulla membrana cellulare legando il dominio PH ai lipidi di membrana [280]. AKT quindi va incontro ad una serie di cambiamenti conformazionali che culminano nella fosforilazione del residuo Thr308 da parte di PDK1 e del residuo Ser473 ad opera della chinasi mTORC2 [281,282]. In aggiunta a mTORC2 altre chinasi tra cui DNA-PK vanno a fosforilare e attivare AKT su Ser473 [283].

Una volta attivato, AKT fosforila, modulando, vari substrati cellulari, coinvolti nella sopravvivenza e nella crescita della cellula; mTOR rappresenta il principale effettore a valle di PI3K/AKT ed è un regolatore chiave del metabolismo che una volta attivato fosforila la chinasi ribosomiale S6 4E-BP1 promuovendo la sintesi proteica. PTEN e PHLPP costituiscono due regolatori negativi di AKT promuovendone la defosforilazione [284].

Nel contesto della resistenza farmacologica la via di PI3K-AKT è risultata implicata nella diminuzione dell'efficacia di diversi farmaci, tra cui agenti citotossici, agenti ad azione specifica per i recettori tirosin chinasi, farmaci anti-estrogenici e inibitori di BRAF/MEK/ERK.

La resistenza a farmaci citotossici AKT mediata è stata dimostrata in diversi tipi tumorali:

- Tumore della mammella [285–287]
- Tumore alle ovaie [288–291]
- Tumore del polmone [292]
- Tumore del pancreas [293]

Per quanto riguarda invece farmaci ad azione mirata verso i recettori tirosin chinasi, AKT è risultato coinvolto nell'insorgenza della resistenza in:

- Tumore del polmone trattato con farmaci anti-EGFR [294–300]
- Tumore della mammella [301–304]

La via di AKT è risultata implicata anche nella resistenza farmacologica con terapia anti-estrogenica nel tumore della mammella [305,306].

Anche nel melanoma la via di AKT può essere responsabile della non sensibilità ad un trattamento farmacologico soprattutto ai trattamenti con BRAF/MEK inibitori [246]; dati ottenuti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che in cellule di melanoma BRAF^{V600E} mutate, l'esposizione a bassi livelli di pH determinava resistenza al trattamento con Vemurafenib, AKT mediata, e che utilizzando un farmaco efficace contro AKT/mTOR, RAD001, era possibile colpire le cellule resistenti all'inibitore di BRAF [71]. Visto il ruolo cruciale della via di AKT nel determinare l'efficacia di molti trattamenti farmacologici, negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi sull'associazione tra farmaci convenzionali e inibitori della via di AKT; questo tipo di approccio è stato tentato con risultati molto positivi in cellule di tumore del polmone [307] e della mammella [308–311].

In aggiunta ai prodotti di sintesi da affiancare all'utilizzo dei farmaci convenzionali nella terapia antitumorale, molti composti naturali hanno mostrato una significativa inibizione della via di AKT. Su cellule di tumore prostatico è stato testato l'indolo-3-carbinolo (I3C) derivante dalla degradazione della glucobrassicina che si trova in molte piante crocifere con risultante induzione di apoptosi cellulare AKT mediata [312]; sempre su cellule di tumore prostatico e in aggiunta su cellule di tumore della mammella, sono stati utilizzati polifenoli di tè verde e nero ed è stato dimostrato che erano in grado di inibire la crescita cellulare agendo su AKT [313,314]. Inoltre, diversi flavonoidi hanno mostrato capacità di inibire la via di AKT, ad esempio la nobiletina e la luteolina sono risultate in grado di inibire NFκB, AKT dipendente, in cellule di fibrosarcoma umano e in macrofagi murini [315,316].

L'utilizzo di prodotti naturali in grado di agire su AKT in associazione a farmaci classici è molto vantaggioso perché apre lo scenario di un tipo di terapia complementare basata sull'utilizzo di un agente non tossico da affiancare ad agenti farmacologici comunemente utilizzati in terapia. Noi, perseguendo questo obiettivo, abbiamo testato l'Oleuropeina Ole glicoside in cellule di melanoma e, assestandoci su una dose non tossica 250 μM, abbiamo appurato che questa era in grado di inibire la vitalità cellulare modulando proprio la via di AKT lasciando invece inalterata la via di ERK1/2. Questo risultato è del tutto in linea con quanto osservato da altri autori rispettivamente su cellule di glioma e di epatoma (HepG2). [317] [318]

L'Oleuropeina da noi testata entra all'interno delle cellule di melanoma dopo circa 15 minuti dal trattamento e probabilmente ciò è da attribuirsi al fatto che il melanoma, così come la maggior parte dei tumori, esprimono i trasportatori del glucosio (GLUT 1 e GLUT3) che potrebbero favorire l'ingresso di Ole nella cellula, dal momento che, nella sua forma glucoside, il polifenolo presenta una molecola di

glucosio. Hamdi e altri [196] hanno dimostrato che l'effetto antiproliferativo di Ole in fibroblasti normali si riduceva rimuovendo la molecola di glucosio mediante l'utilizzo della β -glucosidasi e che il D-glucosio e Ole competevano per il legame con i GLUT come dimostrato dall'incubazione di cellule di melanoma con un eccesso di D-glucosio. Queste evidenze ci consentono di affermare che l'ingresso di Ole nella cellula è mediato dai GLUT e che di conseguenza il suo effetto potrebbe essere maggiore in cellule over-esprimenti questi trasportatori come le cellule tumorali, rispetto a cellule normali. Questa deduzione è fondamentale se si pensa alla possibilità di colpire selettivamente le cellule tumorali e se, nel caso specifico del melanoma, si vuole prospettare un'applicazione topica del prodotto direttamente sul nevo maligno con specificità di azione su cellule tumorali ma non su quelle normali.

Visto l'effetto inibitorio sulla via di segnalazione operato da Ole, la nostra indagine è proseguita andando a verificare se questo polifenolo potesse essere in grado di potenziare l'effetto di farmaci utilizzati per il trattamento del melanoma. Il primo test è stato fatto utilizzando Ole in associazione con il chemioterapico maggiormente utilizzato per il trattamento del melanoma, la Dacarbazina, DTIC. DTIC da sola ha mostrato nei pazienti scarsi risultati in termini di sopravvivenza [252] e comporta una risposta della durata media di circa 5-6 mesi con un tasso di risposta oggettivo di circa il 20% e un tasso di risposta completo del 5% [319].

Escogitare un modo per potenziare gli effetti del trattamento con DTIC sarebbe estremamente utile ai fini del trattamento del melanoma; i nostri esperimenti hanno dimostrato che a 250 μ M, Ole era in grado di potenziare l'effetto di DTIC utilizzata a due concentrazioni, 270 e 540 μ M, mentre non è stato evidenziato lo stesso effetto potenziante utilizzando il Vemurafenib (PX4032) [212].

Il trattamento con Ole è, invece, risultato particolarmente promettente se associato ad un farmaco che agisce sulla via di mTOR/AKT, Everolimus (RAD001). RAD001 era stato utilizzato, precedentemente, nel nostro laboratorio per colpire cellule esposte ad un ambiente acido resistenti alla terapia con PLX4032 [71]; l'associazione Ole/RAD001 si è dimostrata particolarmente efficace, probabilmente, perché sia Ole che il farmaco, hanno come target la via di mTOR/AKT. Molto interessante è il fatto che, anche in cellule esposte cronicamente a PLX4032, in cui l'asse di segnalazione AKT/S6 è particolarmente attivo rispetto a cellule non resistenti (Fig. 8c), l'effetto di RAD001 viene incrementato dall'utilizzo di Ole.

Alla luce dei promettenti risultati ottenuti dall'impiego di Ole di sintesi su cellule tumorali, la nostra ricerca si è indirizzata verso sull'utilizzo di estratti da foglie arricchiti in Oleuropeina, OLEO.

Utilizzare estratti da foglie significa sfruttare prodotti facilmente reperibili in natura e soprattutto derivanti da scarti di frantoio che altrimenti verrebbero smaltiti. Le foglie, rispetto ai frutti della pianta di olivo, contengono molti composti, tra cui i flavonoidi, che hanno mostrato notevoli attività anti-tumorali [320–324]. Inoltre nelle foglie i polifenoli si trovano in forma glicata [325] e la presenza di una molecola di glucosio facilita il loro ingresso in cellule esprimenti alti livelli di GLUT, come appunto, le cellule tumorali.

L'estratto da foglia che abbiamo utilizzato sulle cellule di melanoma ha rivelato una capacità ancora maggiore rispetto all'Ole sintetica, di cooperare con DTIC, ma soprattutto con RAD001.

Per comprendere più a fondo i meccanismi attraverso cui Ole colpiva le cellule tumorali, partendo dall'inibizione dell'attività di pAKT operata dal polifenolo, ci siamo domandati se potesse esserci un legame con il metabolismo cellulare. Come ben noto, le cellule tumorali sono avidi di glucosio e, anche in presenza di ossigeno, prediligono un metabolismo di tipo glicolitico, meno vantaggioso da un punto di vista energetico, ma più efficiente nel fornire alla cellula, nel minor tempo possibile, tutti gli intermedi necessari all'accrescimento e alla proliferazione cellulari (effetto Warburg).

AKT è una delle più importanti molecole di segnalazione che controlla il metabolismo cellulare in quanto stimola l'ingresso di glucosio e il suo metabolismo in cellule tumorali [326]; per questo motivo si trova spesso costitutivamente attivo in cellule maligne.

Da sempre il metabolismo cellulare rappresenta un importante target farmacologico e l'identificazione di nuovi composti capaci di modularlo è estremamente importante, ancor più, se questi composti sono di origine naturale e non causano effetti tossici.

Avvalendoci di uno strumento in grado di valutare in modo dinamico il comportamento metabolico delle cellule, abbiamo trovato che lo stesso estratto da foglie (OLEO), utilizzato per potenziare la citotossicità di DTIC e RAD001, era in grado di diminuire l'attività metabolica di cellule di melanoma primarie e metastatiche, ma anche di cellule di tumore del colon, del seno e di leucemia [327]. In linea con i nostri risultati, anche altri autori hanno evidenziato l'azione di prodotti naturali sul metabolismo di cellule tumorali: [328], [329].

L'attività anti-glicolitica di OLEO, risultava associata alla diminuzione, valutata sia a livello di mRNA che di proteina, di 3 enzimi del metabolismo glicolitico: GLUT1, PKM2 e MCT4.

GLUT1 appartiene alla famiglia dei GLUT che rappresentano una famiglia di enzimi responsabili dell'ingresso del glucosio all'interno della cellula; tali trasportatori risultano over-espressi in cellule tumorali e guidano la glicolisi aerobia che caratterizza i tumori [330]. Appartenente alla famiglia dei GLUT, GLUT1 è una delle isoforme più studiate soprattutto nel contesto tumorale, in quanto si trova over-espresso in vari tipi di tumore che mostrano aumentati livelli di glucosio intracellulare rispetto alle cellule normali [331].

Il valore prognostico di GLUT1 nei tumori è ancora argomento dibattuto; tuttavia vari studi hanno dimostrato che l'over-espressione di GLUT1 è strettamente correlata a prognosi negativa nei pazienti [332].

Per questi motivi l'inibizione dell'attività di GLUT1 risulta molto importante nell'ottica di privare le cellule tumorali della loro principale fonte di sostentamento, il glucosio, in modo da rallentarne o ancor meglio arrestarne la crescita. Come noi anche altri ricercatori hanno testato l'utilizzo di composti naturali per inibire l'attività di GLUT1 [333,334] con risultati che fanno prospettare la concreta possibilità di sfruttare prodotti nutraceutici per la loro attività anti-glicolitica.

La piruvato chinasi (PK) catalizza l'ultimo step irreversibile della glicolisi che consiste nella conversione del fosfoenolpiruvato in piruvato. Nei mammiferi esistono quattro isoforme di PK, PKM1, PKM2, PKL e PKR, tutte tessuto specifiche [335].

In particolare PKM2 si trova espressa in tutte le cellule proliferanti, specialmente nei tumori e nel tessuto embrionale [335–337]. L'isoforma PKM2 che si ritrova a livello fetale viene ben presto sostituita da PKM1, PKL o PKR a seconda del tessuto [335]; nelle cellule cancerose avviene esattamente il contrario, cioè viene ad essere espressa PKM2 e vengono gradualmente perse le altre isoforme [335–337]. PKM2 esiste sia come tetramero ad alta attività catalitica, che come dimero a bassa attività catalitica [335,338]; nei tumori è spesso presente sotto forma di dimero e promuove la sintesi di macromolecole indispensabili per la proliferazione e la crescita tumorali [339,340]. Inoltre, studi recenti hanno evidenziato che PKM2 agisce anche come protein chinasi utilizzando il fosfoenolpiruvato come substrato per promuovere la tumorigenesi [341]. Il ruolo cruciale che PKM2 svolge nel metabolismo glicolitico la rende un ottimo bersaglio terapeutico per bloccare la crescita tumorale.

Il nostro studio mostra che OLEO è efficace anche su PKM2, sia a livello di mRNA che di proteina, portando ad una diminuzione significativa dell'espressione e dell'attività dell'enzima. Come noi altri autori hanno riscontrato un'attività inibitoria di composti naturali su PKM2; in particolare il resveratrolo è risultato in grado di inibire la glicolisi aerobia e i livelli di PKM2 in cellule di varie linee tumorali di [342], [343] [344] così come la curcumina, un noto composto fitopolifenolico [345].

Altro marcatore metabolico bersaglio dell'azione inibitoria di OLEO su cellule di melanoma è MCT4; MCT4 è un trasportatore di lattato caratterizzato da un'affinità molto bassa per il piruvato e maggiore per il lattato, questo fa sì che, prima di essere trasportato all'esterno della cellula, il piruvato che si è formato a seguito della glicolisi, venga convertito in lattato [346]. La famiglia dei trasportatori dei monocarbossilati è composta da 14 membri, di cui solo MCT1 e MCT4 hanno mostrato un ruolo significativo nel cancro [347]; l'over-espressione di MCT1 e MCT4 è stata riportata in diversi tipi di cancro, tra cui quello del seno, del colon, del pancreas, della prostata, del rene e nel glioblastoma [348]. Uno studio di tipo immunostochimico condotto su 365 pazienti affetti da melanoma ha rivelato che MCT4 si trova significativamente aumentato nelle lesioni metastatiche ed è associato a prognosi negativa [349]. MCT4 è risultato coinvolto anche nel processo di metastatizzazione del cancro gastrico [350] e del carcinoma colon-rettile [351,352]. Dal momento che lo *shuttle* del lattato tra cellule è un evento fondamentale per la progressione neoplastica, è evidente che i trasportatori dei monocarbossilati sono dei bersagli molto validi per la terapia anti-tumorale e trovare in natura composti non tossici in grado di ridurre l'efficienza funzionale rappresenta un importante passo nell'utilizzo di prodotti naturali in associazione con i farmaci antitumorali attualmente in uso.

Il nostro studio sull'effetto antitumorale di OLEO è proseguito andando a considerare un altro tipo di tumore, il tumore del colon e in previsione di condurre un esperimento *in vivo* abbiamo valutato OLEO su

cellule di tumore del colon HCT116. OLEO ha mostrato capacità inibitorie sulla vitalità di e sulla capacità di queste cellule di formare colonie e soprattutto si è rivelato ancora una volta in grado di potenziare gli effetti del 5-FU comunemente utilizzato per il trattamento del tumore del colon.

Dopo aver ottenuto tutte queste importanti informazioni sull'effetto di OLEO in esperimenti condotti *in vitro*, abbiamo pensato di avvalorare ulteriormente queste evidenze ricorrendo ad un modello animale di tumore del colon. Il tumore colonrettale rappresenta il terzo tipo di tumore più diagnosticato nel mondo [353] ed è la seconda causa di morte per tumore in Europa [354]. Molti modelli animali di cancro del colonretto si basano sulla presenza di mutazioni a livello del gene *Apc*, che si trova mutato in più dell'80% dei tumori del colon nell'uomo [355]. La perdita di funzione del gene *Apc* comporta l'attivazione della via di segnalazione di WNT che porta alla trascrizione di geni promuoventi il tumore, tra cui *Myc* [356].

Lo sviluppo del tumore del colon è un evento strettamente collegato a fattori microambientali; di particolare rilevanza è l'associazione tra infiammazione e cancro del colon. Gli individui che soffrono di coliti ulcerose e che sono in generale soggetti a fenomeni infiammatori a livello intestinale sono più predisposti a sviluppare il cancro del colon [357].

Nonostante circa il 75% dei casi di tumore del colon siano sporadici, molte forme insorgono a causa di una predisposizione familiare [358]. La sindrome da poliposi adenomatosa familiare (FAP) prevede la formazione di centinaia/migliaia di polipi a livello del colon che portano allo sviluppo del cancro; sebbene soltanto l'1% circa dei casi di tumore è riconducibile a questa forma familiare, gli individui affetti da FAP hanno il 100% di probabilità di sviluppare il tumore al colon almeno che questo non venga rimosso [359]. Nel caso di sviluppo del tumore del colon da FAP, la dieta ha un ruolo cruciale nel prevenire o comunque ridurre lo sviluppo della malattia, quindi il contenuto degli estratti da foglia d'olivo potrebbe essere particolarmente utile.

Il modello animale ideale per studiare il tumore del colon da FAP è quello dei ratti Pirc perché i tumori che sviluppano sono molto simili a quelli che si hanno negli uomini. I ratti Pirc sono caratterizzati da una mutazione *germline* su un allele del gene *Apc* (F344/NTac-*Apc*^{am1137}) e a differenza dei modelli murini *Apc*-mutati, sviluppano spontaneamente tumori sia a livello del piccolo intestino, sia a livello del colon.

Nel nostro studio ci siamo avvalsi proprio di questo modello per valutare gli effetti di OLEO sulla progressione dei tumori del colon e sulla modulazione della componente infiammatoria.

L'infiammazione, soprattutto se cronica, ha un impatto notevole sulla progressione tumorale, determinando la plasticità delle stesse cellule tumorali e delle cellule stromali [360].

Le cellule tumorali rilasciano citochine e chemochine che attirano i leucociti tra cui neutrofili, cellule dendritiche, macrofagi e eosinofili e mastociti, che a loro volta sono capaci di produrre citochine e mediatori citotossici, tra cui ROS, MMP, TNF- α , interleuchine e interferone [361].

Ci sono molte evidenze sul fatto che molti tumori si istaurano a seguito di infezioni [361–364]. Le cellule immunitarie a seguito di esposizione ad agenti patogeni inducono danni al DNA in cellule proliferanti

attraverso la produzione di ROS e specie di azoto, tra cui ossido nitrico, che reagendo formano perossinitrite, un agente mutageno [365]. Ad esempio mutazioni a livello di p53, che si ritrovano anche nel cancro, occorrono in molte patologie su base infiammatoria, tra cui l'artrite reumatoide e malattie croniche intestinali [366].

Sezioni di tessuto tumorale di ratti Pirc alimentati con dieta a base di OLEO hanno mostrato l'espressione di iNOS significativamente ridotta rispetto a quella della mucosa tumorale di ratti Pirc sottoposti a dieta standard; inoltre, la valutazione della produzione di NO_2^- da parte di macrofagi peritoneali isolati da ratti Pirc e stimolati con $\text{IFN}\gamma/\text{LPS}$ ha evidenziato che la dieta arricchita in OLEO era in grado di diminuire i livelli di NO_2^- . A conferma della modulazione da parte di OLEO sul fenotipo infiammatorio dei macrofagi, l'analisi di cellule macrofagiche murine RAW264.7 stimolate con LPS ha confermato che OLEO era in grado di diminuire la produzione di NO_2^- e di ridurre l'espressione di due marker infiammatori importanti, iNOS e COX-2 soprattutto se utilizzata per trattamenti di durata maggiore (96h) rispetto a trattamenti acuti (24h).

L'attenuazione del fenomeno infiammatorio da parte di OLEO potrebbe fornire la spiegazione al fatto che cellule neoplastiche isolate da tessuto tumorale di ratti Pirc, in seguito alla somministrazione sistemica di OLEO, presentavano una ridotta proliferazione e livelli di apoptosi maggiori rispetto ai Pirc di controllo.

Oltre all'Oleuropeina esistono molti altri composti naturali dotati di attività antitumorale; sfruttando la loro bassa tossicità sull'organismo è possibile combinare due o più prodotti nutraceutici per ottenere un effetto biologico ancora maggiore. In questo studio abbiamo testato il co-trattamento Oleuropeina e Oleocantale (OC) ipotizzando che insieme potessero essere più attivi contro cellule tumorali.

L'Oleocantale, conosciuto anche come deacetossi-ligstride aglicone, è un composto polifenolico presente nell'olio di oliva ed è il responsabile del sapore pungente che contraddistingue l'olio [367].

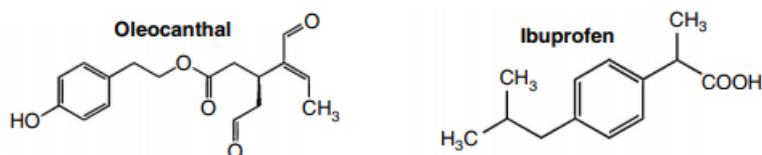


Figura 26. Struttura chimica dell'Oleocantale a confronto con quella di Ibuprofene. Immagine modificata da [368]

OC si contraddistingue per la sua somiglianza strutturale con un noto farmaco anti-infiammatorio, l'ibuprofene e così come ibuprofene, anche OC possiede delle note capacità anti-infiammatorie [368,369]. COX-2 è un noto marker infiammatorio ed è implicata nella patogenesi di vari tumori come riportato da vari studi condotti sia su uomini che su modelli murini [370–374] e dal momento che OC è un noto inibitore delle cicloossigenasi, vari ricercatori si sono cimentati nell'indagine degli effetti di questo polifenolo in

campo oncologico. OC si è rivelato attivo contro vari tipi di cancro, inclusi prostata, polmone, laringe, ovaie, seno e colon [375–379].

Khanal e altri hanno dimostrato che OC era in grado di inibire la vitalità cellulare e promuovere l'apoptosi in cellule di tumore del colon HT29 attivando AMPK e inibendo l'espressione di COX-2 e di AP-1, un fattore trascrizionale che controlla il differenziamento cellulare, la proliferazione e l'apoptosi [380]. Recentemente l'effetto di OC è stato evidenziato anche su c-Met, un recettore chinasi dal ruolo oncogenico in vari tumori; OC è risultato in grado di inibire la fosforilazione di c-Met su cellule di tumore del seno e della prostata dimostrando ancora una volta il suo potenziale anti-tumorale [381].

In cellule di linfoma U937, OC è stato in grado di inibire la proteina Hsp90 che è implicata in varie malattie tra cui cancro e malattie neurodegenerative [382].

In cellule di mieloma multiplo umano, il contributo di OC è stato quello di inibire l'espressione e la secrezione di MIP1 α e di agire sulla via di ERK1/2 e AKT inibendola [383]. Su cellule di tumore del seno, OC è risultato capace di ridurre l'attività di c-Met, la crescita cellulare, la migrazione e l'invasione e ha portato a riduzione di tumorigenicità in modelli murini di cancro al seno [384].

Visto il suo potenziale antitumorale e la scarsità di dati presenti in letteratura, abbiamo deciso di testare OC solo o in combinazione con OLEO su cellule di leucemia cronica in crisi blastica, K562.

La leucemia mieloide cronica è una patologia che colpisce le cellule staminali ematopoietiche e prevede essenzialmente 3 fasi: una fase cronica iniziale che dura 3-5 anni, una fase accelerata con durata 6-18 mesi e una fase finale breve chiamata crisi blastica associata a prognosi negativa [385]. La leucemia mieloide cronica è caratterizzata dalla presenza della traslocazione 9,22 che comporta l'espressione costitutiva dell'oncoproteina Bcr-Abl [386]. Il farmaco per eccellenza utilizzato per il trattamento delle leucemie mieloidi croniche è Imatinib, un inibitore delle tirosin chinasi attivo su Bcr-Abl. Nonostante gli indiscussi benefici apportati da Imatinib, nella maggior parte dei casi il trattamento con questo farmaco si correla all'insorgenza nel paziente di uno stato di minima malattia residua imputabile alla presenza di cellule staminali resistenti alla terapia [387–391].

Molto spesso condizioni microambientali sfavorevoli si associano alla promozione del fenotipo staminale che mostra ridotti livelli di Bcr-Abl ; la diminuzione dei livelli del recettore tirosin chinasi porta di conseguenza ad una minor sensibilità al trattamento con Imatinib [389,390,392].

OC utilizzato a concentrazioni non tossiche per fibroblasti umani MRC5 (15 e 30 μ M), ha portato ad un aumento dei livelli di Bcr-Abl in cellule di leucemia mieloide cronica K562 trattate per 48h, e in maniera opposta ha modulato negativamente i livelli di HIF1 α . HIF1 α è un marcatore di ipossia che si trova costitutivamente espresso in questo tipo cellulare ed ha la funzione di regolare dei geni che controllano il metabolismo energetico, la sopravvivenza, la proliferazione cellulari e l'angiogenesi [393]. In modelli murini di leucemia mieloide cronica, il knockout di HIF1 α , preveniva lo sviluppo della malattia compromettendo la progressione del ciclo cellulare e inducendo l'apoptosi del compartimento staminale

[394]; questo indica che HIF1 α svolge un ruolo chiave nella progressione della leucemia mieloide cronica e per questo costituisce un buon bersaglio da centrare per eradicare la malattia.

OC, seppur utilizzato in quantità molto minori (30 μ M contro 200 μ M) è risultato di per sé più attivo di OLEO nelle cellule K562; l'aggiunta di OLEO determina tuttavia un aumento dell'effetto di OC come emerge dal saggio apoptotico. Inoltre, l'utilizzo di OC/OLEO in combinazione con il farmaco più comunemente utilizzato in clinica, Imatinib, mostra che entrambi i polifenoli sono in grado di potenziare l'effetto del farmaco in termini di induzione di morte cellulare.

CONCLUSIONI

L'impiego di prodotti naturali in campo medico è un argomento che ha guadagnato l'interesse di molti ricercatori negli ultimi anni. In particolare, la possibilità di associare l'utilizzo di farmaci citotossici a sostanze naturali che possono incrementarne l'efficacia senza indurre effetti collaterali nell'ospite è stata oggetto di molti studi di tipo oncologico. I tumori rappresentano ad oggi una delle maggiori cause di morte e purtroppo la loro incidenza è in continuo aumento, quindi, c'è molto interesse nello sviluppare nuovi approcci terapeutici.

Durante questi anni di lavoro abbiamo valutato proprio l'effetto antineoplastico di prodotti naturali, in particolare dell'Oleuropeina, un polifenolo facilmente reperibile in natura in quanto presente maggiormente negli estratti da foglia di olivo e in misura minore in OEVO.

I nostri risultati suggeriscono che:

- l'Oleuropeina utilizzata a concentrazioni non tossiche per cellule normali, è in grado di indurre una diminuzione della vitalità cellulare agendo sulla via di segnalazione AKT/S6, fondamentale per la sopravvivenza cellulare e di ridurre l'attività glicolitica che guida la progressione neoplastica
- l'Oleuropeina è in grado di potenziare l'effetto tossico di vari farmaci utilizzati per il trattamento di diversi tipi di tumore
- l'Oleuropeina è utile come molecola anti-infiammatoria e anti-tumorale come valutato su modelli animali del tumore del colon, dove l'infiammazione gioca un ruolo chiave per lo sviluppo e progressione della neoplasia

In conclusione, questo studio pone le basi per lo sviluppo di nuovi trattamenti combinati in cui l'effetto di farmaci, comunemente utilizzati in clinica, può essere incrementato dall'utilizzo di composti naturali non tossici per l'organismo.

I risultati ottenuti ribadiscono il concetto che quello della nutraceutica è un campo meritevole di studio, perché in natura si possono trovare molte sostanze che potrebbero offrire vantaggi in termini terapeutici. Nel campo oncologico in particolare, l'associazione tra farmaci e prodotti naturali rappresenterebbe una svolta molto importante perché permetterebbe di rendere il trattamento farmacologico più efficace e più tollerabile dal paziente.

Ricerche come questa devono farci riflettere sulle potenzialità dei prodotti che la Natura ci offre e che noi dobbiamo sfruttare al meglio per trarre vantaggi.

BIBLIOGRAFIA

1. Yokota, J. Tumor Progression and Metastasis. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 497–503, doi:10.1093/carcin/21.3.497.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
3. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **1990**, *61*, 759–767, doi:10.1016/0092-8674(90)90186-i.
4. Schroeder, A.; Heller, D.A.; Winslow, M.M.; Dahlman, J.E.; Pratt, G.W.; Langer, R.; Jacks, T.; Anderson, D.G. Treating Metastatic Cancer with Nanotechnology. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 39–50, doi:10.1038/nrc3180.
5. Spill, F.; Reynolds, D.S.; Kamm, R.D.; Zaman, M.H. Impact of the Physical Microenvironment on Tumor Progression and Metastasis. *Current Opinion in Biotechnology* **2016**, *40*, 41–48, doi:10.1016/j.copbio.2016.02.007.
6. Del Prete, A.; Schioppa, T.; Tiberio, L.; Stabile, H.; Sozzani, S. Leukocyte Trafficking in Tumor Microenvironment. *Current Opinion in Pharmacology* **2017**, *35*, 40–47, doi:10.1016/j.coph.2017.05.004.
7. Balkwill, F.R.; Capasso, M.; Hagemann, T. The Tumor Microenvironment at a Glance. *Journal of Cell Science* **2012**, *125*, 5591–5596, doi:10.1242/jcs.116392.
8. Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 309–322, doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022.
9. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
10. Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-Related Inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 436–444, doi:10.1038/nature07205.
11. Grivennikov, S.I.; Greten, F.R.; Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **2010**, *140*, 883–899, doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
12. Joyce, J.A.; Pollard, J.W. Microenvironmental Regulation of Metastasis. *Nat Rev Cancer* **2009**, *9*, 239–252, doi:10.1038/nrc2618.
13. Warburg, O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research* **1925**, *9*, 148–163, doi:10.1158/jcr.1925.148.
14. Barker, J.; Khan, M.A.A.; Solomos, T. Mechanism of the Pasteur Effect. *Nature* **1964**, *201*, 1126–1127, doi:10.1038/2011126a0.
15. DeBerardinis, R.J.; Cheng, T. Q's next: The Diverse Functions of Glutamine in Metabolism, Cell Biology and Cancer. *Oncogene* **2010**, *29*, 313–324, doi:10.1038/onc.2009.358.
16. Deberardinis, R.J. Is Cancer a Disease of Abnormal Cellular Metabolism? New Angles on an Old Idea. *Genet Med* **2008**, *10*, 767–777, doi:10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b.

17. Hirschhaeuser, F.; Sattler, U.G.A.; Mueller-Klieser, W. Lactate: A Metabolic Key Player in Cancer: Figure 1. *Cancer Res* **2011**, *71*, 6921–6925, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.
18. Dibble, C.C.; Manning, B.D. Signal Integration by MTORC1 Coordinates Nutrient Input with Biosynthetic Output. *Nat Cell Biol* **2013**, *15*, 555–564, doi:10.1038/ncb2763.
19. Yuan, T.L.; Cantley, L.C. PI3K Pathway Alterations in Cancer: Variations on a Theme. *Oncogene* **2008**, *27*, 5497–5510, doi:10.1038/onc.2008.245.
20. Stine, Z.E.; Walton, Z.E.; Altman, B.J.; Hsieh, A.L.; Dang, C.V. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discovery* **2015**, *5*, 1024–1039, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0507.
21. DeBerardinis, R.J.; Chandel, N.S. Fundamentals of Cancer Metabolism. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600200, doi:10.1126/sciadv.1600200.
22. Sonveaux, P.; Végran, F.; Schroeder, T.; Wergin, M.C.; Verrax, J.; Rabbani, Z.N.; De Saedeleer, C.J.; Kennedy, K.M.; Diepart, C.; Jordan, B.F.; et al. Targeting Lactate-Fueled Respiration Selectively Kills Hypoxic Tumor Cells in Mice. *J. Clin. Invest.* **2008**, JCI36843, doi:10.1172/JCI36843.
23. Semenza, G.L. Signal Transduction to Hypoxia-Inducible Factor 1. *Biochemical Pharmacology* **2002**, *64*, 993–998, doi:10.1016/S0006-2952(02)01168-1.
24. Chen, J.L.-Y.; Lucas, J.E.; Schroeder, T.; Mori, S.; Wu, J.; Nevins, J.; Dewhirst, M.; West, M.; Chi, J.-T. The Genomic Analysis of Lactic Acidosis and Acidosis Response in Human Cancers. *PLoS Genet* **2008**, *4*, e1000293, doi:10.1371/journal.pgen.1000293.
25. Baldo, B.A.; Pham, N.H. Adverse Reactions to Targeted and Non-Targeted Chemotherapeutic Drugs with Emphasis on Hypersensitivity Responses and the Invasive Metastatic Switch. *Cancer Metastasis Rev* **2013**, *32*, 723–761, doi:10.1007/s10555-013-9447-3.
26. Murai, J.; Huang, S.N.; Das, B.B.; Renaud, A.; Zhang, Y.; Doroshow, J.H.; Ji, J.; Takeda, S.; Pommier, Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res* **2012**, *72*, 5588–5599, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.
27. Ward, H.W.C. Anti-Oestrogen Therapy for Breast Cancer: A Trial of Tamoxifen at Two Dose Levels. *BMJ* **1973**, *1*, 13–14, doi:10.1136/bmj.1.5844.13.
28. Deeks, E.D.; Scott, L.J. Exemestane: A Review of Its Use in Postmenopausal Women with Breast Cancer. *Drugs* **2009**, *69*, 889–918, doi:10.2165/00003495-200969070-00007.
29. Kotake, T.; Usami, M.; Akaza, H.; Koiso, K.; Homtna, Y.; Kawabe, K.; Aso, Y.; Orikasa, S.; Shimazaki, J.; Isaka, S.; et al. Goserelin Acetate with or without Antiandrogen or Estrogen in the Treatment of Patients with Advanced Prostate Cancer: A Multicenter, Randomized, Controlled Trial in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **1999**, *29*, 562–570, doi:10.1093/jjco/29.11.562.
30. Fradet, Y. Bicalutamide (Casodex®) in the Treatment of Prostate Cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2004**, *4*, 37–48, doi:10.1586/14737140.4.1.37.
31. Druker, B.J. Translation of the Philadelphia Chromosome into Therapy for CML. *Blood* **2008**, *112*, 4808–4817, doi:10.1182/blood-2008-07-077958.
32. Arora, A.; Scholar, E.M. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, *315*, 971–979, doi:10.1124/jpet.105.084145.

33. Yuan, R.; Kay, A.; Berg, W.J.; Lebowitz, D. Targeting Tumorigenesis: Development and Use of mTOR Inhibitors in Cancer Therapy. *J Hematol Oncol* **2009**, *2*, 45, doi:10.1186/1756-8722-2-45.
34. Acharya, M.R.; Sparreboom, A.; Venitz, J.; Figg, W.D. Rational Development of Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Agents: A Review. *Mol Pharmacol* **2005**, *68*, 917–932, doi:10.1124/mol.105.014167.
35. Gniadecki, R.; Assaf, C.; Bagot, M.; Dummer, R.; Duvic, M.; Knobler, R.; Ranki, A.; Schwandt, P.; Whittaker, S. The Optimal Use of Bexarotene in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Br J Dermatol* **2007**, *157*, 433–440, doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07975.x.
36. Zain, J.; O'Connor, O. Pralatrexate: Basic Understanding and Clinical Development. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2010**, *11*, 1705–1714, doi:10.1517/14656566.2010.489552.
37. Zhao, M.; Vuori, K. The Docking Protein P130Cas Regulates Cell Sensitivity to Proteasome Inhibition. *BMC Biol* **2011**, *9*, 73, doi:10.1186/1741-7007-9-73.
38. Kisselev, A.F.; van der Linden, W.A.; Overkleeft, H.S. Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target. *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 99–115, doi:10.1016/j.chembiol.2012.01.003.
39. Schirrmacher, V. *Quo Vadis Cancer Therapy ? Fascinating Discoveries of the Last 60 Years*; 2017; ISBN 978-620-2-05545-1.
40. *Berne & Levy Physiology*; Koepfen, B.M., Stanton, B.A., Eds.; Seventh edition.; Elsevier: Philadelphia, PA, 2018; ISBN 978-0-323-39394-2.
41. Volker Schirrmacher From Chemotherapy to Biological Therapy: A Review of Novel Concepts to Reduce the Side Effects of Systemic Cancer Treatment (Review). *Int J Oncol* **2019**, *54*, 407–419.
42. Von Hoff, D.D.; Rozenzweig, M.; Piccart, M. The Cardiotoxicity of Anticancer Agents. *Semin Oncol* **1982**, *9*, 23–33.
43. Housman, G.; Byler, S.; Heerboth, S.; Lapinska, K.; Longacre, M.; Snyder, N.; Sarkar, S. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers* **2014**, *6*, 1769–1792, doi:10.3390/cancers6031769.
44. Friedman, R. Drug Resistance in Cancer: Molecular Evolution and Compensatory Proliferation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 11746–11755, doi:10.18632/oncotarget.7459.
45. Glen, C.D.; Dubrova, Y.E. Exposure to Anticancer Drugs Can Result in Transgenerational Genomic Instability in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 2984–2988, doi:10.1073/pnas.1119396109.
46. Michael, M.; Doherty, M.M. Tumoral Drug Metabolism: Overview and Its Implications for Cancer Therapy. *JCO* **2005**, *23*, 205–229, doi:10.1200/JCO.2005.02.120.
47. Nebert, D.W.; Plasteras, J.P.; Guengerich, F.P.; Marnett, L.J. Xenobiotic-Metabolizing Cytochromes P450 Convert Prostaglandin Endoperoxide to Hydroxyheptadecatrienoic Acid and the Mutagen, Malondialdehyde. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 11784–11790, doi:10.1074/jbc.275.16.11784.
48. Shen, H.; He, M.M.; Liu, H.; Wrighton, S.A.; Wang, L.; Guo, B.; Li, C. Comparative Metabolic Capabilities and Inhibitory Profiles of CYP2D6.1, CYP2D6.10, and CYP2D6.17. *Drug Metab Dispos* **2007**, *35*, 1292–1300, doi:10.1124/dmd.107.015354.

49. Manolitsas, T.; Englefield, P.; Eccles, D.; Campbell, I. No Association of a 306-Bp Insertion Polymorphism in the Progesterone Receptor Gene with Ovarian and Breast Cancer. *Br J Cancer* **1997**, *75*, 1398–1399, doi:10.1038/bjc.1997.238.
50. Holohan, C.; Van Schaeybroeck, S.; Longley, D.B.; Johnston, P.G. Cancer Drug Resistance: An Evolving Paradigm. *Nat Rev Cancer* **2013**, *13*, 714–726, doi:10.1038/nrc3599.
51. Gagnon, J.-F.; Bernard, O.; Villeneuve, L.; Têtu, B.; Guillemette, C. Irinotecan Inactivation Is Modulated by Epigenetic Silencing of *UGT1A1* in Colon Cancer. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 1850–1858, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2130.
52. Yu, H.A.; Arcila, M.E.; Rekhtman, N.; Sima, C.S.; Zakowski, M.F.; Pao, W.; Kris, M.G.; Miller, V.A.; Ladanyi, M.; Riely, G.J. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with *EGFR* -Mutant Lung Cancers. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 2240–2247, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
53. Gorre, M.E.; Mohammed, M.; Ellwood, K.; Hsu, N.; Paquette, R.; Rao, P.N.; Sawyers, C.L. Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by BCR-ABL Gene Mutation or Amplification. *Science* **2001**, *293*, 876–880, doi:10.1126/science.1062538.
54. Heinrich, M.C.; Corless, C.L.; Blanke, C.D.; Demetri, G.D.; Joensuu, H.; Roberts, P.J.; Eisenberg, B.L.; von Mehren, M.; Fletcher, C.D.M.; Sandau, K.; et al. Molecular Correlates of Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. *JCO* **2006**, *24*, 4764–4774, doi:10.1200/JCO.2006.06.2265.
55. Shou, J.; Massarweh, S.; Osborne, C.K.; Wakeling, A.E.; Ali, S.; Weiss, H.; Schiff, R. Mechanisms of Tamoxifen Resistance: Increased Estrogen Receptor-HER2/Neu Cross-Talk in ER/HER2-Positive Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **2004**, *96*, 926–935, doi:10.1093/jnci/djh166.
56. Stavrovskaya, A.A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Mosc)* **2000**, *65*, 95–106.
57. Hinds, M.; Deisseroth, K.; Mayes, J.; Altschuler, E.; Jansen, R.; Ledley, F.D.; Zwelling, L.A. Identification of a Point Mutation in the Topoisomerase II Gene from a Human Leukemia Cell Line Containing an Amsacrine-Resistant Form of Topoisomerase II. *Cancer Res* **1991**, *51*, 4729–4731.
58. Sherlach, K.S.; Roepe, P.D. Drug Resistance Associated Membrane Proteins. *Front Physiol* **2014**, *5*, 108, doi:10.3389/fphys.2014.00108.
59. Huang, Y. Pharmacogenetics/Genomics of Membrane Transporters in Cancer Chemotherapy. *Cancer Metastasis Rev* **2007**, *26*, 183–201, doi:10.1007/s10555-007-9050-6.
60. Dalton, W.S.; Grogan, T.M.; Meltzer, P.S.; Scheper, R.J.; Durie, B.G.; Taylor, C.W.; Miller, T.P.; Salmon, S.E. Drug-Resistance in Multiple Myeloma and Non-Hodgkin's Lymphoma: Detection of P-Glycoprotein and Potential Circumvention by Addition of Verapamil to Chemotherapy. *JCO* **1989**, *7*, 415–424, doi:10.1200/JCO.1989.7.4.415.
61. Miller, T.P.; Grogan, T.M.; Dalton, W.S.; Spier, C.M.; Scheper, R.J.; Salmon, S.E. P-Glycoprotein Expression in Malignant Lymphoma and Reversal of Clinical Drug Resistance with Chemotherapy plus High-Dose Verapamil. *JCO* **1991**, *9*, 17–24, doi:10.1200/JCO.1991.9.1.17.
62. Broxterman, H.J.; Schuurhuis, G.J. Transport Proteins in Drug Resistance: Detection and Prognostic Significance in Acute Myeloid Leukemia. *J Intern Med Suppl* **1997**, *740*, 147–151.

63. Shukla, S.; Chen, Z.-S.; Ambudkar, S.V. Tyrosine Kinase Inhibitors as Modulators of ABC Transporter-Mediated Drug Resistance. *Drug Resistance Updates* **2012**, *15*, 70–80, doi:10.1016/j.drug.2012.01.005.
64. Wang, D.; Lippard, S.J. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 307–320, doi:10.1038/nrd1691.
65. Ceppi, P.; Volante, M.; Novello, S.; Rapa, I.; Danenberg, K.D.; Danenberg, P.V.; Cambieri, A.; Selvaggi, G.; Saviozzi, S.; Calogero, R.; et al. ERCC1 and RRM1 Gene Expressions but Not EGFR Are Predictive of Shorter Survival in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated with Cisplatin and Gemcitabine. *Annals of Oncology* **2006**, *17*, 1818–1825, doi:10.1093/annonc/mdl300.
66. Siddik, Z.H. Cisplatin: Mode of Cytotoxic Action and Molecular Basis of Resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279, doi:10.1038/sj.onc.1206933.
67. Gerson, S.L. MGMT: Its Role in Cancer Aetiology and Cancer Therapeutics. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 296–307, doi:10.1038/nrc1319.
68. Clarke, A.R.; Purdie, C.A.; Harrison, D.J.; Morris, R.G.; Bird, C.C.; Hooper, M.L.; Wyllie, A.H. Thymocyte Apoptosis Induced by P53-Dependent and Independent Pathways. *Nature* **1993**, *362*, 849–852, doi:10.1038/362849a0.
69. Fan, S.; el-Deiry, W.S.; Bae, I.; Freeman, J.; Jondle, D.; Bhatia, K.; Fornace, A.J.; Magrath, I.; Kohn, K.W.; O'Connor, P.M. P53 Gene Mutations Are Associated with Decreased Sensitivity of Human Lymphoma Cells to DNA Damaging Agents. *Cancer Res* **1994**, *54*, 5824–5830.
70. Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Torre, E.; Calorini, L. Contribution of Acidic Melanoma Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition to Aggressiveness of Non-Acidic Melanoma Cells. *Clin Exp Metastasis* **2014**, *31*, 423–433, doi:10.1007/s10585-014-9637-6.
71. Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Andreucci, E.; Bianchini, F.; Margheri, F.; Laurenzana, A.; Fibbi, G.; Pimpinelli, N.; Calorini, L. Everolimus Selectively Targets Vemurafenib Resistant BRAFV600E Melanoma Cells Adapted to Low PH. *Cancer Lett.* **2017**, *408*, 43–54, doi:10.1016/j.canlet.2017.08.010.
72. Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; ICGC Breast Cancer Consortium; ICGC MML-Seq Consortium; ICGC PedBrain; Alexandrov, L.B.; Nik-Zainal, S.; Wedge, D.C.; Aparicio, S.A.J.R.; Behjati, S.; Biankin, A.V.; et al. Signatures of Mutational Processes in Human Cancer. *Nature* **2013**, *500*, 415–421, doi:10.1038/nature12477.
73. Ljungkvist, A.S.E.; Bussink, J.; Rijken, P.F.J.W.; Kaanders, J.H.A.M.; van der Kogel, A.J.; Denekamp, J. Vascular Architecture, Hypoxia, and Proliferation in First-Generation Xenografts of Human Head-and-Neck Squamous Cell Carcinomas. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* **2002**, *54*, 215–228, doi:10.1016/S0360-3016(02)02938-3.
74. Rice, G.C.; Hoy, C.; Schimke, R.T. Transient Hypoxia Enhances the Frequency of Dihydrofolate Reductase Gene Amplification in Chinese Hamster Ovary Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986**, *83*, 5978–5982, doi:10.1073/pnas.83.16.5978.
75. Raghunand, N.; He, X.; Sluis, R. van; Mahoney, B.; Baggett, B.; Taylor, C.W.; Paine-Murrieta, G.; Roe, D.; Bhujwalla, Z.M.; Gillies, R.J. Enhancement of Chemotherapy by Manipulation of Tumour PH. *Br J Cancer* **1999**, *80*, 1005–1011, doi:10.1038/sj.bjc.6690455.

76. Raghunand, N.; Mahoney, B.P.; Gillies, R.J. Tumor Acidity, Ion Trapping and Chemotherapeutics. *Biochemical Pharmacology* **2003**, *66*, 1219–1229, doi:10.1016/S0006-2952(03)00468-4.
77. Cowan, D.S.; Tannock, I.F. Factors That Influence the Penetration of Methotrexate through Solid Tissue. *Int J Cancer* **2001**, *91*, 120–125, doi:10.1002/1097-0215(20010101)91:1<120::aid-ijc1021>3.0.co;2-y.
78. Sharma, P.; Hu-Lieskovan, S.; Wargo, J.A.; Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* **2017**, *168*, 707–723, doi:10.1016/j.cell.2017.01.017.
79. Matej, D.; Fang, F.; Shen, C.; Schilder, J.; Arnold, A.; Zeng, Y.; Berry, W.A.; Huang, T.; Nephew, K.P. Epigenetic Resensitization to Platinum in Ovarian Cancer. *Cancer Res* **2012**, *72*, 2197–2205, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3909.
80. Balch, C.; Nephew, K.P. Epigenetic Targeting Therapies to Overcome Chemotherapy Resistance. In *Epigenetic Alterations in Oncogenesis*; Karpf, A.R., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer New York: New York, NY, 2013; Vol. 754, pp. 285–311 ISBN 978-1-4419-9966-5.
81. Wilting, R.H.; Dannenberg, J.-H. Epigenetic Mechanisms in Tumorigenesis, Tumor Cell Heterogeneity and Drug Resistance. *Drug Resistance Updates* **2012**, *15*, 21–38, doi:10.1016/j.drug.2012.01.008.
82. Deaton, A.M.; Bird, A. CpG Islands and the Regulation of Transcription. *Genes & Development* **2011**, *25*, 1010–1022, doi:10.1101/gad.2037511.
83. Zeller, C.; Dai, W.; Steele, N.L.; Siddiq, A.; Walley, A.J.; Wilhelm-Benartzi, C.S.M.; Rizzo, S.; van der Zee, A.; Plumb, J.A.; Brown, R. Candidate DNA Methylation Drivers of Acquired Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer Identified by Methylome and Expression Profiling. *Oncogene* **2012**, *31*, 4567–4576, doi:10.1038/onc.2011.611.
84. Nikolaou, M.; Pavlopoulou, A.; Georgakilas, A.G.; Kyrodimos, E. The Challenge of Drug Resistance in Cancer Treatment: A Current Overview. *Clin Exp Metastasis* **2018**, *35*, 309–318, doi:10.1007/s10585-018-9903-0.
85. Pierce, G.B.; Wallace, C. Differentiation of Malignant to Benign Cells. *Cancer Res* **1971**, *31*, 127–134.
86. Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, *414*, 105–111, doi:10.1038/35102167.
87. Blagosklonny, M.V. Target for Cancer Therapy: Proliferating Cells or Stem Cells. *Leukemia* **2006**, *20*, 385–391, doi:10.1038/sj.leu.2404075.
88. Li, L.; Neaves, W.B. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche Matters. *Cancer Res* **2006**, *66*, 4553–4557, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3986.
89. Lou, H.; Dean, M. Targeted Therapy for Cancer Stem Cells: The Patched Pathway and ABC Transporters. *Oncogene* **2007**, *26*, 1357–1360, doi:10.1038/sj.onc.1210200.
90. Gil, J.; Stembalska, A.; Pesz, K.A.; Sasiadek, M.M. Cancer Stem Cells: The Theory and Perspectives in Cancer Therapy. *J Appl Genet* **2008**, *49*, 193–199, doi:10.1007/BF03195612.

91. Kreso, A.; Dick, J.E. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 275–291, doi:10.1016/j.stem.2014.02.006.
92. Clevers, H. The Cancer Stem Cell: Premises, Promises and Challenges. *Nat Med* **2011**, *17*, 313–319, doi:10.1038/nm.2304.
93. Citron, M.L.; Berry, D.A.; Cirincione, C.; Hudis, C.; Winer, E.P.; Gradishar, W.J.; Davidson, N.E.; Martino, S.; Livingston, R.; Ingle, J.N.; et al. Randomized Trial of Dose-Dense Versus Conventionally Scheduled and Sequential Versus Concurrent Combination Chemotherapy as Postoperative Adjuvant Treatment of Node-Positive Primary Breast Cancer: First Report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *JCO* **2003**, *21*, 1431–1439, doi:10.1200/JCO.2003.09.081.
94. Sternberg, C.N.; de Mulder, P.H.M.; Schornagel, J.H.; Théodore, C.; Fossa, S.D.; van Oosterom, A.T.; Witjes, F.; Spina, M.; van Groeningen, C.J.; de Balincourt, C.; et al. Randomized Phase III Trial of High-Dose-Intensity Methotrexate, Vinblastine, Doxorubicin, and Cisplatin (MVAC) Chemotherapy and Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Versus Classic MVAC in Advanced Urothelial Tract Tumors: European Organization for Research and Treatment of Cancer Protocol No. 30924. *JCO* **2001**, *19*, 2638–2646, doi:10.1200/JCO.2001.19.10.2638.
95. Carlson, R.W.; Sikic, B.I. Continuous Infusion or Bolus Injection in Cancer Chemotherapy. *Ann Intern Med* **1983**, *99*, 823–833, doi:10.7326/0003-4819-99-6-823.
96. Kalra, E.K. Nutraceutical-Definition and Introduction. *AAPS PharmSci* **2003**, *5*, 27–28, doi:10.1208/ps050325.
97. Ruchi, S. Role of Nutraceuticals in Health Care: A Review. *International Journal of Green Pharmacy* **2017**, *11*.
98. Sauer, S.; Plauth, A. Health-Beneficial Nutraceuticals—Myth or Reality? *Appl Microbiol Biotechnol* **2017**, *101*, 951–961, doi:10.1007/s00253-016-8068-5.
99. Zhao, J. Nutraceuticals, Nutritional Therapy, Phytonutrients, and Phytotherapy for Improvement of Human Health: A Perspective on Plant Biotechnology Application. *BIOT* **2007**, *1*, 75–97, doi:10.2174/187220807779813893.
100. Grosso, G.; Godos, J.; Lamuela-Raventos, R.; Ray, S.; Micek, A.; Pajak, A.; Sciacca, S.; D’Orazio, N.; Del Rio, D.; Galvano, F. A Comprehensive Meta-Analysis on Dietary Flavonoid and Lignan Intake and Cancer Risk: Level of Evidence and Limitations. *Molecular Nutrition & Food Research* **2017**, *61*, 1600930, doi:10.1002/mnfr.201600930.
101. Grosso, G.; Micek, A.; Godos, J.; Pajak, A.; Sciacca, S.; Galvano, F.; Giovannucci, E.L. Dietary Flavonoid and Lignan Intake and Mortality in Prospective Cohort Studies: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *American Journal of Epidemiology* **2017**, *185*, 1304–1316, doi:10.1093/aje/kww207.
102. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*; Aparicio, R., Harwood, J.L., Eds.; Second edition.; Springer: New York, 2013; ISBN 978-1-4614-7776-1.
103. Servili, M.; Sordini, B.; Esposito, S.; Urbani, S.; Veneziani, G.; Di Maio, I.; Selvaggini, R.; Taticchi, A. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants* **2013**, *3*, 1–23, doi:10.3390/antiox3010001.

104. Waterman, E.; Lockwood, B. Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. *Altern Med Rev* **2007**, *12*, 331–342.
105. Casaburi, I.; Puoci, F.; Chimento, A.; Sirianni, R.; Ruggiero, C.; Avena, P.; Pezzi, V. Potential of Olive Oil Phenols as Chemopreventive and Therapeutic Agents against Cancer: A Review of in Vitro Studies. *Molecular Nutrition & Food Research* **2013**, *57*, 71–83, doi:10.1002/mnfr.201200503.
106. Visioli, F.; Poli, A.; Gall, C. Antioxidant and Other Biological Activities of Phenols from Olives and Olive Oil. *Med Res Rev* **2002**, *22*, 65–75, doi:10.1002/med.1028.
107. Boss, A.; Bishop, K.; Marlow, G.; Barnett, M.; Ferguson, L. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients* **2016**, *8*, 513, doi:10.3390/nu8080513.
108. Le Tutour, B.; Guedon, D. Antioxidative Activities of *Olea Europaea* Leaves and Related Phenolic Compounds. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1173–1178, doi:10.1016/0031-9422(92)80255-D.
109. Omar, S.H. Cardioprotective and Neuroprotective Roles of Oleuropein in Olive. *Saudi Pharmaceutical Journal* **2010**, *18*, 111–121, doi:10.1016/j.jsps.2010.05.005.
110. Nediani, C.; Ruzzolini, J.; Romani, A.; Calorini, L. Oleuropein, a Bioactive Compound from *Olea Europaea* L., as a Potential Preventive and Therapeutic Agent in Non-Communicable Diseases. *Antioxidants* **2019**, *8*.
111. Romani, A.; Mulas, S.; Heimler, D. Polyphenols and Secoiridoids in Raw Material (*Olea Europaea* L. Leaves) and Commercial Food Supplements. *European Food Research and Technology* **2017**, *243*, 429–435, doi:10.1007/s00217-016-2756-3.
112. Visioli, F.; Galli, C. Oleuropein Protects Low Density Lipoprotein from Oxidation. *Life Sciences* **1994**, *55*, 1965–1971, doi:10.1016/0024-3205(94)00529-X.
113. Visioli, F.; Bellomo, G.; Montedoro, G.; Galli, C. Low Density Lipoprotein Oxidation Is Inhibited in Vitro by Olive Oil Constituents. *Atherosclerosis* **1995**, *117*, 25–32, doi:10.1016/0021-9150(95)05546-9.
114. Visioli, F.; Bellomo, G.; Galli, C. Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, *247*, 60–64, doi:10.1006/bbrc.1998.8735.
115. de la Puerta, R.; Domínguez, M.E.M.; Ruíz-Gutiérrez, V.; Flavill, J.A.; Hoult, J.R.S. Effects of Virgin Olive Oil Phenolics on Scavenging of Reactive Nitrogen Species and upon Nitrergic Neurotransmission. *Life Sciences* **2001**, *69*, 1213–1222, doi:10.1016/S0024-3205(01)01218-8.
116. Coni, E.; Di Benedetto, R.; Di Pasquale, M.; Masella, R.; Modesti, D.; Mattei, R.; Carlini, E.A. Protective Effect of Oleuropein, an Olive Oil Biophenol, on Low Density Lipoprotein Oxidizability in Rabbits. *Lipids* **2000**, *35*, 45–54, doi:10.1007/s11745-000-0493-2.
117. Manna, C.; Migliardi, V.; Golino, P.; Scognamiglio, A.; Galletti, P.; Chiariello, M.; Zappia, V. Oleuropein Prevents Oxidative Myocardial Injury Induced by Ischemia and Reperfusion. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2004**, *15*, 461–466, doi:10.1016/j.jnutbio.2003.12.010.
118. Parzonko, A.; Czerwińska, M.E.; Kiss, A.K.; Naruszewicz, M. Oleuropein and Oleacein May Restore Biological Functions of Endothelial Progenitor Cells Impaired by Angiotensin II via Activation of Nrf2/Heme Oxygenase-1 Pathway. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 1088–1094, doi:10.1016/j.phymed.2013.05.002.

119. Al-Azzawie, H.F.; Alhmdani, M.-S.S. Hypoglycemic and Antioxidant Effect of Oleuropein in Alloxan-Diabetic Rabbits. *Life Sci.* **2006**, *78*, 1371–1377, doi:10.1016/j.lfs.2005.07.029.
120. Kotyzová, D.; Hodková, A.; Eybl, V. The Effect of Olive Oil Phenolics – Hydroxytyrosol and Oleuropein on Antioxidant Defence Status in Acute Arsenic Exposed Rats. *Toxicology Letters* **2011**, *205*, S222, doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.761.
121. Jemai, H.; El Feki, A.; Sayadi, S. Antidiabetic and Antioxidant Effects of Hydroxytyrosol and Oleuropein from Olive Leaves in Alloxan-Diabetic Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 8798–8804, doi:10.1021/jf901280r.
122. Dessì, M.; Noce, A.; Agnoli, A.; De Angelis, S.; Fuiano, L.; Tozzo, C.; Taccone-Gallucci, M.; Fuiano, G.; Federici, G. The Usefulness of the Prognostic Inflammatory and Nutritional Index (PINI) in a Haemodialysis Population. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **2009**, *19*, 811–815, doi:10.1016/j.numecd.2009.01.009.
123. Giamarellos-Bourboulis, E.J.; Geladopoulos, T.; Chrisofos, M.; Koutoukas, P.; Vassiliadis, J.; Alexandrou, I.; Tsaganos, T.; Sabracos, L.; Karagianni, V.; Pelekanou, E.; et al. OLEUROPEIN: A NOVEL IMMUNOMODULATOR CONFERRING PROLONGED SURVIVAL IN EXPERIMENTAL SEPSIS BY PSEUDOMONAS AERUGINOSA. *Shock* **2006**, *26*, 410–416, doi:10.1097/01.shk.0000226342.70904.06.
124. Impellizzeri, D.; Esposito, E.; Mazzon, E.; Paterniti, I.; Di Paola, R.; Bramanti, P.; Morittu, V.M.; Procopio, A.; Britti, D.; Cuzzocrea, S. The Effects of Oleuropein Aglycone, an Olive Oil Compound, in a Mouse Model of Carrageenan-Induced Pleurisy. *Clinical Nutrition* **2011**, *30*, 533–540, doi:10.1016/j.clnu.2011.02.004.
125. Lavandro, S.; Chiong, M.; Rothermel, B.A.; Hill, J.A. Autophagy in Cardiovascular Biology. *Journal of Clinical Investigation* **2015**, *125*, 55–64, doi:10.1172/JCI73943.
126. de la Puerta, R.; Gutierrez, V.R.; Hoult, J.R.S. Inhibition of Leukocyte 5-Lipoxygenase by Phenolics from Virgin Olive Oil. *Biochemical Pharmacology* **1999**, *57*, 445–449, doi:10.1016/S0006-2952(98)00320-7.
127. Miles, E.A.; Zoubouli, P.; Calder, P.C. Differential Anti-Inflammatory Effects of Phenolic Compounds from Extra Virgin Olive Oil Identified in Human Whole Blood Cultures. *Nutrition* **2005**, *21*, 389–394, doi:10.1016/j.nut.2004.06.031.
128. Ryu, S.-J.; Choi, H.-S.; Yoon, K.-Y.; Lee, O.-H.; Kim, K.-J.; Lee, B.-Y. Oleuropein Suppresses LPS-Induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cell and Zebrafish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 2098–2105, doi:10.1021/jf505894b.
129. Margheri, F.; Menicacci, B.; Laurenzana, A.; Del Rosso, M.; Fibbi, G.; Cipolleschi, M.G.; Ruzzolini, J.; Nediani, C.; Mocali, A.; Giovannelli, L. Oleuropein Aglycone Attenuates the Pro-Angiogenic Phenotype of Senescent Fibroblasts: A Functional Study in Endothelial Cells. *Journal of Functional Foods* **2019**, *53*, 219–226, doi:10.1016/j.jff.2018.12.026.
130. Giner, E.; Recio, M.-C.; Ríos, J.-L.; Giner, R.-M. Oleuropein Protects against Dextran Sodium Sulfate-Induced Chronic Colitis in Mice. *Journal of Natural Products* **2013**, *76*, 1113–1120, doi:10.1021/np400175b.

131. Lee, B.; Shim, I.; Lee, H.; Hahm, D.-H. Effect of Oleuropein on Cognitive Deficits and Changes in Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor and Cytokine Expression in a Rat Model of Post-Traumatic Stress Disorder. *Journal of Natural Medicines* **2018**, *72*, 44–56, doi:10.1007/s11418-017-1103-8.
132. Khalatbary, A.; Zarrinjoei, G. Anti-Inflammatory Effect of Oleuropein in Experimental Rat Spinal Cord Trauma. *Iranian Red Crescent Medical Journal* **2012**, *14*, 229–234.
133. Puel, C.; Mathey, J.; Agalias, A.; Kati-coulibaly, S.; Mardon, J.; Obled, C.; Davicco, M.-J.; Lebecque, P.; Horcajada, M.-N.; Skaltsounis, A.L.; et al. Dose–Response Study of Effect of Oleuropein, an Olive Oil Polyphenol, in an Ovariectomy/Inflammation Experimental Model of Bone Loss in the Rat. *Clinical Nutrition* **2006**, *25*, 859–868, doi:10.1016/j.clnu.2006.03.009.
134. Larussa, T.; Oliverio, M.; Suraci, E.; Greco, M.; Placida, R.; Gervasi, S.; Marasco, R.; Imeneo, M.; Paolino, D.; Tucci, L.; et al. Oleuropein Decreases Cyclooxygenase-2 and Interleukin-17 Expression and Attenuates Inflammatory Damage in Colonic Samples from Ulcerative Colitis Patients. *Nutrients* **2017**, *9*, 391, doi:10.3390/nu9040391.
135. Park, S.; Choi, Y.; Um, S.-J.; Yoon, S.K.; Park, T. Oleuropein Attenuates Hepatic Steatosis Induced by High-Fat Diet in Mice. *Journal of Hepatology* **2011**, *54*, 984–993, doi:10.1016/j.jhep.2010.08.019.
136. Poudyal, H.; Campbell, F.; Brown, L. Olive Leaf Extract Attenuates Cardiac, Hepatic, and Metabolic Changes in High Carbohydrate–, High Fat–Fed Rats. *The Journal of Nutrition* **2010**, *140*, 946–953, doi:10.3945/jn.109.117812.
137. Murotomi, K.; Umeno, A.; Yasunaga, M.; Shichiri, M.; Ishida, N.; Koike, T.; Matsuo, T.; Abe, H.; Yoshida, Y.; Nakajima, Y. Oleuropein-Rich Diet Attenuates Hyperglycemia and Impaired Glucose Tolerance in Type 2 Diabetes Model Mouse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 6715–6722, doi:10.1021/acs.jafc.5b00556.
138. Lockyer, S.; Rowland, I.; Spencer, J.P.E.; Yaqoob, P.; Stonehouse, W. Impact of Phenolic-Rich Olive Leaf Extract on Blood Pressure, Plasma Lipids and Inflammatory Markers: A Randomised Controlled Trial. *European Journal of Nutrition* **2017**, *56*, 1421–1432, doi:10.1007/s00394-016-1188-y.
139. Susalit, E.; Agus, N.; Effendi, I.; Tjandrawinata, R.R.; Nofiarny, D.; Perrinjaquet-Moccetti, T.; Verbruggen, M. Olive (*Olea Europaea*) Leaf Extract Effective in Patients with Stage-1 Hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 251–258, doi:10.1016/j.phymed.2010.08.016.
140. Rigacci, S.; Guidotti, V.; Bucciattini, M.; Parri, M.; Nediani, C.; Cerbai, E.; Stefani, M.; Berti, A. Oleuropein Aglycon Prevents Cytotoxic Amyloid Aggregation of Human Amylin☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2010**, *21*, 726–735, doi:10.1016/j.jnutbio.2009.04.010.
141. Eidi, A.; Eidi, M.; Darzi, R. Antidiabetic Effect of *Olea Europaea* L. in Normal and Diabetic Rats. *Phytotherapy Research* **2009**, *23*, 347–350, doi:10.1002/ptr.2629.
142. Hadrich, F.; Garcia, M.; Maalej, A.; Moldes, M.; Isoda, H.; Feve, B.; Sayadi, S. Oleuropein Activated AMPK and Induced Insulin Sensitivity in C2C12 Muscle Cells. *Life Sciences* **2016**, *151*, 167–173, doi:10.1016/j.lfs.2016.02.027.
143. Carnevale, R.; Silvestri, R.; Loffredo, L.; Novo, M.; Cammisotto, V.; Castellani, V.; Bartimoccia, S.; Nocella, C.; Violi, F. Oleuropein, a Component of Extra Virgin Olive Oil, Lowers Postprandial Glycaemia in

Healthy Subjects: Oleuropein Lowers Postprandial Glycaemia in Healthy Subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology* **2018**, *84*, 1566–1574, doi:10.1111/bcp.13589.

144. de Bock, M.; Derraik, J.G.B.; Brennan, C.M.; Biggs, J.B.; Morgan, P.E.; Hodgkinson, S.C.; Hofman, P.L.; Cutfield, W.S. Olive (*Olea Europaea* L.) Leaf Polyphenols Improve Insulin Sensitivity in Middle-Aged Overweight Men: A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57622, doi:10.1371/journal.pone.0057622.

145. Wainstein, J.; Ganz, T.; Boaz, M.; Bar Dayan, Y.; Dolev, E.; Kerem, Z.; Madar, Z. Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats. *Journal of Medicinal Food* **2012**, *15*, 605–610, doi:10.1089/jmf.2011.0243.

146. Alkhateeb, H.; Al-Duais, M.; Qnais, E. Beneficial Effects of Oleuropein on Glucose Uptake and on Parameters Relevant to the Normal Homeostatic Mechanisms of Glucose Regulation in Rat Skeletal Muscle. *Phytotherapy Research* **2018**, *32*, 651–656, doi:10.1002/ptr.6012.

147. Andreadou, I.; Iliodromitis, E.K.; Mikros, E.; Constantinou, M.; Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Kamber, E.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Kremastinos, D.T. The Olive Constituent Oleuropein Exhibits Anti-Ischemic, Antioxidative, and Hypolipidemic Effects in Anesthetized Rabbits. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 2213–2219, doi:10.1093/jn/136.8.2213.

148. Hur, W.; Kim, S.W.; Lee, Y.K.; Choi, J.E.; Hong, S.W.; Song, M.J.; Bae, S.H.; Park, T.; Um, S.-J.; Yoon, S.K. Oleuropein Reduces Free Fatty Acid-Induced Lipogenesis via Lowered Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Hepatocytes. *Nutrition Research* **2012**, *32*, 778–786, doi:10.1016/j.nutres.2012.06.017.

149. Domitrović, R.; Jakovac, H.; Marchesi, V.V.; Šain, I.; Romić, Ž.; Rahelić, D. Preventive and Therapeutic Effects of Oleuropein against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage in Mice. *Pharmacological Research* **2012**, *65*, 451–464, doi:10.1016/j.phrs.2011.12.005.

150. Kim, S.W.; Hur, W.; Li, T.Z.; Lee, Y.K.; Choi, J.E.; Hong, S.W.; Lyoo, K.-S.; You, C.R.; Jung, E.S.; Jung, C.K.; et al. Oleuropein Prevents the Progression of Steatohepatitis to Hepatic Fibrosis Induced by a High-Fat Diet in Mice. *Experimental & Molecular Medicine* **2014**, *46*, e92–e92, doi:10.1038/emm.2014.10.

151. Stefani, M.; Rigacci, S. Beneficial Properties of Natural Phenols: Highlight on Protection against Pathological Conditions Associated with Amyloid Aggregation: Phenols Protection Against Amyloid Diseases. *BioFactors* **2014**, *40*, 482–493, doi:10.1002/biof.1171.

152. Peña-Oyazun, D.; Bravo-Sagua, R.; Diaz-Vega, A.; Aleman, L.; Chiong, M.; Garcia, L.; Bambs, C.; Troncoso, R.; Cifuentes, M.; Morselli, E.; et al. Autophagy and Oxidative Stress in Non-Communicable Diseases: A Matter of the Inflammatory State? *Free Radical Biology and Medicine* **2018**, *124*, 61–78, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.084.

153. Miceli, C.; Santin, Y.; Manzella, N.; Coppini, R.; Berti, A.; Stefani, M.; Parini, A.; Mialet-Perez, J.; Nediani, C. Oleuropein Aglycone Protects against MAO-A-Induced Autophagy Impairment and Cardiomyocyte Death through Activation of TFEB. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, *2018*, 8067592, doi:10.1155/2018/8067592.

154. Grossi, C.; Rigacci, S.; Ambrosini, S.; Ed Dami, T.; Luccarini, I.; Traini, C.; Failli, P.; Berti, A.; Casamenti, F.; Stefani, M. The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects TgCRND8 Mice against A β Plaque Pathology. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71702, doi:10.1371/journal.pone.0071702.

155. Luccarini, I.; Pantano, D.; Nardiello, P.; Cavone, L.; Lapucci, A.; Miceli, C.; Nediani, C.; Berti, A.; Stefani, M.; Casamenti, F. The Polyphenol Oleuropein Aglycone Modulates the PARP1-SIRT1 Interplay: An In Vitro and In Vivo Study. *J. Alzheimers Dis.* **2016**, *54*, 737–750, doi:10.3233/JAD-160471.
156. Porcu, C.; Sideri, S.; Martini, M.; Cocomazzi, A.; Galli, A.; Tarantino, G.; Balsano, C. Oleuropein Induces AMPK-Dependent Autophagy in NAFLD Mice, Regardless of the Gender. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 3948, doi:10.3390/ijms19123948.
157. Fang, L.; Li, B.; Guan, J.; Xu, H.; Shen, G.; Gao, Q.; Qin, Z. Transcription Factor EB Is Involved in Autophagy-Mediated Chemoresistance to Doxorubicin in Human Cancer Cells. *Acta Pharmacol Sin* **2017**, *38*, 1305–1316, doi:10.1038/aps.2017.25.
158. Lu, H.-Y.; Zhu, J.-S.; Zhang, Z.; Shen, W.-J.; Jiang, S.; Long, Y.-F.; Wu, B.; Ding, T.; Huan, F.; Wang, S.-L. Hydroxytyrosol and Oleuropein Inhibit Migration and Invasion of MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cell via Induction of Autophagy. *ACAMC* **2019**, *19*, doi:10.2174/1871520619666190722101207.
159. Papachristodoulou, A.; Tsoukala, M.; Benaki, D.; Kostidis, S.; Gioti, K.; Aligiannis, N.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Skaltsounis, A.-L.; Mikros, E.; et al. Oleuropein Is a Powerful Sensitizer of Doxorubicin-Mediated Killing of Prostate Cancer Cells and Exerts Its Action via Induction of Autophagy. *Journal of Cancer Research and Treatment* **2018**, *4*, 61–68, doi:10.12691/jcrt-4-4-2.
160. Rigacci, S.; Guidotti, V.; Bucciantini, M.; Nichino, D.; Relini, A.; Berti, A.; Stefani, M. A β (1-42) Aggregates into Non-Toxic Amyloid Assemblies in the Presence of the Natural Polyphenol Oleuropein Aglycon. *Curr Alzheimer Res* **2011**, *8*, 841–852.
161. Palazzi, L.; Bruzzone, E.; Bisello, G.; Leri, M.; Stefani, M.; Bucciantini, M.; Polverino de Laureto, P. Oleuropein Aglycone Stabilizes the Monomeric α -Synuclein and Favours the Growth of Non-Toxic Aggregates. *Scientific Reports* **2018**, *8*, doi:10.1038/s41598-018-26645-5.
162. Mohammad-Beigi, H.; Aliakbari, F.; Sahin, C.; Lomax, C.; Tawfike, A.; Schafer, N.P.; Amiri-Nowdijeh, A.; Eskandari, H.; Møller, I.M.; Hosseini-Mazinani, M.; et al. Oleuropein Derivatives from Olive Fruit Extracts Reduce α -Synuclein Fibrillation and Oligomer Toxicity. *Journal of Biological Chemistry* **2019**, *294*, 4215–4232, doi:10.1074/jbc.RA118.005723.
163. Diomede, L.; Rigacci, S.; Romeo, M.; Stefani, M.; Salmona, M. Oleuropein Aglycone Protects Transgenic C. Elegans Strains Expressing A β 42 by Reducing Plaque Load and Motor Deficit. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58893, doi:10.1371/journal.pone.0058893.
164. Luccarini, I.; Ed Dami, T.; Grossi, C.; Rigacci, S.; Stefani, M.; Casamenti, F. Oleuropein Aglycone Counteracts A β 42 Toxicity in the Rat Brain. *Neuroscience Letters* **2014**, *558*, 67–72, doi:10.1016/j.neulet.2013.10.062.
165. Leri, M.; Nosi, D.; Natalello, A.; Porcari, R.; Ramazzotti, M.; Chiti, F.; Bellotti, V.; Doglia, S.M.; Stefani, M.; Bucciantini, M. The Polyphenol Oleuropein Aglycone Hinders the Growth of Toxic Transthyretin Amyloid Assemblies. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2016**, *30*, 153–166, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.12.009.
166. Leri, M.; Oropesa-Nuñez, R.; Canale, C.; Raimondi, S.; Giorgetti, S.; Bruzzone, E.; Bellotti, V.; Stefani, M.; Bucciantini, M. Oleuropein Aglycone: A Polyphenol with Different Targets against Amyloid

- Toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2018**, *1862*, 1432–1442, doi:10.1016/j.bbagen.2018.03.023.
167. Shamshoum, H.; Vlaveciski, F.; Tsiani, E. Anticancer Effects of Oleuropein. *Biofactors* **2017**, *43*, 517–528, doi:10.1002/biof.1366.
168. Han, J.; Talorete, T.P.N.; Yamada, P.; Isoda, H. Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Oleuropein and Hydroxytyrosol on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Cytotechnology* **2009**, *59*, 45–53, doi:10.1007/s10616-009-9191-2.
169. Liu, L.; Ahn, K.S.; Shanmugam, M.K.; Wang, H.; Shen, H.; Arfuso, F.; Chinnathambi, A.; Alharbi, S.A.; Chang, Y.; Sethi, G.; et al. Oleuropein Induces Apoptosis via Abrogating NF- κ B Activation Cascade in Estrogen Receptor–Negative Breast Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **2019**, *120*, 4504–4513, doi:10.1002/jcb.27738.
170. Sirianni, R.; Chimento, A.; De Luca, A.; Casaburi, I.; Rizza, P.; Onofrio, A.; Iacopetta, D.; Puoci, F.; Andò, S.; Maggiolini, M.; et al. Oleuropein and Hydroxytyrosol Inhibit MCF-7 Breast Cancer Cell Proliferation Interfering with ERK1/2 Activation. *Mol Nutr Food Res* **2010**, *54*, 833–840, doi:10.1002/mnfr.200900111.
171. Przychodzen, P.; Kuban-Jankowska, A.; Wyszowska, R.; Barone, G.; Bosco, G.L.; Celso, F.L.; Kamm, A.; Daca, A.; Kostrzewa, T.; Gorska-Ponikowska, M. PTP1B Phosphatase as a Novel Target of Oleuropein Activity in MCF-7 Breast Cancer Model. *Toxicology in Vitro* **2019**, *61*, 104624, doi:10.1016/j.tiv.2019.104624.
172. Abtin, M.; Alivand, M.R.; Khaniani, M.S.; Bastami, M.; Zaeifizadeh, M.; Derakhshan, S.M. Simultaneous Downregulation of MiR-21 and MiR-155 through Oleuropein for Breast Cancer Prevention and Therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* **2018**, *119*, 7151–7165, doi:10.1002/jcb.26754.
173. Asgharzade, S.; Sheikhshabani, S.H.; Ghasempour, E.; Heidari, R.; Rahmati, S.; Mohammadi, M.; Jazaeri, A.; Amini-Farsani, Z. The Effect of Oleuropein on Apoptotic Pathway Regulators in Breast Cancer Cells. *European Journal of Pharmacology* **2020**, *886*, 173509, doi:10.1016/j.ejphar.2020.173509.
174. Hassan, Z.K.; Elamin, M.H.; Daghestani, M.H.; Omer, S.A.; Al-Olayan, E.M.; Elobeid, M.A.; Virk, P.; Mohammed, O.B. Oleuropein Induces Anti-Metastatic Effects in Breast Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 4555–4559, doi:10.7314/apjcp.2012.13.9.4555.
175. Menendez Analyzing Effects of Extra-Virgin Olive Oil Polyphenols on Breast Cancer-Associated Fatty Acid Synthase Protein Expression Using Reverse-Phase Protein Microarrays. *Int J Mol Med* **1998**, *22*, doi:10.3892/ijmm_00000039.
176. Notarnicola, M.; Pisanti, S.; Tutino, V.; Bocale, D.; Rotelli, M.T.; Gentile, A.; Memeo, V.; Bifulco, M.; Perri, E.; Caruso, M.G. Effects of Olive Oil Polyphenols on Fatty Acid Synthase Gene Expression and Activity in Human Colorectal Cancer Cells. *Genes Nutr* **2011**, *6*, 63–69, doi:10.1007/s12263-010-0177-7.
177. Cárdeno, A.; Sánchez-Hidalgo, M.; Rosillo, M.A.; de la Lastra, C.A. Oleuropein, a Secoiridoid Derived from Olive Tree, Inhibits the Proliferation of Human Colorectal Cancer Cell Through Downregulation of HIF-1 α . *Nutrition and Cancer* **2013**, *65*, 147–156, doi:10.1080/01635581.2013.741758.

178. Sepporta, M.V.; Fuccelli, R.; Rosignoli, P.; Ricci, G.; Servili, M.; Fabiani, R. Oleuropein Prevents Azoxymethane-Induced Colon Crypt Dysplasia and Leukocytes DNA Damage in A/J Mice. *Journal of Medicinal Food* **2016**, *19*, 983–989, doi:10.1089/jmf.2016.0026.
179. Giner, E.; Recio, M.C.; Ríos, J.L.; Cerdá-Nicolás, J.M.; Giner, R.M. Chemopreventive Effect of Oleuropein in Colitis-Associated Colorectal Cancer in C57bl/6 Mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 242–255, doi:10.1002/mnfr.201500605.
180. Yan, C.-M.; Chai, E.-Q.; Cai, H.-Y.; Miao, G.-Y.; Ma, W. Oleuropein Induces Apoptosis via Activation of Caspases and Suppression of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway in HepG2 Human Hepatoma Cell Line. *Molecular Medicine Reports* **2015**, *11*, 4617–4624, doi:10.3892/mmr.2015.3266.
181. Wang, W.; Wu, J.; Zhang, Q.; Li, X.; Zhu, X.; Wang, Q.; Cao, S.; Du, L. Mitochondria-mediated Apoptosis Was Induced by Oleuropein in H1299 Cells Involving Activation of P38 MAP Kinase. *J Cell Biochem* **2019**, *120*, 5480–5494, doi:10.1002/jcb.27827.
182. Vanella, L. Antiproliferative Effect of Oleuropein in Prostate Cell Lines. *International Journal of Oncology* **2012**, doi:10.3892/ijo.2012.1428.
183. Aktas, H.G.; Ayan, H. Oleuropein: A Potential Inhibitor for Prostate Cancer Cell Motility by Blocking Voltage-Gated Sodium Channels. *Nutrition and Cancer* **2020**, 1–10, doi:10.1080/01635581.2020.1807575.
184. Goldsmith, C.; Vuong, Q.; Sadeqzadeh, E.; Stathopoulos, C.; Roach, P.; Scarlett, C. Phytochemical Properties and Anti-Proliferative Activity of *Olea Europaea* L. Leaf Extracts against Pancreatic Cancer Cells. *Molecules* **2015**, *20*, 12992–13004, doi:10.3390/molecules200712992.
185. Goldsmith, C.; Bond, D.; Jankowski, H.; Weidenhofer, J.; Stathopoulos, C.; Roach, P.; Scarlett, C. The Olive Biophenols Oleuropein and Hydroxytyrosol Selectively Reduce Proliferation, Influence the Cell Cycle, and Induce Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 1937, doi:10.3390/ijms19071937.
186. Bulotta, S.; Corradino, R.; Celano, M.; Maiuolo, J.; D’Agostino, M.; Oliverio, M.; Procopio, A.; Filetti, S.; Russo, D. Antioxidant and Antigrowth Action of Peracetylated Oleuropein in Thyroid Cancer Cells. *J Mol Endocrinol* **2013**, *51*, 181–189, doi:10.1530/JME-12-0241.
187. Anter, J.; Fernández-Bedmar, Z.; Villatoro-Pulido, M.; Demyda-Peyras, S.; Moreno-Millán, M.; Alonso-Moraga, Á.; Muñoz-Serrano, A.; Luque de Castro, M.D. A Pilot Study on the DNA-Protective, Cytotoxic, and Apoptosis-Inducing Properties of Olive-Leaf Extracts. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **2011**, *723*, 165–170, doi:10.1016/j.mrgentox.2011.05.005.
188. Samet, I.; Han, J.; Jlaiel, L.; Sayadi, S.; Isoda, H. Olive (*Olea Europaea*) Leaf Extract Induces Apoptosis and Monocyte/Macrophage Differentiation in Human Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells: Insight into the Underlying Mechanism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**, *2014*, 1–16, doi:10.1155/2014/927619.
189. Rigacci, S.; Miceli, C.; Nediani, C.; Berti, A.; Cascella, R.; Pantano, D.; Nardiello, P.; Luccarini, I.; Casamenti, F.; Stefani, M. Oleuropein Aglycone Induces Autophagy via the AMPK/MTOR Signalling Pathway: A Mechanistic Insight. *Oncotarget* **2015**, *6*, 35344–35357, doi:10.18632/oncotarget.6119.

190. Seçme, M.; Eroğlu, C.; Dodurga, Y.; Bağcı, G. Investigation of Anticancer Mechanism of Oleuropein via Cell Cycle and Apoptotic Pathways in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Gene* **2016**, *585*, 93–99, doi:10.1016/j.gene.2016.03.038.
191. Marchetti, C.; Clericuzio, M.; Borghesi, B.; Cornara, L.; Ribulla, S.; Gosetti, F.; Marengo, E.; Burlando, B. Oleuropein-Enriched Olive Leaf Extract Affects Calcium Dynamics and Impairs Viability of Malignant Mesothelioma Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2015**, *2015*, 1–9, doi:10.1155/2015/908493.
192. Tezcan, G.; Tunca, B.; Bekar, A.; Budak, F.; Sahin, S.; Cecener, G.; Egeli, U.; Taskapilioglu, M.O.; Kocaeli, H.; Tolunay, S.; et al. Olea Europaea Leaf Extract Improves the Treatment Response of GBM Stem Cells by Modulating MiRNA Expression. *Am J Cancer Res* **2014**, *4*, 572–590.
193. Momtaz, S.; Niaz, K.; Maqbool, F.; Abdollahi, M.; Rastrelli, L.; Nabavi, S.M. STAT3 Targeting by Polyphenols: Novel Therapeutic Strategy for Melanoma: STAT3 Targeting by Polyphenols. *BioFactors* **2017**, *43*, 347–370, doi:10.1002/biof.1345.
194. Song, H.; Lim, D.Y.; Jung, J.I.; Cho, H.J.; Park, S.Y.; Kwon, G.T.; Kang, Y.-H.; Lee, K.W.; Choi, M.-S.; Park, J.H.Y. Dietary Oleuropein Inhibits Tumor Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the B16F10 Melanoma Allograft Model: A Mechanism for the Suppression of High-Fat Diet-Induced Solid Tumor Growth and Lymph Node Metastasis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 32027–32042, doi:10.18632/oncotarget.16757.
195. Samara, P.; Christoforidou, N.; Lemus, C.; Argyropoulou, A.; Ioannou, K.; Vougianniopoulou, K.; Aligiannis, N.; Paronis, E.; Gaboriaud-Kolar, N.; Tsitsilonis, O.; et al. New Semi-Synthetic Analogs of Oleuropein Show Improved Anticancer Activity in Vitro and in Vivo. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *137*, 11–29, doi:10.1016/j.ejmech.2017.05.029.
196. Hamdi, H.K.; Castellon, R. Oleuropein, a Non-Toxic Olive Iridoid, Is an Anti-Tumor Agent and Cytoskeleton Disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 769–778, doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.161.
197. Andreadou, I.; Mikros, E.; Ioannidis, K.; Sigala, F.; Naka, K.; Kostidis, S.; Farmakis, D.; Tenta, R.; Kavantzias, N.; Bibli, S.-I.; et al. Oleuropein Prevents Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Interfering with Signaling Molecules and Cardiomyocyte Metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2014**, *69*, 4–16, doi:10.1016/j.yjmcc.2014.01.007.
198. Sherif, I.O.; Al-Gayyar, M.M.H. Oleuropein Potentiates Anti-Tumor Activity of Cisplatin against HepG2 through Affecting ProNGF/NGF Balance. *Life Sciences* **2018**, *198*, 87–93, doi:10.1016/j.lfs.2018.02.027.
199. Visioli, F.; Galli, C.; Bornet, F.; Mattei, A.; Patelli, R.; Galli, G.; Caruso, D. Olive Oil Phenolics Are Dose-Dependently Absorbed in Humans. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 159–160, doi:10.1016/s0014-5793(00)01216-3.
200. Miró-Casas, E.; Farré Albaladejo, M.; Covas, M.I.; Rodriguez, J.O.; Menoyo Colomer, E.; Lamuela Raventós, R.M.; de la Torre, R. Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry Quantitative Determination of Hydroxytyrosol and Tyrosol in Human Urine after Olive Oil Intake. *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 63–72, doi:10.1006/abio.2001.5160.

201. Vissers, M.N.; Zock, P.L.; Roodenburg, A.J.C.; Leenen, R.; Katan, M.B. Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition* **2002**, *132*, 409–417, doi:10.1093/jn/132.3.409.
202. Lemonakis, N.; Mougios, V.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, A.-L.; Gikas, E. A Novel Bioanalytical Method Based on UHPLC-HRMS/MS for the Quantification of Oleuropein in Human Serum. Application to a Pharmacokinetic Study: Quantification of Oleuropein in Human Serum. *Biomedical Chromatography* **2016**, *30*, 2016–2023, doi:10.1002/bmc.3779.
203. de Bock, M.; Thorstensen, E.B.; Derraik, J.G.B.; Henderson, H.V.; Hofman, P.L.; Cutfield, W.S. Human Absorption and Metabolism of Oleuropein and Hydroxytyrosol Ingested as Olive (*Olea Europaea* L.) Leaf Extract. *Molecular Nutrition & Food Research* **2013**, *57*, 2079–2085, doi:10.1002/mnfr.201200795.
204. Visioli, F.; De La Lastra, C.A.; Andres-Lacueva, C.; Aviram, M.; Calhau, C.; Cassano, A.; D'Archivio, M.; Faria, A.; Favé, G.; Fogliano, V.; et al. Polyphenols and Human Health: A Prospectus. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2011**, *51*, 524–546, doi:10.1080/10408391003698677.
205. Hu, J.; Zou, X.; He, Y.; Chen, F.; Deng, Z. Esterification of Quercetin Increases Its Transport Across Human Caco-2 Cells: Synthesize Quercetin Ester to Improve Bioavailability.... *Journal of Food Science* **2016**, *81*, H1825–H1832, doi:10.1111/1750-3841.13366.
206. Pagnussatt, F.A.; de Lima, V.R.; Dora, C.L.; Costa, J.A.V.; Putaux, J.-L.; Badiale-Furlong, E. Assessment of the Encapsulation Effect of Phenolic Compounds from Spirulina Sp. LEB-18 on Their Antifusarium Activities. *Food Chemistry* **2016**, *211*, 616–623, doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.098.
207. Gibis, M.; Ruedt, C.; Weiss, J. In Vitro Release of Grape-Seed Polyphenols Encapsulated from Uncoated and Chitosan-Coated Liposomes. *Food Research International* **2016**, *88*, 105–113, doi:10.1016/j.foodres.2016.02.010.
208. Gleeson, J.P.; Ryan, S.M.; Brayden, D.J. Oral Delivery Strategies for Nutraceuticals: Delivery Vehicles and Absorption Enhancers. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *53*, 90–101, doi:10.1016/j.tifs.2016.05.007.
209. Vitiello, M.; Tuccoli, A.; D'Aurizio, R.; Sarti, S.; Giannecchini, L.; Lubrano, S.; Marranci, A.; Evangelista, M.; Peppicelli, S.; Ippolito, C.; et al. Context-Dependent MiR-204 and MiR-211 Affect the Biological Properties of Amelanotic and Melanotic Melanoma Cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 25395–25417, doi:10.18632/oncotarget.15915.
210. Guex, C.G.; Reginato, F.Z.; Figueredo, K.C.; da Silva, A.R.H. da; Pires, F.B.; Jesus, R. da S.; Lhamas, C.L.; Lopes, G.H.H.; Bauermann, L. de F. Safety Assessment of Ethanolic Extract of *Olea Europaea* L. Leaves after Acute and Subacute Administration to Wistar Rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2018**, *95*, 395–399, doi:10.1016/j.yrtph.2018.04.013.
211. Park, S.; Choi, Y.; Um, S.-J.; Yoon, S.K.; Park, T. Oleuropein Attenuates Hepatic Steatosis Induced by High-Fat Diet in Mice. *Journal of Hepatology* **2011**, *54*, 984–993, doi:10.1016/j.jhep.2010.08.019.
212. Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Andreucci, E.; Bianchini, F.; Scardigli, A.; Romani, A.; la Marca, G.; Nediani, C.; Calorini, L. Oleuropein, the Main Polyphenol of *Olea Europaea* Leaf Extract, Has an Anti-Cancer Effect on Human BRAF Melanoma Cells and Potentiates the Cytotoxicity of Current Chemotherapies. *Nutrients* **2018**, *10*, doi:10.3390/nu10121950.

213. Amos-Landgraf, J.M.; Kwong, L.N.; Kendziorski, C.M.; Reichelderfer, M.; Torrealba, J.; Weichert, J.; Haag, J.D.; Chen, K.-S.; Waller, J.L.; Gould, M.N.; et al. A Target-Selected Apc-Mutant Rat Kindred Enhances the Modeling of Familial Human Colon Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 4036–4041, doi:10.1073/pnas.0611690104.
214. Femia, A.P.; Swidsinski, A.; Dolara, P.; Salvadori, M.; Amedei, A.; Caderni, G. Mucin Depleted Foci, Colonic Preneoplastic Lesions Lacking Muc2, Show Up-Regulation of Tlr2 but Not Bacterial Infiltration. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e29918, doi:10.1371/journal.pone.0029918.
215. Luceri, C.; Femia, A.P.; Tortora, K.; D'Ambrosio, M.; Fabbri, S.; Fazi, M.; Caderni, G. Supplementation with Phytoestrogens and Insoluble Fibers Reduces Intestinal Carcinogenesis and Restores ER- β Expression in Apc-Driven Colorectal Carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention* **2020**, *29*, 27–35, doi:10.1097/CEJ.0000000000000542.
216. Duncan, L.M. The Classification of Cutaneous Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **2009**, *23*, 501–513, doi:10.1016/j.hoc.2009.03.013.
217. Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J.J.; Garrido, A. Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3535–3540, doi:10.1021/jf990009o.
218. Granados-Principal, S.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, C.L.; Sanchez-Rovira, P.; Ramirez-Tortosa, M.C. Hydroxytyrosol: From Laboratory Investigations to Future Clinical Trials. *Nutrition Reviews* **2010**, *68*, 191–206, doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x.
219. Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Andreucci, E.; Urciuoli, S.; Romani, A.; Tortora, K.; Caderni, G.; Nediani, C.; Calorini, L. Cancer Glycolytic Dependence as a New Target of Olive Leaf Extract. *Cancers* **2020**, *12*.
220. Shiraishi, T.; Verdone, J.E.; Huang, J.; Kahlert, U.D.; Hernandez, J.R.; Torga, G.; Zarif, J.C.; Epstein, T.; Gatenby, R.; McCartney, A.; et al. Glycolysis Is the Primary Bioenergetic Pathway for Cell Motility and Cytoskeletal Remodeling in Human Prostate and Breast Cancer Cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 130–143, doi:10.18632/oncotarget.2766.
221. Zeineldin, M.; Neufeld, K.L. More than Two Decades of Apc Modeling in Rodents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2013**, *1836*, 80–89, doi:10.1016/j.bbcan.2013.01.001.
222. Washington, M.K.; Powell, A.E.; Sullivan, R.; Sundberg, J.P.; Wright, N.; Coffey, R.J.; Dove, W.F. Pathology of Rodent Models of Intestinal Cancer: Progress Report and Recommendations. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 705–717, doi:10.1053/j.gastro.2013.01.067.
223. West, K. Morson & Dawson's Gastrointestinal Pathology, 4th Edn. *Histopathology* **2004**, *44*, 296–296, doi:10.1111/j.0309-0167.2004.01839.x.
224. Amos-Landgraf, J.M.; Kwong, L.N.; Kendziorski, C.M.; Reichelderfer, M.; Torrealba, J.; Weichert, J.; Haag, J.D.; Chen, K.-S.; Waller, J.L.; Gould, M.N.; et al. A Target-Selected Apc-Mutant Rat Kindred Enhances the Modeling of Familial Human Colon Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 4036–4041, doi:10.1073/pnas.0611690104.
225. Goren, L.; Zhang, G.; Kaushik, S.; Breslin, P.A.S.; Du, Y.-C.N.; Foster, D.A. (-)-Oleocanthal and (-)-Oleocanthal-Rich Olive Oils Induce Lysosomal Membrane Permeabilization in Cancer Cells. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216024, doi:10.1371/journal.pone.0216024.

226. Pei, T.; Meng, Q.; Han, J.; Sun, H.; Li, L.; Song, R.; Sun, B.; Pan, S.; Liang, D.; Liu, L. (-)-Oleocanthal Inhibits Growth and Metastasis by Blocking Activation of STAT3 in Human Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43475–43491, doi:10.18632/oncotarget.9782.
227. Khazaei, Z.; Sohrabivafa, M.; Mansori, K.; Naemi, H.; Goodarzi, E. Incidence and Mortality of Cervix Cancer and Their Relationship with the Human Development Index in 185 Countries in the World: An Ecology Study in 2018. *Adv Hum Biol* **2019**, *9*, 222, doi:10.4103/AIHB.AIHB_15_19.
228. Arrangoiz, R. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *JCTR* **2016**, *4*, 1, doi:10.11648/j.jctr.20160401.11.
229. Clark, W.H.; Elder, D.E.; Guerry, D.; Epstein, M.N.; Greene, M.H.; Van Horn, M. A Study of Tumor Progression: The Precursor Lesions of Superficial Spreading and Nodular Melanoma. *Human Pathology* **1984**, *15*, 1147–1165, doi:10.1016/S0046-8177(84)80310-X.
230. Rahmati, M.; Ebrahim, S.; Hashemi, S.; Motamedi, M.; Moosavi, M.A. New Insights on the Role of Autophagy in the Pathogenesis and Treatment of Melanoma. *Mol Biol Rep* **2020**, *47*, 9021–9032, doi:10.1007/s11033-020-05886-6.
231. Sample, A.; He, Y.-Y. Mechanisms and Prevention of UV-Induced Melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **2018**, *34*, 13–24, doi:10.1111/phpp.12329.
232. Russo, I.; Caroppo, F.; Alaibac, M. Vitamins and Melanoma. *Cancers* **2015**, *7*, 1371–1387.
233. Bevona, C. Cutaneous Melanomas Associated With Nevi. *Arch Dermatol* **2003**, *139*, 1620, doi:10.1001/archderm.139.12.1620.
234. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954, doi:10.1038/nature00766.
235. Jakob, J.A.; Bassett, R.L.; Ng, C.S.; Curry, J.L.; Joseph, R.W.; Alvarado, G.C.; Rohlf, M.L.; Richard, J.; Gershenwald, J.E.; Kim, K.B.; et al. NRAS Mutation Status Is an Independent Prognostic Factor in Metastatic Melanoma. *Cancer* **2012**, *118*, 4014–4023, doi:10.1002/cncr.26724.
236. Cohen, C.; Zavala-Pompa, A.; Sequeira, J.H.; Shoji, M.; Sexton, D.G.; Cotsonis, G.; Cerimele, F.; Govindarajan, B.; Macaron, N.; Arbiser, J.L. Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is an Early Event in Melanoma Progression. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 3728.
237. Pratilas, C.A.; Taylor, B.S.; Ye, Q.; Viale, A.; Sander, C.; Solit, D.B.; Rosen, N. V600EBRAF Is Associated with Disabled Feedback Inhibition of RAF-MEK Signaling and Elevated Transcriptional Output of the Pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106*, 4519–4524, doi:10.1073/pnas.0900780106.
238. Joseph, E.W.; Pratilas, C.A.; Poulikakos, P.I.; Tadi, M.; Wang, W.; Taylor, B.S.; Halilovic, E.; Persaud, Y.; Xing, F.; Viale, A.; et al. The RAF Inhibitor PLX4032 Inhibits ERK Signaling and Tumor Cell Proliferation in a V600E BRAF-Selective Manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 14903–14908, doi:10.1073/pnas.1008990107.
239. Poulikakos, P.I.; Persaud, Y.; Janakiraman, M.; Kong, X.; Ng, C.; Moriceau, G.; Shi, H.; Atefi, M.; Titz, B.; Gabay, M.T.; et al. RAF Inhibitor Resistance Is Mediated by Dimerization of Aberrantly Spliced BRAF(V600E). *Nature* **2011**, *480*, 387–390, doi:10.1038/nature10662.

240. Lito, P.; Rosen, N.; Solit, D.B. Tumor Adaptation and Resistance to RAF Inhibitors. *Nat Med* **2013**, *19*, 1401–1409, doi:10.1038/nm.3392.
241. Chan, X.; Singh, A.; Osman, N.; Piva, T. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *IJMS* **2017**, *18*, 1527, doi:10.3390/ijms18071527.
242. Al-U'datt, D.G.F.; Al-Husein, B.A.A.; Qasaimeh, G.R. A Mini-Review of c-Met as a Potential Therapeutic Target in Melanoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *88*, 194–202, doi:10.1016/j.biopha.2017.01.045.
243. Demkova, L.; Kucerova, L. Role of the HGF/c-MET Tyrosine Kinase Inhibitors in Metastatic Melanoma. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 26, doi:10.1186/s12943-018-0795-z.
244. Abbaspour Babaei, M.; Kamalidehghan, B.; Saleem, M.; Zaman Huri, H.; Ahmadipour, F. Receptor Tyrosine Kinase (c-Kit) Inhibitors: A Potential Therapeutic Target in Cancer Cells. *DDDT* **2016**, *Volume 10*, 2443–2459, doi:10.2147/DDDT.S89114.
245. Yajima, I.; Kumasaka, M.Y.; Thang, N.D.; Goto, Y.; Takeda, K.; Yamanoshita, O.; Iida, M.; Ohgami, N.; Tamura, H.; Kawamoto, Y.; et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatology Research and Practice* **2012**, *2012*, 1–5, doi:10.1155/2012/354191.
246. Davies, M.A. The Role of the PI3K-AKT Pathway in Melanoma. *The Cancer Journal* **2012**, *18*, 142–147, doi:10.1097/PPO.0b013e31824d448c.
247. Paluncic, J.; Kovacevic, Z.; Jansson, P.J.; Kalinowski, D.; Merlot, A.M.; Huang, M.L.-H.; Lok, H.C.; Sahni, S.; Lane, D.J.R.; Richardson, D.R. Roads to Melanoma: Key Pathways and Emerging Players in Melanoma Progression and Oncogenic Signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2016**, *1863*, 770–784, doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.025.
248. Aguisa-Touré, A.-H.; Li, G. Genetic Alterations of PTEN in Human Melanoma. *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 1475–1491, doi:10.1007/s00018-011-0878-0.
249. Reddy, B.Y.; Miller, D.M.; Tsao, H. Somatic Driver Mutations in Melanoma: Somatic Driver Mutations in Melanoma. *Cancer* **2017**, *123*, 2104–2117, doi:10.1002/cncr.30593.
250. Schadendorf, D.; Fisher, D.E.; Garbe, C.; Gershenwald, J.E.; Grob, J.-J.; Halpern, A.; Herlyn, M.; Marchetti, M.A.; McArthur, G.; Ribas, A.; et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, 15003, doi:10.1038/nrdp.2015.3.
251. Lee, C.; Collichio, F.; Ollila, D.; Moschos, S. Historical Review of Melanoma Treatment and Outcomes. *Clinics in Dermatology* **2013**, *31*, 141–147, doi:10.1016/j.clindermatol.2012.08.015.
252. Bhatia, S.; Tykodi, S.S.; Thompson, J.A. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. *Oncology (Williston Park)* **2009**, *23*, 488–496.
253. Chen, J.; Shao, R.; Zhang, X.; Chen, C. Applications of Nanotechnology for Melanoma Treatment, Diagnosis, and Theranostics. *IJN* **2013**, 2677, doi:10.2147/IJN.S45429.
254. Velho, T. Metastatic Melanoma – a Review of Current and Future Drugs. *DIC* **2012**, 1–17, doi:10.7573/dic.212242.

255. Di Franco, S.; Turdo, A.; Todaro, M.; Stassi, G. Role of Type I and II Interferons in Colorectal Cancer and Melanoma. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 878, doi:10.3389/fimmu.2017.00878.
256. Franklin, C.; Livingstone, E.; Roesch, A.; Schilling, B.; Schadendorf, D. Immunotherapy in Melanoma: Recent Advances and Future Directions. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* **2017**, *43*, 604–611, doi:10.1016/j.ejso.2016.07.145.
257. Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 711–723, doi:10.1056/NEJMoa1003466.
258. Aspod, C.; Tramcourt, L.; Leloup, C.; Molens, J.-P.; Leccia, M.-T.; Charles, J.; Plumas, J. Imiquimod Inhibits Melanoma Development by Promoting PDC Cytotoxic Functions and Impeding Tumor Vascularization. *Journal of Investigative Dermatology* **2014**, *134*, 2551–2561, doi:10.1038/jid.2014.194.
259. Eisen, T.; Ahmad, T.; Flaherty, K.T.; Gore, M.; Kaye, S.; Marais, R.; Gibbens, I.; Hackett, S.; James, M.; Schuchter, L.M.; et al. Sorafenib in Advanced Melanoma: A Phase II Randomised Discontinuation Trial Analysis. *Br J Cancer* **2006**, *95*, 581–586, doi:10.1038/sj.bjc.6603291.
260. Mandalà, M.; Voit, C. Targeting BRAF in Melanoma: Biological and Clinical Challenges. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2013**, *87*, 239–255, doi:10.1016/j.critrevonc.2013.01.003.
261. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med* **2011**, *364*, 2507–2516, doi:10.1056/NEJMoa1103782.
262. Rajakulendran, T.; Adam, D.N. Bench to Bedside: Mechanistic Principles of Targeting the RAF Kinase in Melanoma. *Int J Dermatol* **2014**, *53*, 1428–1433, doi:10.1111/ijd.12724.
263. Hauschild, A.; Agarwala, S.S.; Trefzer, U.; Hogg, D.; Robert, C.; Hersey, P.; Eggermont, A.; Grabbe, S.; Gonzalez, R.; Gille, J.; et al. Results of a Phase III, Randomized, Placebo-Controlled Study of Sorafenib in Combination With Carboplatin and Paclitaxel As Second-Line Treatment in Patients With Unresectable Stage III or Stage IV Melanoma. *JCO* **2009**, *27*, 2823–2830, doi:10.1200/JCO.2007.15.7636.
264. Falchook, G.S.; Long, G.V.; Kurzrock, R.; Kim, K.B.; Arkenau, T.H.; Brown, M.P.; Hamid, O.; Infante, J.R.; Millward, M.; Pavlick, A.C.; et al. Dabrafenib in Patients with Melanoma, Untreated Brain Metastases, and Other Solid Tumours: A Phase 1 Dose-Escalation Trial. *The Lancet* **2012**, *379*, 1893–1901, doi:10.1016/S0140-6736(12)60398-5.
265. Menzies, A.M.; Long, G.V. Systemic Treatment for BRAF-Mutant Melanoma: Where Do We Go Next? *The Lancet Oncology* **2014**, *15*, e371–e381, doi:10.1016/S1470-2045(14)70072-5.
266. Gilmartin, A.G.; Bleam, M.R.; Groy, A.; Moss, K.G.; Minthorn, E.A.; Kulkarni, S.G.; Rominger, C.M.; Erskine, S.; Fisher, K.E.; Yang, J.; et al. GSK1120212 (JTP-74057) Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained *In Vivo* Pathway Inhibition. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 989–1000, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2200.
267. Flaherty, K.T.; Lee, S.J.; Schuchter, L.M.; Flaherty, L.E.; Wright, J.J.; Leming, P.D.; Kirkwood, J.M. Final Results of E2603: A Double-Blind, Randomized Phase III Trial Comparing Carboplatin (C)/Paclitaxel (P) with or without Sorafenib (S) in Metastatic Melanoma. *JCO* **2010**, *28*, 8511–8511, doi:10.1200/jco.2010.28.15_suppl.8511.

268. Paraiso, K.H.T.; Fedorenko, I.V.; Cantini, L.P.; Munko, A.C.; Hall, M.; Sondak, V.K.; Messina, J.L.; Flaherty, K.T.; Smalley, K.S.M. Recovery of Phospho-ERK Activity Allows Melanoma Cells to Escape from BRAF Inhibitor Therapy. *Br J Cancer* **2010**, *102*, 1724–1730, doi:10.1038/sj.bjc.6605714.
269. Mishra, H.; Mishra, P.K.; Ekielski, A.; Jaggi, M.; Iqbal, Z.; Talegaonkar, S. Melanoma Treatment: From Conventional to Nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol* **2018**, *144*, 2283–2302, doi:10.1007/s00432-018-2726-1.
270. Hers, I.; Vincent, E.E.; Tavaré, J.M. Akt Signalling in Health and Disease. *Cellular Signalling* **2011**, *23*, 1515–1527, doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.004.
271. Franke, T.F. PI3K/Akt: Getting It Right Matters. *Oncogene* **2008**, *27*, 6473–6488, doi:10.1038/onc.2008.313.
272. Manning, B.D.; Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169*, 381–405, doi:10.1016/j.cell.2017.04.001.
273. Mundi, P.S.; Sachdev, J.; McCourt, C.; Kalinsky, K. AKT in Cancer: New Molecular Insights and Advances in Drug Development: AKT in Cancer. *Br J Clin Pharmacol* **2016**, *82*, 943–956, doi:10.1111/bcp.13021.
274. Larue, L.; Bellacosa, A. Epithelial-mesenchymal Transition in Development and Cancer: Role of Phosphatidylinositol S2 Kinase/AKT Pathways. *Oncogene* **2005**, *24*, 7443–7454.
275. Jiang, B.-H.; Liu, L.-Z. PI3K/PTEN Signaling in Tumorigenesis and Angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2008**, *1784*, 150–158, doi:10.1016/j.bbapap.2007.09.008.
276. Gonzalez, E.; McGraw, T.E. The Akt Kinases: Isoform Specificity in Metabolism and Cancer. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2502–2508, doi:10.4161/cc.8.16.9335.
277. Kumar, C.C.; Madison, V. AKT Crystal Structure and AKT-Specific Inhibitors. *Oncogene* **2005**, *24*, 7493–7501, doi:10.1038/sj.onc.1209087.
278. Liao, Y.; Hung, M.-C. Physiological Regulation of Akt Activity and Stability. *Am J Transl Res* **2010**, *2*, 19–42.
279. Scheid, M.P.; Woodgett, J.R. Unravelling the Activation Mechanisms of Protein Kinase B/Akt. *FEBS Letters* **2003**, *546*, 108–112, doi:10.1016/S0014-5793(03)00562-3.
280. Alessi, D.R.; James, S.R.; Downes, C.P.; Holmes, A.B.; Gaffney, P.R.J.; Reese, C.B.; Cohen, P. Characterization of a 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase Which Phosphorylates and Activates Protein Kinase Ba. *Current Biology* **1997**, *7*, 261–269, doi:10.1016/S0960-9822(06)00122-9.
281. Conus, N.M.; Hannan, K.M.; Cristiano, B.E.; Hemmings, B.A.; Pearson, R.B. Direct Identification of Tyrosine 474 as a Regulatory Phosphorylation Site for the Akt Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 38021–38028, doi:10.1074/jbc.M203387200.
282. Sarbassov, D.D. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-MTOR Complex. *Science* **2005**, *307*, 1098–1101, doi:10.1126/science.1106148.

283. Feng, J.; Park, J.; Cron, P.; Hess, D.; Hemmings, B.A. Identification of a PKB/Akt Hydrophobic Motif Ser-473 Kinase as DNA-Dependent Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 41189–41196, doi:10.1074/jbc.M406731200.
284. O'Neill, A.K.; Niederst, M.J.; Newton, A.C. Suppression of Survival Signalling Pathways by the Phosphatase PHLPP. *FEBS J* **2013**, *280*, 572–583, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08537.x.
285. Clark, A.S.; West, K.; Streicher, S.; Dennis, P.A. Constitutive and Inducible Akt Activity Promotes Resistance to Chemotherapy, Trastuzumab, or Tamoxifen in Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* **2002**, *1*, 707–717.
286. Jin, W.; Wu, L.; Liang, K.; Liu, B.; Lu, Y.; Fan, Z. Roles of the PI-3K and MEK Pathways in Ras-Mediated Chemoresistance in Breast Cancer Cells. *Br J Cancer* **2003**, *89*, 185–191, doi:10.1038/sj.bjc.6601048.
287. Libra, M. Gene Alterations in the PI3K/PTEN/AKT Pathway as a Mechanism of Drug-Resistance (Review). *Int J Oncol* **2011**, doi:10.3892/ijo.2011.1312.
288. Page, C.; Lin, H.J.; Jin, Y.; Castle, V.P.; Nunez, G.; Huang, M.; Lin, J. Overexpression of Akt/AKT Can Modulate Chemotherapy-Induced Apoptosis. *Anticancer Res* **2000**, *20*, 407–416.
289. Benedetti, V.; Perego, P.; Luca Beretta, G.; Corna, E.; Tinelli, S.; Righetti, S.C.; Leone, R.; Apostoli, P.; Lanzi, C.; Zunino, F. Modulation of Survival Pathways in Ovarian Carcinoma Cell Lines Resistant to Platinum Compounds. *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 679–687, doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0450.
290. Zhang, H.-Y.; Zhang, P.-N.; Sun, H. Aberration of the PI3K/AKT/MTOR Signaling in Epithelial Ovarian Cancer and Its Implication in Cisplatin-Based Chemotherapy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **2009**, *146*, 81–86, doi:10.1016/j.ejogrb.2009.04.035.
291. Engel, J.B.; Schönhals, T.; Häusler, S.; Krockenberger, M.; Schmidt, M.; Horn, E.; Köster, F.; Dietl, J.; Wischhusen, J.; Honig, A. Induction of Programmed Cell Death by Inhibition of AKT with the Alkylphosphocholine Perifosine in in Vitro Models of Platinum Sensitive and Resistant Ovarian Cancers. *Arch Gynecol Obstet* **2011**, *283*, 603–610, doi:10.1007/s00404-010-1457-6.
292. Brognard, J.; Clark, A.S.; Ni, Y.; Dennis, P.A. Akt/Protein Kinase B Is Constitutively Active in Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Promotes Cellular Survival and Resistance to Chemotherapy and Radiation. *Cancer Res* **2001**, *61*, 3986–3997.
293. Fujiwara, M.; Izuishi, K.; Sano, T.; Hossain, M.; Kimura, S.; Masaki, T.; Suzuki, Y. Modulating Effect of the PI3-Kinase Inhibitor LY294002 on Cisplatin in Human Pancreatic Cancer Cells. *J Exp Clin Cancer Res* **2008**, *27*, 76, doi:10.1186/1756-9966-27-76.
294. Adamo, V.; Franchina, T.; Adamo, B.; Denaro, N.; Gambadauro, P.; Chiofalo, G.; Scimone, A.; Caristi, N.; Russo, A.; Giordano, A. Gefitinib in Lung Cancer Therapy: Clinical Results, Predictive Markers of Response and Future Perspectives. *Cancer Biology & Therapy* **2009**, *8*, 206–212, doi:10.4161/cbt.8.3.7465.
295. Janmaat, M.L.; Kruyt, F.A.E.; Rodriguez, J.A.; Giaccone, G. Response to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer Cells: Limited Antiproliferative Effects and Absence of Apoptosis Associated with Persistent Activity of Extracellular Signal-Regulated Kinase or Akt Kinase Pathways. *Clin Cancer Res* **2003**, *9*, 2316–2326.

296. Sos, M.L.; Koker, M.; Weir, B.A.; Heynck, S.; Rabinovsky, R.; Zander, T.; Seeger, J.M.; Weiss, J.; Fischer, F.; Frommolt, P.; et al. *PTEN* Loss Contributes to Erlotinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer by Activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* **2009**, *69*, 3256–3261, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4055.
297. Donev, I.S.; Wang, W.; Yamada, T.; Li, Q.; Takeuchi, S.; Matsumoto, K.; Yamori, T.; Nishioka, Y.; Sone, S.; Yano, S. Transient PI3K Inhibition Induces Apoptosis and Overcomes HGF-Mediated Resistance to EGFR-TKIs in *EGFR* Mutant Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 2260–2269, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1993.
298. Kettunen, E.; Anttila, S.; Seppänen, J.K.; Karjalainen, A.; Edgren, H.; Lindström, I.; Salovaara, R.; Nissén, A.-M.; Salo, J.; Mattson, K.; et al. Differentially Expressed Genes in Non-small Cell Lung Cancer: Expression Profiling of Cancer-Related Genes in Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **2004**, *149*, 98–106, doi:10.1016/S0165-4608(03)00300-5.
299. Ito, G.; Uchiyama, M.; Kondo, M.; Mori, S.; Usami, N.; Maeda, O.; Kawabe, T.; Hasegawa, Y.; Shimokata, K.; Sekido, Y. Krüppel-Like Factor 6 Is Frequently Down-Regulated and Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res* **2004**, *64*, 3838–3843, doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0185.
300. Tabara, K.; Kanda, R.; Sonoda, K.; Kubo, T.; Murakami, Y.; Kawahara, A.; Azuma, K.; Abe, H.; Kage, M.; Yoshinaga, A.; et al. Loss of Activating EGFR Mutant Gene Contributes to Acquired Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41017, doi:10.1371/journal.pone.0041017.
301. Gajria, D.; Chandarlapaty, S. HER2-Amplified Breast Cancer: Mechanisms of Trastuzumab Resistance and Novel Targeted Therapies. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2011**, *11*, 263–275, doi:10.1586/era.10.226.
302. Spector, N.L.; Blackwell, K.L. Understanding the Mechanisms Behind Trastuzumab Therapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer. *JCO* **2009**, *27*, 5838–5847, doi:10.1200/JCO.2009.22.1507.
303. Nagata, Y.; Lan, K.-H.; Zhou, X.; Tan, M.; Esteva, F.J.; Sahin, A.A.; Klos, K.S.; Li, P.; Monia, B.P.; Nguyen, N.T.; et al. PTEN Activation Contributes to Tumor Inhibition by Trastuzumab, and Loss of PTEN Predicts Trastuzumab Resistance in Patients. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 117–127, doi:10.1016/j.ccr.2004.06.022.
304. Berns, K.; Horlings, H.M.; Hennessy, B.T.; Madiredjo, M.; Hijmans, E.M.; Beelen, K.; Linn, S.C.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Stemke-Hale, K.; Hauptmann, M.; et al. A Functional Genetic Approach Identifies the PI3K Pathway as a Major Determinant of Trastuzumab Resistance in Breast Cancer. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 395–402, doi:10.1016/j.ccr.2007.08.030.
305. Zardavas, D.; Fumagalli, D.; Loi, S. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/Mammalian Target of Rapamycin Pathway Inhibition: A Breakthrough in the Management of Luminal (ER+/HER2–) Breast Cancers? *Current Opinion in Oncology* **2012**, *24*, 623–634, doi:10.1097/CCO.0b013e328358a2b5.
306. Miller, T.W.; Balko, J.M.; Arteaga, C.L. Phosphatidylinositol 3-Kinase and Antiestrogen Resistance in Breast Cancer. *JCO* **2011**, *29*, 4452–4461, doi:10.1200/JCO.2010.34.4879.

307. Shi, Y.; Liu, X.; Han, E.K.; Guan, R.; Shoemaker, A.R.; Oleksijew, A.; Woods, K.W.; Fisher, J.P.; Klinghofer, V.; Lasko, L.; et al. Optimal Classes of Chemotherapeutic Agents Sensitized by Specific Small-Molecule Inhibitors of Akt In Vitro and In Vivo. *Neoplasia* **2005**, *7*, 992–1000, doi:10.1593/neo.05355.
308. Lopiccolo, J.; Blumenthal, G.; Bernstein, W.; Dennis, P. Targeting the PI3K/Akt/MTOR Pathway: Effective Combinations and Clinical Considerations. *Drug Resistance Updates* **2008**, *11*, 32–50, doi:10.1016/j.drug.2007.11.003.
309. Mohd Sharial, M.S.N.; Crown, J.; Hennessey, B.T. Overcoming Resistance and Restoring Sensitivity to HER2-Targeted Therapies in Breast Cancer. *Annals of Oncology* **2012**, *23*, 3007–3016, doi:10.1093/annonc/mds200.
310. Scaltriti, M.; Rojo, F.; Ocana, A.; Anido, J.; Guzman, M.; Cortes, J.; Di Cosimo, S.; Matias-Guiu, X.; Ramon y Cajal, S.; Arribas, J.; et al. Expression of P95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti-HER2 Therapies in Breast Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **2007**, *99*, 628–638, doi:10.1093/jnci/djk134.
311. Scaltriti, M.; Chandarlapaty, S.; Prudkin, L.; Aura, C.; Jimenez, J.; Angelini, P.D.; Sánchez, G.; Guzman, M.; Parra, J.L.; Ellis, C.; et al. Clinical Benefit of Lapatinib-Based Therapy in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Tumors Coexpressing the Truncated P95HER2 Receptor. *Clin Cancer Res* **2010**, *16*, 2688–2695, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-3407.
312. Chinni, S.R.; Sarkar, F.H. Akt Inactivation Is a Key Event in Indole-3-Carbinol-Induced Apoptosis in PC-3 Cells. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 1228–1236.
313. Pianetti, S.; Guo, S.; Kavanagh, K.T.; Sonenshein, G.E. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3 Gallate Inhibits Her-2/Neu Signaling, Proliferation, and Transformed Phenotype of Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **2002**, *62*, 652–655.
314. Klein, R.D. Black Tea Polyphenols Inhibit IGF-I-Induced Signaling through Akt in Normal Prostate Epithelial Cells and Du145 Prostate Carcinoma Cells. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 217–221, doi:10.1093/carcin/23.1.217.
315. Sato, T.; Koike, L.; Miyata, Y.; Hirata, M.; Mimaki, Y.; Sashida, Y.; Yano, M.; Ito, A. Inhibition of Activator Protein-1 Binding Activity and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway by Nobiletin, a Polymethoxy Flavonoid, Results in Augmentation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Production and Suppression of Production of Matrix Metalloproteinases-1 and -9 in Human Fibrosarcoma HT-1080 Cells. *Cancer Res* **2002**, *62*, 1025–1029.
316. Xagorari, A.; Papapetropoulos, A.; Mauromatis, A.; Economou, M.; Fotsis, T.; Roussos, C. Luteolin Inhibits an Endotoxin-Stimulated Phosphorylation Cascade and Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *296*, 181–187.
317. Liu, M.; Wang, J.; Huang, B.; Chen, A.; Li, X. Oleuropein Inhibits the Proliferation and Invasion of Glioma Cells via Suppression of the AKT Signaling Pathway. *Oncol. Rep.* **2016**, *36*, 2009–2016, doi:10.3892/or.2016.4978.
318. Yan, C.-M.; Chai, E.-Q.; Cai, H.-Y.; Miao, G.-Y.; Ma, W. Oleuropein Induces Apoptosis via Activation of Caspases and Suppression of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway in HepG2 Human Hepatoma Cell Line. *Molecular Medicine Reports* **2015**, *11*, 4617–4624, doi:10.3892/mmr.2015.3266.

319. Serrone, L.; Zeuli, M.; Sega, F.M.; Cognetti, F. Dacarbazine-Based Chemotherapy for Metastatic Melanoma: Thirty-Year Experience Overview. *J Exp Clin Cancer Res* **2000**, *19*, 21–34.
320. Pratheeshkumar, P.; Son, Y.-O.; Budhraj, A.; Wang, X.; Ding, S.; Wang, L.; Hitron, A.; Lee, J.-C.; Kim, D.; Divya, S.P.; et al. Luteolin Inhibits Human Prostate Tumor Growth by Suppressing Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2-Mediated Angiogenesis. *PLoS One* **2012**, *7*, e52279, doi:10.1371/journal.pone.0052279.
321. Li, F.; Ye, L.; Lin, S.; Leung, L.K. Dietary Flavones and Flavonones Display Differential Effects on Aromatase (CYP19) Transcription in the Breast Cancer Cells MCF-7. *Mol Cell Endocrinol* **2011**, *344*, 51–58, doi:10.1016/j.mce.2011.06.024.
322. Seo, H.-S.; Choi, H.-S.; Kim, S.-R.; Choi, Y.K.; Woo, S.-M.; Shin, I.; Woo, J.-K.; Park, S.-Y.; Shin, Y.C.; Ko, S.-G.; et al. Apigenin Induces Apoptosis via Extrinsic Pathway, Inducing P53 and Inhibiting STAT3 and NFκB Signaling in HER2-Overexpressing Breast Cancer Cells. *Mol Cell Biochem* **2012**, *366*, 319–334, doi:10.1007/s11010-012-1310-2.
323. Barrajón-Catalán, E.; Taamalli, A.; Quirantes-Piné, R.; Roldan-Segura, C.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Micol, V.; Zarrouk, M. Differential Metabolomic Analysis of the Potential Antiproliferative Mechanism of Olive Leaf Extract on the JIMT-1 Breast Cancer Cell Line. *J Pharm Biomed Anal* **2015**, *105*, 156–162, doi:10.1016/j.jpba.2014.11.048.
324. Gonzalez-Menendez, P.; Hevia, D.; Rodriguez-Garcia, A.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M. Regulation of GLUT Transporters by Flavonoids in Androgen-Sensitive and -Insensitive Prostate Cancer Cells. *Endocrinology* **2014**, *155*, 3238–3250, doi:10.1210/en.2014-1260.
325. Boss, A.; Bishop, K.S.; Marlow, G.; Barnett, M.P.G.; Ferguson, L.R. Evidence to Support the Anti-Cancer Effect of Olive Leaf Extract and Future Directions. *Nutrients* **2016**, *8*, doi:10.3390/nu8080513.
326. Buzzai, M.; Bauer, D.E.; Jones, R.G.; DeBerardinis, R.J.; Hatzivassiliou, G.; Elstrom, R.L.; Thompson, C.B. The Glucose Dependence of Akt-Transformed Cells Can Be Reversed by Pharmacologic Activation of Fatty Acid β -Oxidation. *Oncogene* **2005**, *24*, 4165–4173, doi:10.1038/sj.onc.1208622.
327. Ruzzolini, J.; Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Andreucci, E.; Urciuoli, S.; Romani, A.; Tortora, K.; Caderni, G.; Nediani, C.; Calorini, L. Cancer Glycolytic Dependence as a New Target of Olive Leaf Extract. *Cancers* **2020**, *12*, 317, doi:10.3390/cancers12020317.
328. Sharma, S.H.; Thulasingam, S.; Chellappan, D.R.; Chinnaswamy, P.; Nagarajan, S. Morin and Esculetin Supplementation Modulates C-Myc Induced Energy Metabolism and Attenuates Neoplastic Changes in Rats Challenged with the Procarcinogen 1,2 - Dimethylhydrazine. *Eur J Pharmacol* **2017**, *796*, 20–31, doi:10.1016/j.ejphar.2016.12.019.
329. Gómez de Cedrón, M.; Vargas, T.; Madrona, A.; Jiménez, A.; Pérez-Pérez, M.-J.; Quintela, J.-C.; Reglero, G.; San-Félix, A.; Ramírez de Molina, A. Novel Polyphenols That Inhibit Colon Cancer Cell Growth Affecting Cancer Cell Metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **2018**, *366*, 377–389, doi:10.1124/jpet.118.248278.
330. Mueckler, M.; Thorens, B. The SLC2 (GLUT) Family of Membrane Transporters. *Molecular Aspects of Medicine* **2013**, *34*, 121–138, doi:10.1016/j.mam.2012.07.001.

331. Szablewski, L. Expression of Glucose Transporters in Cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2013**, *1835*, 164–169, doi:10.1016/j.bbcan.2012.12.004.
332. Yu, M.; Yongzhi, H.; Chen, S.; Luo, X.; Lin, Y.; Zhou, Y.; Jin, H.; Hou, B.; Deng, Y.; Tu, L.; et al. The Prognostic Value of GLUT1 in Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 43356–43367, doi:10.18632/oncotarget.17445.
333. Zambrano, A.; Molt, M.; Uribe, E.; Salas, M. Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. *IJMS* **2019**, *20*, 3374, doi:10.3390/ijms20133374.
334. Barbosa, A.M.; Martel, F. Targeting Glucose Transporters for Breast Cancer Therapy: The Effect of Natural and Synthetic Compounds. *Cancers* **2020**, *12*, 154, doi:10.3390/cancers12010154.
335. Mazurek, S. Pyruvate Kinase Type M2: A Key Regulator of the Metabolic Budget System in Tumor Cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2011**, *43*, 969–980, doi:10.1016/j.biocel.2010.02.005.
336. Israelsen, W.J.; Dayton, T.L.; Davidson, S.M.; Fiske, B.P.; Hosios, A.M.; Bellinger, G.; Li, J.; Yu, Y.; Sasaki, M.; Horner, J.W.; et al. PKM2 Isoform-Specific Deletion Reveals a Differential Requirement for Pyruvate Kinase in Tumor Cells. *Cell* **2013**, *155*, 397–409, doi:10.1016/j.cell.2013.09.025.
337. Liu, W.-R.; Tian, M.-X.; Yang, L.-X.; Lin, Y.-L.; Jin, L.; Ding, Z.-B.; Shen, Y.-H.; Peng, Y.-F.; Gao, D.-M.; Zhou, J.; et al. PKM2 Promotes Metastasis by Recruiting Myeloid-Derived Suppressor Cells and Indicates Poor Prognosis for Hepatocellular Carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 846–861, doi:10.18632/oncotarget.2749.
338. Gupta, V.; Bamezai, R.N.K. Human Pyruvate Kinase M2: A Multifunctional Protein: Multifunctional Human PKM2. *Protein Science* **2010**, *19*, 2031–2044, doi:10.1002/pro.505.
339. Yang, Y.-C.; Cheng, T.-Y.; Huang, S.-M.; Su, C.-Y.; Yang, P.-W.; Lee, J.-M.; Chen, C.-K.; Hsiao, M.; Hua, K.-T.; Kuo, M.-L. Cytosolic PKM2 Stabilizes Mutant EGFR Protein Expression through Regulating HSP90–EGFR Association. *Oncogene* **2016**, *35*, 3387–3398, doi:10.1038/onc.2015.397.
340. Sun, Q.; Chen, X.; Ma, J.; Peng, H.; Wang, F.; Zha, X.; Wang, Y.; Jing, Y.; Yang, H.; Chen, R.; et al. Mammalian Target of Rapamycin Up-Regulation of Pyruvate Kinase Isoenzyme Type M2 Is Critical for Aerobic Glycolysis and Tumor Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 4129–4134, doi:10.1073/pnas.1014769108.
341. Wiese, E.K.; Hitosugi, T. Tyrosine Kinase Signaling in Cancer Metabolism: PKM2 Paradox in the Warburg Effect. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 79, doi:10.3389/fcell.2018.00079.
342. Iqbal, M.A.; Bamezai, R.N.K. Resveratrol Inhibits Cancer Cell Metabolism by Down Regulating Pyruvate Kinase M2 via Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36764, doi:10.1371/journal.pone.0036764.
343. Li, W.; Ma, X.; Li, N.; Liu, H.; Dong, Q.; Zhang, J.; Yang, C.; Liu, Y.; Liang, Q.; Zhang, S.; et al. Resveratrol Inhibits Hexokinases II Mediated Glycolysis in Non-Small Cell Lung Cancer via Targeting Akt Signaling Pathway. *Experimental Cell Research* **2016**, *349*, 320–327, doi:https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.11.002.
344. Saunier, E.; Antonio, S.; Regazzetti, A.; Auzeil, N.; Laprévote, O.; Shay, J.W.; Coumoul, X.; Barouki, R.; Benelli, C.; Huc, L.; et al. Resveratrol Reverses the Warburg Effect by Targeting the Pyruvate

Dehydrogenase Complex in Colon Cancer Cells. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 6945, doi:10.1038/s41598-017-07006-0.

345. Siddiqui, F.A.; Prakasam, G.; Chattopadhyay, S.; Rehman, A.U.; Padder, R.A.; Ansari, M.A.; Irshad, R.; Mangalhari, K.; Bamezai, R.N.K.; Husain, M.; et al. Curcumin Decreases Warburg Effect in Cancer Cells by Down-Regulating Pyruvate Kinase M2 via MTOR-HIF1 α Inhibition. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 8323, doi:10.1038/s41598-018-25524-3.

346. Fox, J.E.M.; Meredith, D.; Halestrap, A.P. Characterisation of Human Monocarboxylate Transporter 4 Substantiates Its Role in Lactic Acid Efflux from Skeletal Muscle. *The Journal of Physiology* **2000**, *529*, 285–293, doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00285.x.

347. Pinheiro, C.; Longatto-Filho, A.; Scapulatempo, C.; Ferreira, L.; Martins, S.; Pellerin, L.; Rodrigues, M.; Alves, V.A.F.; Schmitt, F.; Baltazar, F. Increased Expression of Monocarboxylate Transporters 1, 2, and 4 in Colorectal Carcinomas. *Virchows Archiv* **2008**, *452*, 139–146, doi:10.1007/s00428-007-0558-5.

348. Fisel, P.; Schaeffeler, E.; Schwab, M. Clinical and Functional Relevance of the Monocarboxylate Transporter Family in Disease Pathophysiology and Drug Therapy: Relevance of the Monocarboxylate Transporter Family in Disease and Therapy. *Clinical And Translational Science* **2018**, *11*, 352–364, doi:10.1111/cts.12551.

349. Pinheiro, C.; Miranda-Gonçalves, V.; Longatto-Filho, A.; Vicente, A.L.S.A.; Berardinelli, G.N.; Scapulatempo-Neto, C.; Costa, R.F.A.; Viana, C.R.; Reis, R.M.; Baltazar, F.; et al. The Metabolic Microenvironment of Melanomas: Prognostic Value of MCT1 and MCT4. *Cell Cycle* **2016**, *15*, 1462–1470, doi:10.1080/15384101.2016.1175258.

350. Lee, J.Y.; Lee, I.; Chang, W.J.; Ahn, S.M.; Lim, S.H.; Kim, H.S.; Yoo, K.H.; Jung, K.S.; Song, H.-N.; Cho, J.H.; et al. MCT4 as a Potential Therapeutic Target for Metastatic Gastric Cancer with Peritoneal Carcinomatosis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 43492–43503, doi:10.18632/oncotarget.9523.

351. Nakayama, Y.; Torigoe, T.; Inoue, Y.; Minagawa, N.; Izumi, H.; Kohno, K.; Yamaguchi, K. Prognostic Significance of Monocarboxylate Transporter 4 Expression in Patients with Colorectal Cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine* **2012**, *3*, 25–30, doi:10.3892/etm.2011.361.

352. Martins, S.F.; Amorim, R.; Viana-Pereira, M.; Pinheiro, C.; Costa, R.F.A.; Silva, P.; Couto, C.; Alves, S.; Fernandes, S.; Vilaça, S.; et al. Significance of Glycolytic Metabolism-Related Protein Expression in Colorectal Cancer, Lymph Node and Hepatic Metastasis. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 535, doi:10.1186/s12885-016-2566-9.

353. Wang, L.; Cho, K.B.; Li, Y.; Tao, G.; Xie, Z.; Guo, B. Long Noncoding RNA (LncRNA)-Mediated Competing Endogenous RNA Networks Provide Novel Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Colorectal Cancer. *IJMS* **2019**, *20*, 5758, doi:10.3390/ijms20225758.

354. Testa, U.; Pelosi, E.; Castelli, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences* **2018**, *6*, 31, doi:10.3390/medsci6020031.

355. Fearnhead, N.S. The ABC of APC. *Human Molecular Genetics* **2001**, *10*, 721–733, doi:10.1093/hmg/10.7.721.

356. Walz, S.; Lorenzin, F.; Morton, J.; Wiese, K.E.; von Eyss, B.; Herold, S.; Rycak, L.; Dumay-Odelot, H.; Karim, S.; Bartkuhn, M.; et al. Activation and Repression by Oncogenic MYC Shape Tumour-Specific Gene Expression Profiles. *Nature* **2014**, *511*, 483–487, doi:10.1038/nature13473.
357. Eaden, J.A. The Risk of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis. *Gut* **2001**, *48*, 526–535, doi:10.1136/gut.48.4.526.
358. Burt, R.W. Colon Cancer Screening. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 837–853, doi:10.1053/gast.2000.16508.
359. Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* **1996**, *87*, 159–170, doi:10.1016/S0092-8674(00)81333-1.
360. Greten, F.R.; Grivnenikov, S.I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* **2019**, *51*, 27–41, doi:10.1016/j.immuni.2019.06.025.
361. Kuper, H.; Adami, H.-O.; Trichopoulos, D. Infections as a Major Preventable Cause of Human Cancer. *J Intern Med* **2000**, *248*, 171–183, doi:10.1046/j.1365-2796.2000.00742.x.
362. Blaser, M.J.; Chyou, P.H.; Nomura, A. Age at Establishment of Helicobacter Pylori Infection and Gastric Carcinoma, Gastric Ulcer, and Duodenal Ulcer Risk. *Cancer Res* **1995**, *55*, 562–565.
363. Scholl, S.M.; Pallud, C.; Beuvon, F.; Hacene, K.; Stanley, E.R.; Rohrschneider, L.; Tang, R.; Pouillart, P.; Lidereau, R. Anti-Colony-Stimulating Factor-1 Antibody Staining in Primary Breast Adenocarcinomas Correlates with Marked Inflammatory Cell Infiltrates and Prognosis. *J Natl Cancer Inst* **1994**, *86*, 120–126, doi:10.1093/jnci/86.2.120.
364. Shacter, E.; Weitzman, S.A. Chronic Inflammation and Cancer. *Oncology (Williston Park)* **2002**, *16*, 217–226, 229; discussion 230-232.
365. Maeda, H.; Akaike, T. Nitric Oxide and Oxygen Radicals in Infection, Inflammation, and Cancer. *Biochemistry (Mosc)* **1998**, *63*, 854–865.
366. Yamanishi, Y.; Boyle, D.L.; Rosengren, S.; Green, D.R.; Zvaifler, N.J.; Firestein, G.S. Regional Analysis of P53 Mutations in Rheumatoid Arthritis Synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 10025–10030, doi:10.1073/pnas.152333199.
367. Andrewes, P.; Busch, J.L.H.C.; de Joode, T.; Groenewegen, A.; Alexandre, H. Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-Ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1415–1420, doi:10.1021/jf026042j.
368. Scotece, M.; Conde, J.; Abella, V.; Lopez, V.; Pino, J.; Lago, F.; Smith, A.B.; Gómez-Reino, J.J.; Gualillo, O. New Drugs from Ancient Natural Foods. Oleocanthal, the Natural Occurring Spicy Compound of Olive Oil: A Brief History. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 406–410, doi:10.1016/j.drudis.2014.10.017.
369. Iacono, A.; Gómez, R.; Sperry, J.; Conde, J.; Bianco, G.; Meli, R.; Gómez-Reino, J.J.; Smith, A.B.; Gualillo, O. Effect of Oleocanthal and Its Derivatives on Inflammatory Response Induced by Lipopolysaccharide in a Murine Chondrocyte Cell Line. *Arthritis & Rheumatism* **2010**, *62*, 1675–1682, doi:10.1002/art.27437.

370. Harris, R.E.; Chlebowski, R.T.; Jackson, R.D.; Frid, D.J.; Ascenseo, J.L.; Anderson, G.; Loar, A.; Rodabough, R.J.; White, E.; McTiernan, A.; et al. Breast Cancer and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Prospective Results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res* **2003**, *63*, 6096–6101.
371. Boland, G.P.; Butt, I.S.; Prasad, R.; Knox, W.F.; Bundred, N.J. COX-2 Expression Is Associated with an Aggressive Phenotype in Ductal Carcinoma in Situ. *Br J Cancer* **2004**, *90*, 423–429, doi:10.1038/sj.bjc.6601534.
372. Subbaramaiah, K.; Norton, L.; Gerald, W.; Dannenberg, A.J. Cyclooxygenase-2 Is Overexpressed in HER-2/Neu-Positive Breast Cancer: Evidence for Involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 18649–18657, doi:10.1074/jbc.M111415200.
373. Ristimäki, A.; Sivula, A.; Lundin, J.; Lundin, M.; Salminen, T.; Haglund, C.; Joensuu, H.; Isola, J. Prognostic Significance of Elevated Cyclooxygenase-2 Expression in Breast Cancer. *Cancer Res* **2002**, *62*, 632–635.
374. Chenevard, R.; Hürlimann, D.; Béchir, M.; Enseleit, F.; Spieker, L.; Hermann, M.; Riesen, W.; Gay, S.; Gay, R.E.; Neidhart, M.; et al. Selective COX-2 Inhibition Improves Endothelial Function in Coronary Artery Disease. *Circulation* **2003**, *107*, 405–409, doi:10.1161/01.CIR.0000051361.69808.3A.
375. Hodge, A.M.; English, D.R.; McCredie, M.R.E.; Severi, G.; Boyle, P.; Hopper, J.L.; Giles, G.G. Foods, Nutrients and Prostate Cancer. *Cancer Causes & Control* **2004**, *15*, 11–20, doi:10.1023/B:CACO.0000016568.25127.10.
376. Fortes, C.; Forastiere, F.; Farchi, S.; Mallone, S.; Trequattrinni, T.; Anatra, F.; Schmid, G.; Perucci, C.A. The Protective Effect of the Mediterranean Diet on Lung Cancer. *Nutrition and Cancer* **2003**, *46*, 30–37, doi:10.1207/S15327914NC4601_04.
377. Bosetti, C.; Altieri, A.; La Vecchia, C. Diet and Environmental Carcinogenesis in Breast/Gynaecological Cancers: *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **2002**, *14*, 13–18, doi:10.1097/00001703-200202000-00003.
378. Trichopoulou, A. Olive Oil and Breast Cancer. *Cancer Causes Control* **1995**, *6*, 475–476, doi:10.1007/BF00054153.
379. Stoneham, M. Olive Oil, Diet and Colorectal Cancer: An Ecological Study and a Hypothesis. *Journal of Epidemiology & Community Health* **2000**, *54*, 756–760, doi:10.1136/jech.54.10.756.
380. Khanal, P.; Oh, W.-K.; Yun, H.J.; Namgoong, G.M.; Ahn, S.-G.; Kwon, S.-M.; Choi, H.-K.; Choi, H.S. P-HPEA-EDA, a Phenolic Compound of Virgin Olive Oil, Activates AMP-Activated Protein Kinase to Inhibit Carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 545–553, doi:10.1093/carcin/bgr001.
381. Elnagar, A.Y.; Sylvester, P.W.; el Sayed, K.A. (–)-Oleocanthal as a c-Met Inhibitor for the Control of Metastatic Breast and Prostate Cancers. *Planta Medica* **2011**, *77*, 1013–1019.
382. Margarucci, L.; Monti, M.C.; Cassiano, C.; Mozzicafreddo, M.; Angeletti, M.; Riccio, R.; Tosco, A.; Casapullo, A. Chemical Proteomics-Driven Discovery of Oleocanthal as an Hsp90 Inhibitor. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5844, doi:10.1039/c3cc41858h.
383. Scotece, M.; Gómez, R.; Conde, J.; Lopez, V.; Gómez-Reino, J.J.; Lago, F.; Smith, A.B.; Gualillo, O. Oleocanthal Inhibits Proliferation and MIP-1 α Expression in Human Multiple Myeloma Cells. *Curr Med Chem* **2013**, *20*, 2467–2475, doi:10.2174/0929867311320190006.

384. Akl, M.R.; Ayoub, N.M.; Mohyeldin, M.M.; Busnena, B.A.; Foudah, A.I.; Liu, Y.-Y.; Sayed, K.A.E. Olive Phenolics as C-Met Inhibitors: (-)-Oleocanthal Attenuates Cell Proliferation, Invasiveness, and Tumor Growth in Breast Cancer Models. *PLoS One* **2014**, *9*, e97622, doi:10.1371/journal.pone.0097622.
385. Tusa, I.; Cheloni, G.; Poteti, M.; Silvano, A.; Tubita, A.; Lombardi, Z.; Gozzini, A.; Caporale, R.; Scappini, B.; Dello Sbarba, P.; et al. In Vitro Comparison of the Effects of Imatinib and Ponatinib on Chronic Myeloid Leukemia Progenitor/Stem Cell Features. *Targeted Oncology* **2020**, *15*, 659–671, doi:10.1007/s11523-020-00741-x.
386. Rowley, J.D. Letter: A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* **1973**, *243*, 290–293, doi:10.1038/243290a0.
387. Graham, S.M.; Jørgensen, H.G.; Allan, E.; Pearson, C.; Alcorn, M.J.; Richmond, L.; Holyoake, T.L. Primitive, Quiescent, Philadelphia-Positive Stem Cells from Patients with Chronic Myeloid Leukemia Are Insensitive to STI571 in Vitro. *Blood* **2002**, *99*, 319–325, doi:10.1182/blood.V99.1.319.
388. Hu, Y.; Swerdlow, S.; Duffy, T.M.; Weinmann, R.; Lee, F.Y.; Li, S. Targeting Multiple Kinase Pathways in Leukemic Progenitors and Stem Cells Is Essential for Improved Treatment of Ph⁺ Leukemia in Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 16870–16875, doi:10.1073/pnas.0606509103.
389. Giuntoli, S.; Rovida, E.; Barbetti, V.; Cipolleschi, M.G.; Olivotto, M.; Dello Sbarba, P. Hypoxia Suppresses BCR/Abl and Selects Imatinib-Insensitive Progenitors within Clonal CML Populations. *Leukemia* **2006**, *20*, 1291–1293, doi:10.1038/sj.leu.2404224.
390. Giuntoli, S.; Tanturli, M.; Di Gesualdo, F.; Barbetti, V.; Rovida, E.; Dello Sbarba, P. Glucose Availability in Hypoxia Regulates the Selection of Chronic Myeloid Leukemia Progenitor Subsets with Different Resistance to Imatinib-Mesylate. *Haematologica* **2011**, *96*, 204–212, doi:10.3324/haematol.2010.029082.
391. Corbin, A.S.; Agarwal, A.; Loriaux, M.; Cortes, J.; Deininger, M.W.; Druker, B.J. Human Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells Are Insensitive to Imatinib despite Inhibition of BCR-ABL Activity. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 396–409, doi:10.1172/JCI35721.
392. Bono, S.; Lulli, M.; D'Agostino, V.G.; Di Gesualdo, F.; Loffredo, R.; Cipolleschi, M.G.; Provenzani, A.; Rovida, E.; Dello Sbarba, P. Different BCR/Abl Protein Suppression Patterns as a Converging Trait of Chronic Myeloid Leukemia Cell Adaptation to Energy Restriction. *Oncotarget* **2016**, *7*, 84810–84825, doi:10.18632/oncotarget.13319.
393. Majmundar, A.J.; Wong, W.J.; Simon, M.C. Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell* **2010**, *40*, 294–309, doi:10.1016/j.molcel.2010.09.022.
394. Zhang, H.; Li, H.; Xi, H.S.; Li, S. HIF1 α Is Required for Survival Maintenance of Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. *Blood* **2012**, *119*, 2595–2607, doi:10.1182/blood-2011-10-387381.