

## **"L'Acido Clorogenico quale molecola naturale con potenziale azione anticancro: i suoi effetti biochimici e biologici in cellule di osteosarcoma umano"**

### **Ragioni della scelta del tema:**

Il cancro è una malattia altamente eterogenea e complessa e figura tra le principali cause di morbilità e mortalità in tutto il mondo [1].

Sebbene i continui progressi nella scienza dell'oncologia e della ricerca sul cancro stiano portando a risultati migliori per molti malati di cancro, nuove opzioni di trattamento sono fortemente richieste. La mono-terapia è ancora ampiamente impiegata per molti tipi di tumore, ma è generalmente meno efficace dell'approccio di chemioterapia combinata. Quest'ultima, recentemente, sta ricevendo molta attenzione al fine di trovare composti che potrebbero aumentare l'indice terapeutico dei farmaci antitumorali [2,3].

La terapia di combinazione è stata concettualizzata per la prima volta nel 1965 da Emil Frei, James F. Holland ed Emil J. Freireich che hanno proposto la possibilità della prima terapia combinata per la leucemia acuta. Più in dettaglio, i pazienti pediatrici con leucemia linfocitica acuta sono stati trattati con la combinazione di metotrexato, 6-mercaptopurina, vincristina e prednisone (formalmente noto come regime POMP) e si è dimostrato efficace nel ridurre il carico tumorale e prolungare la remissione. Dal successo del regime POMP, la terapia di combinazione del cancro ha ricevuto maggiore attenzione e la ricerca si è concentrata sullo studio di terapie combinate che mirano a percorsi diversi per indurre un effetto sinergico o additivo [4].

Pertanto, utilizzando una combinazione di composti che prendono di mira percorsi diversi, un effetto sinergico o di potenziamento potrebbe produrre risultati antitumorali significativi.

In effetti, la combinazione di due o più trattamenti terapeutici per indirizzare specificamente la via di induzione del cancro o di sostegno cellulare sta diventando una base della terapia oncologica. Gli agenti utilizzati in questi trattamenti funzionano in modo sinergico o additivo, e quindi è richiesto un dosaggio terapeutico inferiore di ciascun farmaco [5,6].

Inoltre, è stato osservato che la chemioterapia combinata, in molti casi, previene gli effetti tossici sulle cellule normali producendo contemporaneamente effetti citotossici sulle cellule tumorali. Ciò può verificarsi se un farmaco nel regime di combinazione è antagonista, in termini di citotossicità, a un altro farmaco nelle cellule normali, proteggendo essenzialmente le cellule non cancerose dagli effetti citotossici [7].

A questo proposito, molecole presenti in natura con attività antitumorale e con la minore tossicità per i tessuti normali si propongono come possibili candidati intriganti da studiare per la loro efficacia sinergica in combinazione con farmaci antineoplastici convenzionali [7,8]. Inoltre, il concetto di chemioprevenzione sta guadagnando sempre più attenzione nel cancro; in particolare, la chemioprevenzione del cancro da parte di composti naturali, in particolare sostanze fitochimiche, minerali e vitamine, ha mostrato risultati promettenti contro varie neoplasie maligne in numerosi studi sia in vitro che in vivo. Nello sviluppo di sostanze chimiche bioattive,

i prodotti naturali di piante medicinali hanno una storia ricca e lunga e rappresentano un'area di ricerca molto interessante per nuove strategie terapeutiche antitumorali [9,10].

Tra i composti naturali delle piante medicinali, l'Acido Clorogenico (CGA) può essere suggerito come una molecola interessante da utilizzare nella terapia del cancro.

Il CGA è un composto difenolico derivato dall'esterificazione di acidi idrossicinnamici (inclusi caffeico, ferulico e p-cumarico) con acido chinico [11]. È presente in quantità rilevante nei chicchi di caffè verde e in altri composti di origine vegetale come erbe, frutta e verdura [12]. Oltre alle sue proprietà antimicrobiche, antinfiammatorie e antiossidanti, diversi studi hanno evidenziato un possibile ruolo antitumorale del CGA in diversi modelli cancerosi, tra cui leucemia, epatocarcinoma e cancro al seno [13,14,15]. Al contrario, però, limitate restano ancora le evidenze riguardo il ruolo del CGA in Osteosarcoma (OS).

L'alto tasso metastatico e la mancanza di una terapia efficace rendono la OS un tumore pediatrico e adolescenziale molto aggressivo il cui esito clinico rimane estremamente scarso. Nonostante l'approvazione clinica di nuovi chemioterapici e formulazioni, la Doxorubicina (Doxo) rimane ancora una pietra miliare per la gestione della OS e la terapia basata su Doxo costituisce il partner ampiamente utilizzato nella terapia di combinazione. Sfortunatamente, il limitato tasso di successo del trattamento con Doxo, così come la relativa facilità nello sviluppo di chemioresistenza e cardiotossicità, sta chiedendo a gran voce approcci terapeutici più efficaci nella OS. Attualmente, sono necessarie nuove strategie terapeutiche efficienti per la cura della OS; a questo proposito la chemioterapia combinata, che promette una maggiore efficacia e una minore tossicità dei farmaci antitumorali clinici, è costantemente oggetto di studio [16].

Per tutte le ragioni sopra citate, lo scopo del mio lavoro di tesi è stato quello di studiare gli effetti biologici del CGA da solo e in combinazione con uno dei farmaci antitumorali convenzionalmente utilizzato nella cura dell'OS, ovvero la Doxo. Oltre all'OS, Doxo è attualmente approvato per il trattamento di altri disordini neoplastici, quali ad esempio tumori ginecologici, alla mammella e al polmone [16]. Purtroppo, oltre ai meccanismi di resistenza che le cellule neoplastiche sviluppano nel corso del tempo, l'impiego in ambito oncologico della Doxo è fortemente limitato dalla tossicità cardiovascolare che si manifesta sia nei pazienti oncologici che nei sopravvissuti. L'impiego del CGA nella terapia di combinazione potrebbe aumentare l'azione farmacologica della Doxo e minimizzare i suoi effetti collaterali, in particolare quelli dovuti alla cardiotossicità.

Con lo scopo di affrontare ulteriormente la candidatura CGA nel trattamento della OS, qui abbiamo mostrato il potenziale risultato del solo CGA e la sua interazione dinamica con Doxo in diverse cellule OS.

### **Principali acquisizioni e risultati ottenuti:**

L'approccio sperimentale ha previsto, inizialmente, lo studio degli effetti del CGA sulla vitalità cellulare, crescita cellulare e capacità di formare colonie in diverse linee cellulari di OS. I nostri esperimenti dimostrano che il CGA esercita significativi effetti inibitori di crescita e vitalità su U2OS, MG-63 e SAOS-2 con una sensibilità diversa tra loro (U2OS e MG-63 sono rispettivamente le più e meno sensibili). Esperimenti analoghi sono stati condotti anche in linee cellulari non tumorali (NIH3T3), al fine di escludere un'azione citotossica generica del CGA e

per ulteriormente rafforzare la sua azione antitumorale. In maniera interessante, osserviamo che il CGA non impatta in alcun modo sulla crescita delle NIH3T3. Inoltre, abbiamo rilevato che l'esposizione al CGA influenza la divisione del ciclo cellulare e causa la morte cellulare in U2OS principalmente per induzione dell'apoptosi, come suggerito dall'aumento del tasso apoptotico e dall'attività di caspase-3 e PARP. In aggiunta, i nostri dati riconoscono l'efficacia del CGA nel migliorare l'effetto terapeutico mediato dalla Doxo nelle cellule di OS. In particolare, sebbene il CGA abbia influenzato in modo diverso i comportamenti di U2OS e MG-63, il trattamento combinato con la Doxo ha ulteriormente compromesso la vitalità e la crescita delle cellule, nonché la capacità di formazione di colonie, rispetto ai singoli agenti. D'altronde, sebbene il CGA influenzi la suscettibilità alla Doxo sia nelle cellule vive che in quella morte, il suo impatto è decisamente più pronunciato sulla porzione non vivente. Questa ipotesi è ulteriormente supportata dalla successiva analisi del clivaggio della caspase-3 e PARP, che ha rivelato il più alto tasso apoptotico dopo la co-somministrazione CGA con Doxo. Inoltre, nei nostri esperimenti il CGA influenza in modo opposto le cellule dell'OS e le cellule cardiache quando co-impiegato con Doxo. Mentre il CGA aumenta la tossicità indotta dalla Doxo nelle cellule di OS, è osservato invece un miglioramento dei parametri di vitalità dei cardiomiociti H9c2, rilevato sia mediante esperimenti di conte cellulari che di analisi FACS. Successivamente, l'attività di ricerca si è rivolta alla caratterizzazione dei meccanismi d'azione alla base dell'attività antiproliferativa e proapoptotica indotta dal CGA in OS. A tal proposito, e in linea con alcune delle evidenze scientifiche presenti, risultati significativi evidenziano un importante coinvolgimento del *pathway delle MAPK* e in particolare di p44/42 [17,18]. Nel dettaglio, abbiamo osservato che gli effetti antiproliferativi/proapoptotici indotti dal CGA nelle cellule U2OS sono accompagnati da un forte aumento della fosforilazione di p44/42. L'uso del composto PD98059, noto inibitore di MEK1/MEK2, aumenta l'inibizione della crescita cellulare rispetto al CGA da solo, inducendo morte. Data la capacità del CGA di modulare p44/42 MAPK, abbiamo studiato l'influenza della combinazione CGA/Doxo su questa via di segnalazione. Contrariamente a quanto osservato con i singoli farmaci, la combinazione riduce nettamente i livelli della fosforilazione di p44/42. Anche in questo caso, l'impiego dell'inibitore PD98059 ha promosso l'efficacia del trattamento combinato, suggerendo così un potenziale contributo alla sensibilizzazione della Doxo mediata dal CGA. Sulla base dei risultati fin qui ottenuti, i nostri dati rafforzano significativamente l'evidenza dell'attività antitumorale in vitro da parte del solo CGA e nel co-trattamento con la Doxo, incoraggiando fortemente la progettazione di futuri studi in vivo/clinici al fine di studiare il CGA come "sensibilizzante" di farmaci antitumorali per un possibile uso nella terapia dell'OS.

### **Conclusioni e prospettive future:**

I nostri risultati forniscono prove di potenziali effetti sinergici tra CGA e Doxo nel limitare la progressione dell'OS. Oltre a supportare la caratteristica antineoplastica, i nostri dati riconoscono l'uso terapeutico di CGA nella cura dell'OS, potenzialmente come partner nella terapia di combinazione basata su Doxo.

In effetti, i dati ottenuti arricchiscono di molto le evidenze presenti nel modo scientifico a sostegno del CGA, quale molecola naturale, con chiari effetti anti-tumorali "in vitro", e certamente incoraggiano studi futuri "*in vivo/clinici*" finalizzati ad esplorare il CGA quale "safe molecule" in grado di potenziare gli effetti di farmaci antitumorali, per possibile impiego nella terapia del cancro.

In conclusione, considerando l'attuale stato di orfano di questa malattia, la scoperta di strategie farmacologiche nuove e più efficaci potrebbe aiutare a migliorare sia la prognosi che la sopravvivenza dei pazienti affetti da OS. A questo proposito, i nostri promettenti risultati in vitro potrebbero incoraggiare lo sviluppo di futuri studi supplementari volti ad affrontare la fattibilità dell'approvazione di CGA in combinazione con Doxo nella pratica clinica.

## Referenze:

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011; 144:646–674.
2. Costello LC, Franklin RB. The genetic/metabolic transformation concept of carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2012; 31:123–130.
3. Yap TA, Omlin A, de Bono JS. Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways. *J Clin Oncol*. 2013 Apr 20; 31(12):1592-605.
4. Frei E 3rd, Karon M, Levin RH, Freireich EJ, Taylor RJ, Hananian J, Selawry O, Holland JF, et al. The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood*. 1965 Nov; 26(5):642-56.
5. Albain KS, Nag SM, Calderillo-Ruiz G, Jordaan JP, Llombart AC, Pluzanska A, Rolski J, Melemed AS, Reyes-Vidal JM, Sekhon JS, Simms L, O'Shaughnessy J. Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *J Clin Oncol*. 2008 Aug 20; 26(24):3950-7.
6. Mokhtari RB, Kumar S, Islam SS, Yazdanpanah M, Adeli K, Cutz E, Yeger H. Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines. *BMC Cancer*. 2013 Aug 8; 13:378.
7. Blagosklonny MV. Overcoming limitations of natural anticancer drugs by combining with artificial agents. *Trends Pharmacol Sci*. 2005 Feb;26(2):77-81. Yan, Y., et al, *Chlorogenic acid inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo*. *J Nutr Biochem*, 2017.
8. Naviglio S. & Della Ragione F., *Naturally occurring molecules and anticancer combination therapies in the era of personalized medicine and economic crisis*. *Curr Pharm Des*, 2013.
9. Shanmugam N., Scott J.X., Kumar V., et al. *Multidisciplinary management of hepatoblastoma in children: Experience from a developing country*. *Pediatr Blood Cancer*, 2017.
10. Greenwell M. & Rahman P.K. *Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment*. *Int J Pharm Sci Res*, 2015.
11. Naveed M., Veghar H., Muhammad A., et al. *Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research*. *Biomed Pharmacother*, 2018.
12. Tajik N., Tajik M., Mack I., et al. *The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature*. *Eur J Nutr*, 2017.
13. Rakshit S., Mandal L., Pal B. C., et al. *Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells*. *Biochemical Pharmacology*, 2010. Shanmugam N., Scott J.X., Kumar V., et al. *Multidisciplinary management of hepatoblastoma in children: Experience from a developing country*. *Pediatr Blood Cancer*, 2017.

14. Liu Y., Feng Y., Li Y., et al. *Chlorogenic acid decreases malignant characteristics of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting DNMT1 expression*. *Front. Pharmacol*, 2020.
- 15 Deka S., Gorai S., Manna D., et al. *Evidence of PKC binding and translocation to explain the anticancer mechanism of chlorogenic acid in breast cancer cells*. *Current Molecular Medicine*, 2017.
16. Sritharan, S., et al., *A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin*. *Life Sci*, 2021.
17. Wei, M., et al., *Natural Polyphenol Chlorogenic Acid Protects Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity by Activating ERK/Nrf2 Antioxidative Pathway*. *Toxicol. Sci*, 2018.
18. Gao, W., et al., *Acid Attenuates Dextran Sodium Sulfate-Induced Ulcerative Colitis in Mice through MAPK/ERK/JNK Pathway*. *BioMed Res. Int*, 2019.