



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche

Dottorato di Ricerca
in

MEDICINA INTERNA CLINICO-SPERIMENTALE
(XXXII ciclo)

Curriculum:
Fisiopatologia e Clinica delle Malattie Renali, Cardiovascolari e
dell'Ipertensione Arteriosa

Coordinatore: Prof. Marcello Bagnasco

RUOLO DEI FIBROBLASTI CARDIACI
NELLA CARDIOTOSSICITÀ DA
DOXORUBICINA

Relatore
Prof. Pietro Ameri

Candidata
Dott.ssa Clarissa Ruggeri

Indice

1. Riassunto	1
2. Introduzione	3
2.1. Il cuore	3
2.2. Doxorubicina: indicazioni terapeutiche ed effetti indesiderati.....	5
2.3. L'attività molecolare della Doxorubicina ed il suo impatto nella cardiotoxicità.....	9
2.4. I fibroblasti cardiaci.....	13
3. Scopo.....	15
4. Disegno sperimentale, materiali e metodi.....	16
4.1. Colture cellulari e disegno sperimentale.....	16
4.1.1. Fibroblasti cardiaci umani.....	16
4.1.2. Fibroblasti cardiaci e cardiomiociti murini.....	17
4.2. Saggio β -Galattosidasi.....	18
4.3. Immunofluorescenza.....	18
4.4. Secrezione del collagene.....	19
4.5. Western Blot.....	19
4.6. Potenziale di membrana mitocondriale.....	20
4.7. Proliferazione cellulare.....	20
4.8. Cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa (LC-MS).....	21
4.9. Analisi statistica.....	21
5. Risultati.....	22
5.1. La Doxorubicina induce la senescenza nei fibroblasti cardiaci umani e ne causa il rimodellamento cellulare.....	22
5.2. La Doxorubicina induce l'espressione di p53, coinvolta nella patogenesi molecolare dei Fibroblasti Cardiaci Umani.....	24
5.3. Il danno indotto dalla Doxorubicina nei Fibroblasti Cardiaci Umani è in parte mediata da TGF- β	28
5.4. I Fibroblasti Cardiaci, esposti alla Doxorubicina, rivelano un'attività paracrina a carico dei cardiomiociti contigui.....	30

5.5 L'effetto paracrino dei Fibroblasti Cardiaci, esposti alla Doxorubicina, è causato da fattori SASP di diverso peso molecolare.....	33
5.6. I Fibroblasti Cardiaci umani, esposti alla Doxorubicina, attivano un segnale autocrino.....	37
6. Discussione.....	38
7. Bibliografia.....	42

1. Riassunto

Le terapie antitumorali sono note cause di complicazioni cardiache irreversibili nei pazienti trattati. Numerosi sono gli studi che hanno definito i meccanismi con cui i trattamenti chemioterapici portano a danni cardiaci. In modo intrinseco, le antracicline influenzano l'integrità dei cardiomiociti, provocando in combinazione stress ossidativo, disfunzione mitocondriale, danni nella struttura del DNA ed alterazioni nel metabolismo energetico. Negli ultimi anni sono state numerose le intuizioni circa i meccanismi alla base della patogenesi dei cardiomiociti, indotta dalla Doxorubicina (DOX): un antibiotico antraciclinico, ad azione antineoplastica, che possiede un ampio spettro antitumorale. Ben poco, invece, è stato scoperto sull'effetto di questi farmaci sui fibroblasti cardiaci: l'attivazione di queste cellule e la fibrosi miocardica, che ne deriva, sono gli aspetti che caratterizzano la cardiomiopatia da DOX. L'insieme di questi eventi, tuttavia, sono considerati secondari alla lesione dei cardiomiociti, e si ritiene che abbiano un esordio tardivo nel corso della cardiotossicità, e quindi un impatto biologico minore. La componente cardiomiocitica, in un cuore adulto, rappresenta circa il 25-35% della popolazione cellulare; la restante parte è occupata da cellule di natura non cardiomiocitica (endoteliali, leucociti, cellule muscolari lisce, periciti e fibroblasti): un sistema equilibrato e sinergico, che garantisce la stabilità organica, solo se ogni componente è in grado di mantenere la sua omeostasi. Per tale ragione abbiamo ipotizzato che la DOX potesse esercitare effetti diretti e biologicamente rilevanti sui fibroblasti. Per verificare la nostra ipotesi, abbiamo, in un primo momento, studiato il comportamento dei fibroblasti cardiaci primari (HCF, *Human Cardiac Fibroblast*), isolati dalle appendici atriali destre, di pazienti sottoposti a chirurgia cardiaca elettiva, con circolazione extracorporea. Successivamente ci siamo avvalsi di colture primarie di cardiomiociti e fibroblasti cardiaci, ottenuti dai cuori di topi neonatali, per comprendere se i fibroblasti trattati con la DOX fossero in grado di influenzare le cellule contigue del miocardio.

Per i nostri esperimenti, HCF, ottenuti per digestione enzimatica, sono stati trattati con DOX 0,3 μ M, una concentrazione subapoptotica; è stata studiato, in queste condizioni, lo stato di senescenza cellulare (SA β -Gal ed immunofluorescenza per p16^{INK4}), lo stato di proliferazione (saggio citofluorimetrico per CFSE), l'apoptosi (immunofluorescenza per

caspasi 3 clivata), l'attivazione fibroblastica (immunofluorescenza per α -SMA e colorazione con Picro-Sirius red) ed il coinvolgimento di p53 (western blot). Esperimenti di tipo funzionale sono stati condotti per meglio comprendere il coinvolgimento dei *pathway* di p53 e TGF- β nella disfunzione cardiaca da DOX: le cellule sono state, per tanto, trattate con pifitrina- α (PFT, inibitore di p53) e GW788388 (GW, inibitore del recettore di TGF- β). La DOX, nella concentrazione testata, induce la senescenza nei HCF trattati, i quali appaiono morfologicamente più estesi ed appiattiti, con aumentata espressione di SA β -Gal e p16^{INK4a}, rispetto alle cellule di controllo, guidata da un aumento nell'espressione di p53, e con un'attività proliferativa contenuta. La DOX induce anche la deposizione di collagene e α -SMA nei miofibroblasti. I pretrattamenti con PFT e GW si sono rivelati essenziali per prevenire lo *switch* fenotipico dei HCF in miofibroblasti. Questi effetti sono altresì evidenti nel caso dell'effetto autocrino di HCF, trattati con il mezzo di coltura condizionato di altri HCF (precedentemente trattati con DOX 0,3 μ M per 3 ore e mantenuti in coltura per 2 ore in condizioni *serum free*, per ottenere il mezzo di coltura condizionato). Per meglio comprendere la presenza di un *cross-talk* tra le cellule che compongono il cuore, cardiomiociti (nMCM, *neonatal Mouse Cardiomyocyte*) e fibroblasti (nMCF, *neonatal Mouse Cardiac Fibroblast*) murini neonatali sono stati ottenuti per digestione enzimatica, da cuori di topi di 1-2 giorni (C57BL/6), e cresciuti nel loro specifico terreno di crescita. nMCF sono stati trattati con DOX 0,5 μ M per tre ore e mantenuti in coltura per le due ore successive in terreno *serum free*; il mezzo condizionato (CM, *Conditioned Medium*), contenente il secretoma dei miofibroblasti è stato utilizzato per trattare i nMCM e studiarne l'effetto paracrino. L'analisi del CM di nMCF ci ha permesso di escludere la presenza di DOX o suoi metaboliti, ma il secretoma dei nMCF è sufficiente ad indurre la senescenza nei nMCM, che mostrano un'incrementata attività SA β -Gal, senza intaccare l'integrità mitocondriale.

I fibroblasti, diversamente da quanto noto fino ad oggi, sono profondamente danneggiati dalla DOX, ed influenzano in maniera paracrina i cardiomiociti contigui, provocando lesioni, per mezzo del loro secretoma, e non per effetto dei metaboliti della DOX. Ulteriori studi saranno necessari per caratterizzare i fattori secreti dai fibroblasti, implicati nella patogenesi della cardiotoxicità.

2. Introduzione

2.1. *Il cuore*

Il cuore è un complesso organo, muscolare cavo, ed il propulsore essenziale per inviare, attraverso la sua articolata rete vascolare e secondo il circolo sanguigno, molecole di ogni tipologia, importanti per tutti i tessuti, di cui ciascun organismo animale è composto.

Il cuore si compone di due metà indipendenti, ciascuna delle quali è composta da una porzione superiore, l'atrio, ed una inferiore, il ventricolo. L'atrio e il ventricolo destro spingono il sangue nei polmoni per realizzare lo scambio di ossigeno e anidride carbonica (circolazione polmonare); mentre l'atrio e il ventricolo sinistro spingono il sangue in tutti i tessuti dell'organismo (circolazione sistemica). Ogni atrio comunica con il sottostante ventricolo per mezzo di un apparato valvolare atrioventricolare. Alle cavità atriali giungono le vene, mentre dai ventricoli si originano le arterie. Le contrazioni ritmiche del muscolo cardiaco consentono di spingere il sangue nelle arterie, mentre il flusso unidirezionale attraverso il cuore è garantito dalla presenza delle valvole. Si tratta quindi di una macchina, strutturata con più comparti, sincroni tra loro, che garantiscono la regolazione della temperatura corporea, la comunicazione per via umorale tra le diverse parti dell'organismo, e la regolazione dell'afflusso di ossigeno e di sostanze nutritive in condizioni fisiologiche diverse.

Anatomicamente, il cuore si compone di una sacca più esterna: il pericardio parietale, di composizione fibrosa, che limita l'espansione eccessiva del cuore, tenendolo in posizione del mediastino; all'interno si sviluppa il pericardio viscerale, una sacca di natura seriosa contenente il liquido pericardico, che consente movimenti tissutali fluidi e senza attrito; a cui segue l'epicardio, intermedio, anch'esso di composizione mista, epiteliale e connettivale. Segue il sub-epicardio: un tessuto connettivo, contenente grasso, capillari sanguigni e linfatici, e fibre nervose. Più internamente, ritroviamo il miocardio, composto da fibre muscolari cardiache, avvolte da uno scheletro fibroso di sostegno (**Figura 2.1**).

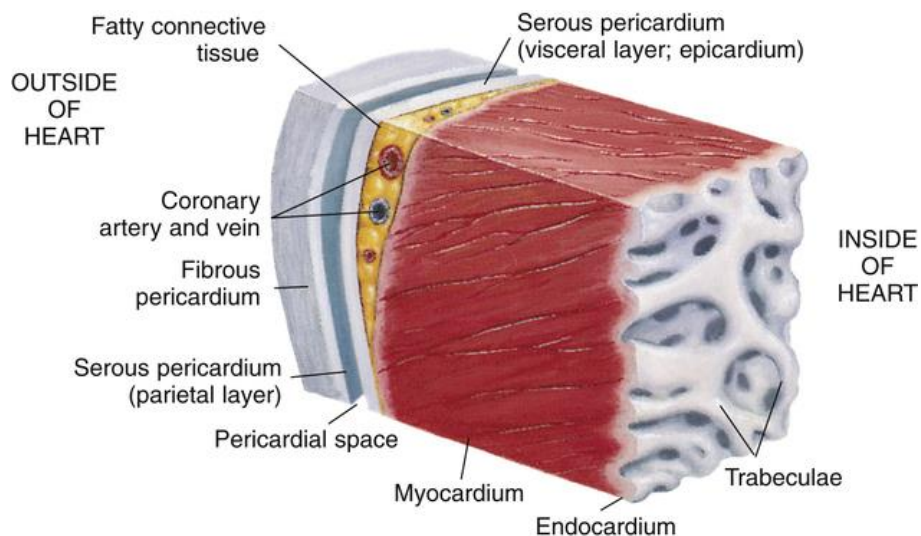


Figura 2.1. Sezione trasversale delle pareti che compongono il cuore. [1]

È noto in letteratura che il cuore è costituito da una massa cellulare cardiaca, rappresentata dalle cellule muscolari cardiache o cardiomiociti (25-35% dell'intera popolazione cellulare) [2], di natura contrattile, delle quali solo l'1% genera spontaneamente il potenziale d'azione. Della componente non cardiomiocitica fanno parte le cellule endoteliali (60%), i leucociti (9%), le cellule muscolari lisce, i periciti (3%) ed i fibroblasti (15%) [3]. Il cuore è una complessa struttura, inter ed intra-compartimentale, in cui l'elevata eterogeneità cellulare, non rappresenta un limite nell'equilibrio e nella comunicazione cellula-cellula. Bensì è stato dimostrato, dall'analisi delle composizioni cellulari e dalle loro interazioni, nei cuori adulti umani, che la contrattilità ed il metabolismo dei cardiomiociti sono i principali fattori dei cambiamenti a carico della funzionalità cardiaca. Inoltre, la regolazione comportamentale dei cardiomiociti è influenzata dalla componente cellulare non cardiomiocitica, che, nel caso di lesioni importanti, cerca di mantenere la funzione contrattile del cuore e, se necessario prende il posto vacante dei cardiomiociti [4].

2.2. Doxorubicina: indicazioni terapeutiche ed effetti indesiderati

La Doxorubicina (DOX) (o Adriamicina) è un antibiotico antineoplastico, ad ampio spettro, appartenente alla famiglia delle antracicline: prodotti naturali, derivati dallo *Streptomyces peucetius*, note già nel 1939 come sostanze antimicrobiche, ma sebbene troppo tossiche, sono state caratterizzate molecularmente e riconosciute come utili agenti antitumorali, solo in seguito. In particolare, la DOX è impiegata per la cura di numerosi tumori (vescica, seno, polmoni, stomaco e ovaie) del linfoma di Hodgkin e non-Hodgkin, alcuni tipi di leucemia (incluse la leucemia linfoblastica acuta e mieloide acuta) e contro i sarcomi dei tessuti molli o delle ossa (neuroblastoma, il tumore di Wilms, il cancro all'utero, all'endometrio e alla cervice, i tumori alla prostata, al pancreas, al surrene, al fegato, il sarcoma di Kaposi e quello di Ewing, il mesotelioma).

Sebbene la DOX rappresenti un valido mezzo per combattere uno dei più diffusi nei che affliggono la società, allo stesso tempo, nel corso degli anni, si è ormai consolidato il coinvolgimento dei trattamenti antitumorali nelle disfunzioni acute e croniche a carico di diversi organi, in particolare il cuore. L'età dei pazienti, la dose somministrata, e cumulativa nel tempo, rappresentano un fattore di rischio per il progressivo danno a carico del miocardio, che potrebbe sfociare nell'insufficienza cardiaca congestizia [5,6]: la cardiotossicità compromette, pertanto, la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti oncologici, indipendentemente dalla prognosi chemioterapica.

Secondo la definizione di cardiotossicità, adottata nelle linee guida ESMO [7] per la gestione del danno cardiaco da chemioterapici, si fa riferimento all'insorgenza di una o più disfunzioni, in elenco di seguito:

- ✓ riduzione della Frazione di Eiezione del Ventricolo Sinistro (FEVS) globalmente o principalmente del setto interventricolare;
- ✓ segni o sintomi di scompenso cardiaco;
- ✓ riduzione della FEVS di almeno 5% ad un valore <55%, in presenza di segni o sintomi di scompenso cardiaco;
- ✓ riduzione della FEVS di 10% ad un valore <55% in pazienti asintomatici.

I fattori di rischio, per la cardiotossicità, non sono solo correlati alla dose cumulativa di antracicline nel corso degli anni, o alla somministrazione di dosi singole elevate, ma anche all'età (pazienti in età pediatrica sotto i 5 anni, o in età avanzata superiore a 65 anni), al

nesso femminile, a fattori di rischio cardiovascolare (ipertensione arteriosa, diabete mellito, ipercolesterolemia, fumo, obesità), a cardiopatie pre-esistenti (o predisposizione genetica), all'insufficienza renale, ed a chemioterapie o terapie biologiche concomitanti.

La tossicità che colpisce il cuore a causa degli agenti chemioterapici, si può caratterizzare per i diversi aspetti clinico-patologici, in cardiotossicità di tipo I, permanente, o di tipo II, reversibile (**Figura 2.2**). La tossicità di tipo I (da DOX) è caratterizzata dalla perdita cellulare, mentre i farmaci di tipo II causano principalmente alterazioni mitocondriali. È stato recentemente dimostrato che la cardiotossicità da antracicline può essere revertita nell'80% dei casi di pazienti trattati preventivamente [9] (**Figura 2.3**). Infatti nel corso degli anni, numerosi studi hanno consentito di individuare alcune molecole, dal potenziale cardioprotettivo, al fine di prevenire, o se possibile, revertire il danno cardiaco da antracicline. Tra queste:

- ✓ dexrazoxano, chelante dei metalli, sperimentato ed approvato in Europa come agente cardioprotettivo in pazienti con carcinoma mammario in stadio avanzato, riceventi chemioterapia con antracicline oltre certe dosi cumulative.
- ✓ ACE inibitori;
- ✓ β -bloccanti (carvedilolo, nebivololo, bisoprololo tali farmaci presentano il vantaggio di un costo ridotto).

Si tratta in ogni caso di cure preventive, che in taluni casi possono essere somministrate solo a pazienti adulti con carcinoma alla mammella in stadio avanzato (dexrazoxano) o, non sempre gli studi su *trial clinici* hanno individuato un successo garantito dopo il trattamento (β -bloccanti).

TYPE I e.g. Doxorubicin	TYPE II e.g. Trastuzumab
Cellular death Damage starts with first administration	Cellular dysfunction
Biopsy changes	No typical biopsy changes
Cumulative dose related	Not cumulative dose related
Permanent damage (Myocyte death)	Predominately reversible (Myocyte dysfunction)
Risk factors Combination chemotherapy Prior/concurrent radiotherapy Age Previous cardiac disease Hypertension	Risk factors Paclitaxel Prior/concurrent anthracycline Age Previous cardiac disease Obesity (BMI > 25kg/sm)

Figura 2.2. Cardiotossicità di tipo I e di tipo II [8].

<i>Anticancer agents</i>	<i>Prevention strategy</i>	<i>Rationale/mechanisms of action</i>
Anthracyclines	Lowering of lifetime cumulative doses	Dose-dependent cardiotoxicity
	Usage of epirubicin, less cardiotoxic than doxorubicin	
	Avoiding bolus, preferring infusional schedules	
	Liposomal formulations	
	Dexrazoxane	
	ACE-1, ARBs	Lowering oxidative stress, preventing the interactions between anthracyclines and Top2 β
	β blockers	Lowering oxidative stress, reducing interstitial fibrosis, enhancing intracellular calcium handling, cardiomyocyte metabolism, and mitochondrial function
	HMG-CoA reductase inhibitors	Preserving EGF signaling <i>via</i> a β -arrestin-dependent mechanism, lowering oxidative stress, improving lusitropy
	Ranolazine	Inhibiting Top2 β -mediated DNA damage, antioxidant, and anti-inflammatory effects
	PDE-5 inhibitors	Lowering oxidative stress
	Physical exercise	Anti-apoptotic effects
Anti-ErbB2	ACE-1, ARBs	Lowering oxidative stress and pro-apoptotic signaling, enhancing calcium handling, and enhancing myocardial energetics
	β -blockers	Decrease in angiotensin-induced blockade of NRG1/ErbB pathway
Anti-angiogenic drugs (sorafenib and sunitinib)	Anti-hypertensive treatment (with ACE-1 and ARBs, β blockers, dihydropyridine calcium channel blockers, diuretics)	Stimulating β -arrestin-dependent signaling, with subsequent activation of ErbB2-mediated cardioprotective pathways
	Metformin	Counteracting hypertension-dependent cardiac damage
		Enhancing myocardial energetics <i>via</i> activation of cAMP-kinase

Figura 2.3. Trattamento preventivo per la cardiotoxicità indotta da antracicline [10].

Una strategia sfruttata per ridurre la cardiotoxicità da antracicline è rappresentata dall'inclusione della molecola in vescicole unilamellari di fosfolipidi insaturi, denominate liposomi. Tale formulazione delle antracicline liposomiali consente un apporto aumentato del farmaco a livello del tessuto tumorale, grazie all'elevata permeabilità capillare della microcircolazione tumorale, limitandone invece l'accumulo nei tessuti sani. Inoltre, l'immagazzinamento nel cuore è particolarmente ridotto, in quanto le *tight junction* dei cardiomiociti, fungono da barriera ai liposomi. Sin dagli anni '90 è in commercio una forma liposomale pegilata della doxorubicina (Caelyx in Europa), utilizzata nel trattamento del carcinoma mammario metastatico, del carcinoma ovarico in stadio avanzato, del sarcoma di Kaposi AIDS-correlato e del mieloma multiplo refrattario/recidivante. Il polimero di rivestimento (polietilen-glicole, PEG) favorisce l'evasione dai fagociti mononucleati, stabilizza la molecola, e ne riduce l'adesione cellulare, endoteliale, o ad altre superfici. Una formula di DOX liposomiale non-pegilata (Myocet) è entrata in commercio nel 2000, per il solo trattamento del carcinoma mammario metastatico. Vari studi hanno dimostrato la ridotta cardiotoxicità delle formulazioni liposomiali rispetto a quelle libere, e l'aumentata efficacia in pazienti con carcinoma mammario in stadio avanzato [11]. Le formulazioni liposomiali,

oltre alla ridotta cardiotoxicità e ad un potere d'azione più specifico, rappresentano un vantaggio in termini di qualità di vita per i pazienti; infatti, garantiscono ridotta mielotossicità, nausea, vomito e dolore. Un limite è rappresentato dal fatto che si tratta ancora di molecole in fase di studio, e che per ora non sono state diagnosticate per altre tipologie di tumore.

La tempistica, con cui insorge la disfunzione cardiaca nei pazienti oncologici, determina la distinzione di tre tipologie di cardiotoxicità: acuta (si manifesta entro due settimane dalla singola dose, o ciclo completo di terapia); cronica-precoce, con manifestazioni di cardiomiopatia dilatativa ed insufficienza cardiaca (entro un anno dal termine del trattamento chemioterapico); cronica-tardiva (con sviluppo ed insorgenza anche dieci anni dal termine del trattamento antitumorale) [12]. Studi prospettici sulle disfunzioni cardiache, sviluppate nel tempo dai pazienti oncologici, hanno imputato alla DOX, l'insorgenza di disfunzioni cardiache ventricolari, con un'incidenza del 3/26%, in pazienti ricevuti una dose cumulativa di 550mg/m² [5,6]. Generalmente una dose elevata di DOX è in grado di indurre, entro 2-3 giorni, l'insorgenza di una cardiotoxicità di tipo acuto, con un intervallo QT prolungato (descrive l'attività elettrica ventricolare) [13], in particolare nei pazienti con età superiore ai 65 anni e nei bambini fino a 5 anni; ma in questi casi, l'efficienza cardiaca può essere recuperata e gestita clinicamente [14]. È possibile che, a distanza di 10 anni o più, si manifesti una cardiotoxicità di tipo cronico, caratterizzata da una disfunzione ventricolare, non più clinicamente trattabile e curabile.

Ai meccanismi di prevenzione primaria della cardiotoxicità (terapie preventive, formulazioni di antracicline liposomiali, studi dei casi clinici e di possibili fattori di rischio, rimodulazioni della dose cumulativa di chemioterapico) si affiancano metodi di prevenzione secondaria all'insorgenza del danno: supportati da appropriate tecniche di diagnosi non invasiva di cardiotoxicità (ecografia 2D e 3D, risonanza magnetica cardiaca, scintigrafia miocardica) e di cardiotoxicità subclinica (con *biomarker* di disfunzione ventricolare sinistra come troponina, peptidi natriuretici [15]; *global longitudinal strain* e il doppler tissutale [16]).

Gli studi sulla gestione preventiva della cardiotoxicità da DOX, o sul recupero della funzionalità cardiaca, dopo l'insorgenza, sono supportati e dipendono dai continui studi che tentano di spiegare il meccanismo molecolare, che è alla base del danno e ne causa l'insufficienza ventricolare.

solo alcuni sono stati scientificamente provati, e non tutti sono ancora stati identificati; tra quelli noti non si conosce quale sia, ed in che misura, il principale responsabile della tossicità. Inoltre la rilevanza dei meccanismi d'azione varia a seconda della tipologia di tumore trattato, in quanto varia la sensibilità delle cellule, ed in certi casi si può verificare una resistenza alla tipologia di meccanismo analizzato. Ma d'altro canto l'impiego della DOX genera un evento di danno cardiaco immediatamente, o a distanza di anni, che si manifesta essenzialmente con una disfunzione ventricolare sinistra, e che può sfociare in una cardiomiopatia dilatativa.

Numerosi studi *in vitro* hanno dimostrato un accumulo nucleare di DOX e dei suoi metaboliti [18, 19, 20], ed hanno considerato questo aspetto, una delle principali cause di tossicità dell'antraciclina. In particolare è stato individuato il meccanismo alla base della permeazione attraverso la membrana nucleare: la DOX, che per semplice diffusione attraversa la membrana cellulare, incontra e lega nel citoplasma la sub-unità 20s del proteasoma; il complesso DOX-proteasoma, così formatosi, trasloca nel nucleo, attraverso i pori per trasporto attivo, e dal quale dissociandosi, la DOX, per maggiore affinità, lega il DNA, mentre nel citoplasma si accumulano proteine ubiquitinate (**Figura 2.5**) [21].

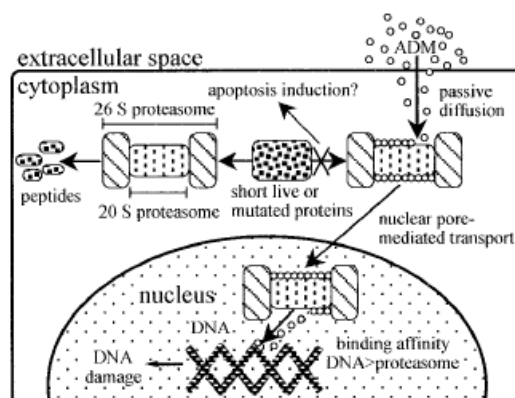


Figura 2.5. Rappresentazione schematica del meccanismo di traslocazione della Doxorubicina nel nucleo.

Nel nucleo, grazie alla sua caratteristica molecolare di essere planare ed idrofobica, la DOX è in grado di intercalarsi tra le basi della doppia elica del DNA, impedire la sintesi degli acidi nucleici, e di conseguenza la divisione cellulare; ma ad oggi si crede che questi

meccanismi di inibizione non siano sufficienti a bloccare la proliferazione delle cellule tumorali, ed indurre l'apoptosi. Diversamente, la sopravvivenza cellulare sembra essere compromessa dal legame della DOX alla Topoisomerasi di tipo II (Top-II): un enzima capace di tagliare e saldare i due filamenti che costituiscono il DNA, coinvolto anche nel processo di replicazione cellulare; la DOX, legandosi alla Top-II ed al DNA, forma un complesso ternario che causa la rottura della doppia elica ed induce la morte cellulare programmata [22]. Questi meccanismi di tossicità diretta, operata dalla DOX, si verificano non solo nelle cellule tumorali, ma anche in cellule sane, come i cardiomiociti. Infatti, nell'uomo la Top-II è espressa come isozima di tipo α e β : la prima, principalmente presente in cellule proliferanti (come le cellule tumorali), è importante per la segregazione cromosomica (nella fase del ciclo cellulare G2/M); la seconda è abbondante nelle cellule quiescenti, come i cardiomiociti, negli adulti. La cardiotossicità si manifesta quando la DOX si coniuga alla Top-II β [23], mutando il trascrittoma, e ne causa la disfunzione mitocondriale, alterando il metabolismo ossidativo ed il flusso del Ca^{++} , attivando il *pathway* di p53 ed il *signaling* adrenergico, ed inducendo, come processo ultimo, l'apoptosi cellulare [24].

La molecola della DOX (**Figura 2.4**) è soggetta alla riduzione dei gruppi chinonici in semichinonici, per opera degli enzimi NOS (Nitric Oxide Synthase) e NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase); la molecola che ne deriva è chimicamente attiva, ed interagendo con l'ossigeno molecolare, genera delle specie reattive (ROS) come superossidi (O_2^-), perossidi (H_2O_2), radicali idrossilici (OH^\cdot), che incrementano lo stress ossidativo, e causano l'ossidazione di DNA, proteine e la perossidazione dei lipidi. Nel caso dei cardiomiociti, si presenta l'evento di perossidazione della cardiolipina, che disaccoppia la catena respiratoria del complesso mitocondriale, e provoca il rilascio del citocromo C e l'induzione intrinseca dell'apoptosi. Quando invece la DOX subisce l'ossidazione dei suoi gruppi chimici, viene incrementato il suo potere liposolubile, che le consente di intercalarsi nella membrana cellulare o mitocondriale ed alterarne la fluidità, l'attività dei trasportatori ionici, la respirazione cellulare, il rilascio del calcio, e provocare, infine, il collasso del potenziale di membrana [25].

Importante è ricordare che la funzione contrattile del miocardio e la sopravvivenza cellulare dipendono da un alto contenuto di mitocondri sani e funzionali, atti a garantire una produzione sufficiente di ATP, attraverso la fosforilazione ossidativa. Gli stravolgimenti cellulari che accompagnano la tossicità cardiaca da DOX, come l'accumulo di macromolecole ossidate, la presenza di organelli danneggiati, nonché la ridotta capacità

mitocondriale di produrre ATP, e l'alterazione che ne consegue del metabolismo ossidativo degli acidi grassi (metabolismo basale nei cardiomiociti) sono sufficienti a stimolare il processo autofagico (rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati) e mitofagico (eliminazione autofagica dei mitocondri) nei cardiomiociti. Il processo di autofagia è un meccanismo fisiologico, che se controllato, garantisce l'eliminazione di tutte le componenti danneggiate, per una migliore efficienza cellulare. Nel caso della cardiotoxicità, questo tipo di regolazione è alterata e fuori controllo; la possibilità dei cardiomiociti, di riparare le lesioni a carico del miocardio per auto-replicazione, solo nell'immediato periodo post-natale, aumenta la gravità del danno cardiaco. Numerosi sono gli studi che hanno cercato di descriverne il meccanismo molecolare alla base, molti di questi sono in netto contrasto tra loro, ma alcuni hanno permesso di delineare un ipotetico processo dell'incontrollata autofagia e mitofagia, che sfocia nella morte dei cardiomiociti (**Figura 2.6**) [26].

Questi processi, appena descritti, sono i principali e più discussi eventi che si verificano a carico dei miociti cardiaci; sono in egual misura rilevanti per l'alterazione cellulare, ma quello che ancora non si è riusciti a definire è con quale tempistica intercorrono, e se in qualche modo si possa attribuire ad uno di questi la nomina di principale effettore della tossicità.

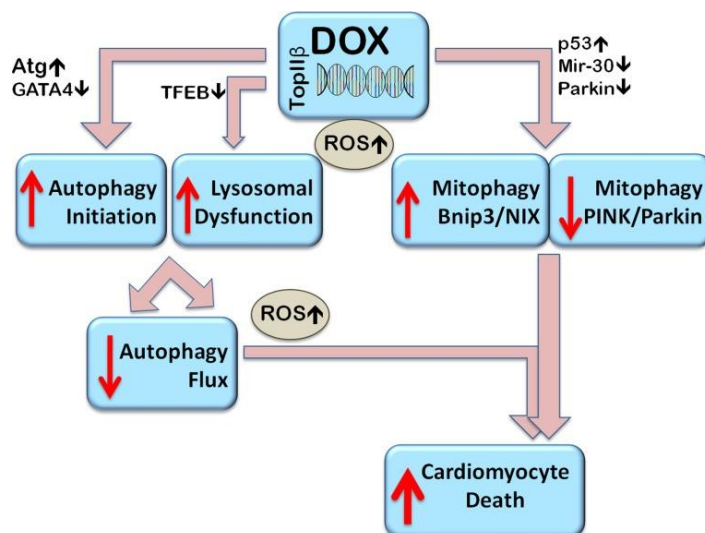


Figura 2.6. Meccanismo della non regolata autofagia e mitofagia indotta dalla DOX.

2.4 I fibroblasti cardiaci

L'insieme di tutti questi eventi cellulari non controllati, causati dalle antracicline, ed in particolare dalla DOX, sono considerati manifestazioni primitive e direttamente indotte dalle cure antitumorali sui cardiomiociti. Molti studi in letteratura, a partire dalla scoperta, nei primi *trial* clinici, che la DOX induce cardiotossicità, si sono focalizzati sull'individuazione dei meccanismi molecolari che affliggono i cardiomiociti e che portano alla loro morte, con conseguente insufficienza cardiaca, sfociante nella cardiomiopatia dilatativa. Poche sono state invece le considerazioni rivolte alla componente non cardiomiocitica del cuore [27] (cellule endoteliali, leucociti, cellule muscolari lisce, periciti e fibroblasti), che rappresenta una cospicua percentuale nella composizione del cuore, e che è alla base del sostegno strutturale e molecolare dei cardiomiociti.

Tra le cellule della parte non cardiomiocitica, i fibroblasti sono la componente con la funzione principale di produrre tessuto connettivo, meglio noto come matrice extracellulare (ECM): la componente strutturale del cuore è costituita principalmente da collagene, proteoglicani e glicoproteine, come periostina, vimentina, fibronectina e collagene (di tipo I, III, V e VI) [28,29]; i fibroblasti rispondono alle lesioni cardiache producendo e secernendo queste diverse componenti. L'ECM svolge numerose funzioni: non solo strutturale, come sostegno alle cellule cardiache, ma anche di tipo meccanica, perché distribuisce le forze in tutto il tessuto, ed elettrica, perché separa gli atri ed i ventricoli, per facilitare la corretta contrazione muscolare. Sebbene non siano il costituente principale, è probabile che i fibroblasti svolgano un ruolo chiave nella normale fisiologia cardiaca. Numerose sono le funzioni riconosciute ai fibroblasti: la degradazione della matrice, l'isolamento del sistema di conduzione, l'accoppiamento elettrico dei cardiomiociti, l'omeostasi vascolare e il rilevamento dello stress; sono tutti potenziali aspetti che caratterizzano la biologia dei fibroblasti. Si tratta però di considerazioni ottenute da studi *in vitro* ed in condizioni patologiche [30].

Poiché la fibrosi cardiaca rappresenta uno stato di disordine nel cuore, un'accurata attenzione è rivolta, in particolare, al comportamento dei fibroblasti attivati, spesso indicati come miofibroblasti, responsabili del rimodellamento tissutale. Esiste un *cross-talk* dinamico, paracrino e strutturale, tra cardiomiociti e fibroblasti cardiaci, importante sia durante le fasi dello sviluppo, ma anche nei processi di rimodellamento, in seguito a lesioni

a carico del miocardio [31]. Durante l'insufficienza cardiaca adulta, i fibroblasti secernono fattori di crescita, citochine proinfiammatorie ed altre molecole, che promuovono direttamente l'ipertrofia dei cardiomiociti, tra cui: IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF β [31]. Queste molecole possono esercitare una funzione autocrina e paracrina, e guidare la proliferazione, la contrazione e l'apoptosi cellulare. Ma anche i cardiomiociti possono secernere alcune di queste citochine, sufficienti ad indurre la migrazione dei fibroblasti, la loro trasformazione in miofibroblasti (TGF β 1 in particolare) e la sintesi di proteine dell'ECM [32]. Il traffico molecolare che si instaura tra i fibroblasti e i cardiomiociti non è altro che un complesso sistema in cui le cellule contigue si influenzano reciprocamente.

Solo recentemente sono stati condotti studi per definire i meccanismi che affliggono direttamente i fibroblasti cardiaci in seguito al trattamento con DOX, e solo pochi hanno ipotizzato e focalizzato l'attenzione sulle possibili vie attraverso cui l'antraciclina induce la fibrosi cellulare [33, 34]. Negli ultimi anni anche il rimodellamento dell'ECM ha assunto importanza nell'ambito delle disfunzioni cardiache causate dai farmaci antitumorali; diversamente da quanto ipotizzato e studiato fino ad ora circa il solo coinvolgimento dei cardiomiociti danneggiati nella cardiotossicità. Ciò che ancora rappresenta un *deficit*, nella caratterizzazione del danno da DOX, è lo studio del meccanismo molecolare che affligge i fibroblasti ed un loro possibile ruolo chiave nella regolazione e nella comunicazione con i cardiomiociti, nell'ambito della cardiotossicità.

3. Scopo

Lo scopo degli esperimenti della presente tesi è stato quello di studiare i possibili effetti diretti della DOX sui fibroblasti cardiaci umani, di caratterizzare la loro risposta molecolare allo stimolo ed individuare i *pathway*, attraverso i quali la DOX agisce per indurre la cardiotossicità. A tal fine, è stato verificato e identificato, *in vitro*, lo stress che la DOX induce nei fibroblasti, è stata valutata l'espressione delle proteine che caratterizzano il fenotipo dei fibroblasti, e studiata l'attivazione dei processi che regolano la trasformazione cellulare in miofibroblasti. Per valutare se le cellule che compongono il cuore attuano una possibile via di comunicazione con cellule contigue, non solo della stessa natura (fibroblasta-fibroblasta) ma anche di diversa tipologia (fibroblasta-cardiomiocita), sono state utilizzate colture primarie di cardiomiociti e fibroblasti murini neonatali (nMCM e nMCF). Per questo, il secretoma dei fibroblasti, afflitti dallo stress della DOX, è stato utilizzato per valutare l'effetto sui cardiomiociti, e capire attraverso quali meccanismi sopraggiunge lo stato patologico dei cardiomiociti. In aggiunta è stato investigato l'effetto autocrino che i HCF espletano su loro stessi, quando condizionati dal trattamento con la DOX.

4. Disegno sperimentale, materiali e metodi

4.1. Colture cellulari e disegno sperimentale

Per tutti gli esperimenti è stato utilizzato il refluo di Adriblastina (2mg/mL) messo a disposizione, su richiesta, dal reparto di “Farmacia applicata alla sperimentazione clinica” dell’Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino, IRCCS - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro.

4.1.1. Fibroblasti cardiaci umani

I HCF sono stati isolati dai campioni di appendici atriali destre umane, prelevati durante gli interventi di chirurgia cardiaca elettiva, nel momento in cui viene inserita la cannula venosa, per garantire la circolazione extracorporea. Le cellule sono state isolate mediante frammentazione, e digestione enzimatica per 45 minuti a 37 °C con Collagenasi II 1 mg/mL (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). Al termine dell’incubazione, la collagenasi è stata neutralizzata con l’aggiunta di DMEM/F-12, addizionato con siero fetale bovino (FBS) al 10%. Le cellule sono state centrifugate per 10 minuti alla velocità di 1400 rpm e fatte crescere, in seguito, in EGM-2 (*Endothelial Growth Medium-2*; Lonza, Walkersville, MD, USA) per limitare la tendenza dei fibroblasti ad attivarsi spontaneamente. Le cellule sono state mantenute in coltura con una confluenza massima del 70% ed utilizzate per gli esperimenti dal passaggio 2 al passaggio 5. Le cellule sono state mantenute in coltura in incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata con il 5% di CO² [35]. Dopo aver lavato due volte le cellule con EBM-2 (*Endothelial Basal Medium-2*; Lonza), HCF sono stati trattati con DOX a diverse concentrazioni (0,1 µM, 0,3 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM) per 3 ore. I trattamenti sono stati effettuati in EBM-2 e le cellule sono state lasciate in EGM-2 per la durata degli esperimenti.

Negli esperimenti di caratterizzazione dei *pathway* molecolari coinvolti, i HCF sono stati pretrattati con: PFT (Sigma-Aldrich; Pifithrin- α - CAS 63208-82-2 - Calbiochem) alla concentrazione di 10 μ M [36], 1 ora prima del trattamento con DOX 0,3 μ M; GW (Sigma-Aldrich; GW-788388 Hydrate) alla concentrazione di 10 μ M, 40 minuti prima del trattamento con DOX 0,3 μ M. I trattamenti sono stati effettuati in EBM-2 e le cellule sono state lasciate in EGM-2 per la durata degli esperimenti.

Negli esperimenti per la valutazione dell'effetto autocrino, i HCF sono stati trattati con DOX 0,3 μ M per 3 ore, e mantenuti in coltura per altre 2 ore in solo EBM-2. Dopo 2 ore il CM, di campioni controllo (CM CT) e campioni trattati (CM DOX) è stato collezionato, centrifugato per eliminare frammenti cellulari e cellule morte, ed utilizzato per trattare altri HCF per ulteriori 3 ore. I trattamenti sono stati effettuati in EBM-2 e le cellule sono state lasciate in EGM-2 per la durata degli esperimenti.

4.1.2. Fibroblasti cardiaci e cardiomiociti murini

I cuori sono stati prelevati da topi C57BL/6, di 1-2 giorni di vita, e sono stati incubati *over night* con una soluzione di tripsina 0,6 mg/mL (Gibco) in terreno HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*). In seguito dai cuori sono stati estratti i cardiomiociti ed i fibroblasti per via enzimatica con Collagenasi II 1 mg/mL (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA). Dopo la digestione, il prodotto ottenuto è stato centrifugato a 500 rpm per 10 minuti. Il *pellet* è stato piastrato per 1 ora, ed in seguito trasferito per un'altra ora in una nuova piastra di coltura, per separare i nMCF dai nMCM. I fibroblasti cardiaci sono stati fatti crescere in DMEM-HG addizionato con il 10% di siero, Glutamina e Penicillina/Streptomicina. I cardiomiociti sono stati fatti crescere in DMEM-LG, addizionato con M199, Horse Serum, FBS, Glutamina e Penicillina/Streptomicina. Le cellule sono state mantenute in coltura in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO².

Per gli esperimenti i cardiomiociti sono utilizzati al passaggio 0, mentre i fibroblasti sono utilizzati solo al passaggio 2. Per i trattamenti le cellule sono fatte crescere in terreno *serum free*; le cellule lasciate in terreno minimo sono state utilizzate come controllo.

Negli esperimenti per la valutazione dell'effetto paracrino i nMCF sono stati trattati con DOX 0,5 μ M per 3 ore, ed in seguito tenuti in coltura per 2 o 45 ore in terreno *serum free*. Il CM, di campioni controllo (CM CT) e campioni trattati (CM DOX) è stato collezionato,

centrifugato per eliminare frammenti cellulari e cellule morte, e utilizzato per trattare i nMCM per 6 ore. I trattamenti sono stati effettuati in terreno minimo e le cellule sono state lasciate in DMEM-LG completo per la durata degli esperimenti.

Analogamente, negli stessi esperimenti il CM collezionato è stato concentrato (CM CON), fino ad 1/8 del volume di partenza con filtri da 3000 KDa (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit), CM CT e CM DOX. È stato collezionato l'eluato dal processo di concentrazione CM CT ELUIT e CM DOX ELUIT, mentre il CM CT CON e CM DOX CON è stato riportato al volume iniziale con DMEM HG *serum free*. I diversi CM sono stati utilizzati per trattare i nMCM per 5 ore. I trattamenti sono stati effettuati in terreno minimo e le cellule sono state lasciate in DMEM-LG completo per la durata degli esperimenti.

4.2. Saggio β -Galattosidasi

HCF e nMCM, cresciuti in vetrini, di tipo *chamberslides*, dopo lo stimolo con trattamenti diversi, sopra descritti, sono stati lavati due volte in PBS, e fissati per 10 minuti con glutaraldeide 0,5 % (in H₂O) a temperatura ambiente. Dopo aver lavato 2 volte in PBS l'eccesso della soluzione di glutaraldeide, le cellule sono state incubate *over night* (37°C con il 5% di CO₂) con una soluzione contenente: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside 1 mg/mL (concentrazione iniziale 20 mg/mL in DMSO, X-Gal; Sigma-Aldrich), acido citrico 40 mM (pH=6), sodio fosfato 40 mM (pH=6), K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O 5mM, K₃[Fe(CN)₆] 5mM, NaCl 150 mM, MgCl₂·6H₂O 2 mM. Il numero delle cellule positive alla colorazione per il saggio enzimatico β -galattosidasico, associato a senescenza è stato determinato su campi selezionati casualmente al microscopio ed espressi come percentuale rispetto al totale delle cellule presenti nel campo.

4.3. Immunofluorescenza

HCF e nMCM, cresciuti in vetrini, di tipo *chamberslides*, sono stati incubati con diversi stimoli, come precedentemente descritto. Le cellule sono state lavate due volte in PBS.

Dopo 1 minuto di fissaggio in metanolo freddo le cellule, lavate per 3 volte in PBS, sono state incubate in PBS per 1 ora con l'anticorpo primario anti-Caspasi-3 clivato (anticorpo monoclonale di coniglio; Cell Signaling), anti-beta-actina (anticorpo monoclonale di topo; Santa Cruz), anti-p21/CIP1/CDKN1A (anticorpo monoclonale di topo; NOVUS BIO), anti-p16-INK4a (anticorpo monoclonale di topo; AbCam), anti-actina muscolare liscia (anticorpo monoclonale di topo; Dako). L'eccesso di anticorpo è stato poi lavato in PBS, e le cellule sono state poi controcolorate con anticorpo secondario specifico fluorescente coniugato (Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488; Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 – Thermo Fischer Scientific). Dopo il lavaggio dell'eccesso di anticorpo, i vetrini sono stati incubati con Prolong Gold Antifade Mountant con DAPI (Invitrogen - Thermo Fischer Scientific). Le immagini sono state acquisite con microscopio fluorescente Leica DM2000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) fornito di CCD high resolution cooled camera, usando il software Leica Application Suite (Leica Microsystems).

4.4. Secrezione del Collagene

La sintesi di collagene nei HCF è stata valutata attraverso la colorazione Picro-Sirius red staining. Le cellule fissate dopo il trattamento sono state incubate per 1 ora con una soluzione di Sirius red (0.1%, Sigma) in una soluzione acquosa di acido (1.3% in water, Sigma). Successivamente sono stati eseguiti tre lavaggi con acido acetico 0.1%, disidratazione con etanolo, seguito dal passaggio in xylene.

4.5. Western Blot

Le cellule, dopo il trattamento, sono state lisate in ghiaccio nel *buffer* di lisi (20 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP40, 2.5 mM Na₂P₂O₇, and 1 mM β-glycerophosphate) con l'aggiunta dei seguenti inibitori: 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, e inibitori delle proteasi (halt

Protease Inhibitor Cockatil, Thermo Fischer Scientific). La concentrazione proteica è stata valutata mediante Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific). Il lisato cellulare è separato in gel di tris-glicina (8–16%, Thermo Fisher Scientific). Le proteine separate sono state poi trasferite su membrana di PVDF (Bio-Rad laboratories) con sistema *semidry* ed incubato *over night* con l'anticorpo primario anti-p53 (anticorpo policlonale di capra; R&D System), e anti-GAPDH (anticorpo policlonale di coniglio; Cell Signaling). Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario specifico HRP-coniugato (Santa Cruz Biotechnology), la membrana è stata visualizzata mediante Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) e l'intensità delle bande sono state determinate usando Alliancesystem (Uvitec, Cambridge, UK).

4.6. Potenziale di membrana mitocondriale

L'integrità mitocondriale dei nMCM, dopo 30 ore dal trattamento è stata valutata mediante la fluorescenza emessa dalla carbocianina cationica JC-1 (Invitrogen), accumulata nei mitocondri delle cellule. Le cellule dopo il trattamento sono state lavate in PBS, ed incubate per 30 minuti con JC-1 (10 µg/mL) in DMEM-LG base, senza rosso fenolo. Cellule come controllo positivo del saggio sono state trattate con Valinomicina (Val), come disaccoppiante della catena di trasporto degli elettroni mitocondriale. La depolarizzazione di membrana è espressa con il rapporto della fluorescenza emessa nel rosso (circa 590 nm) e quella nel verde (circa 525 nm). La fluorescenza emessa è stata valutata mediante il lettore di piastra Tecan Spark (Tecan Trading AG).

4.7. Proliferazione cellulare

La proliferazione cellulare dei HCF dopo il trattamento è stata valutata mediante citofluorimetria (FACSCanto II, BD Italia, FacsDiva software, BD), attraverso il legame dell'estere succinimmidico della carbossifluoresceina (CFDA-SE Invitrogen, Milano, Italia) con il DNA della cellula. L'analisi delle cellule marcate è stata effettuata al citofluorimetro

(Attune Acoustic Focusing Cytometer, ThermofisherScientific) per rilevare la percentuale di fluorescenza. I dati sono stati analizzati con Proliferation Wizard module of the ModFit LT 4.0 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA) ed il risultato è stato espresso come indice di proliferazione.

4.8. Cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa (LC-MS)

L'analisi di eventuali tracce di DOX, rilasciate dai nMCF nei mezzi CM, per lo studio dell'effetto paracrino sui nMCM, è stata effettuata mediante LC-MS. Il terreno di crescita dei nMCF, trattati con DOX 0,5 μ M per 3 ore, come da disegno sperimentale, e lasciati in coltura per altre 45 ore, è stato prelevato, centrifugato per eliminare tracce di detriti cellulari o cellule apoptotiche, ed è stato conservato a -80 °C, fino al momento dell'analisi. I campioni sono stati liofilizzati e risospesi ciascuno in 200 μ l di una soluzione contenente 5% acetonitrile + 0.1 % acido formico. Il metodo LC (*targeted* e *untargeted*) ha previsto: fase mobile A di acqua con 0.1 % FA, fase mobile B di acetonitrile con 0,1 % FA, colonna HSS T3 1,8 μ m 2,1 mm * 50 cm; è stato eseguito con un flusso di 0,5 mL/min. Mentre l'analisi MS (*targeted*) con MRM (Multiple Reaction Monitoring) è stata eseguita con scan 200-650 m/z ed ESI(+), 0-4 mins.

4.9. Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati presentati come media \pm SEM. L'analisi statistica è stata svolta usando il t test non parametrico a due code. Sono state considerate statisticamente significative solo le analisi con p value <0.05.

5. Risultati

5.1. La Doxorubicina induce la senescenza nei fibroblasti cardiaci umani e ne causa il rimodellamento cellulare.

Per capire se la DOX avesse un effetto diretto sui HCF, e poter identificare quale fosse la minima concentrazione di farmaco sufficiente ad indurre un'attivazione dei HCF proliferanti di pazienti, le cellule sono state trattate con concentrazioni diverse di DOX, per un tempo minimo (3 ore), e ne è stata valutata la senescenza cellulare mediante SA- β -Gal, 45 ore dopo il trattamento (**Figura 5.1**). Il saggio colorimetrico ha evidenziato un incremento dell'attività enzimatica β -Gal a concentrazioni intermedie dell'agente chemioterapico (DOX 0,3 μ M), ed una percettibile diminuzione all'aumentare della dose somministrata (DOX 0,5 μ M).

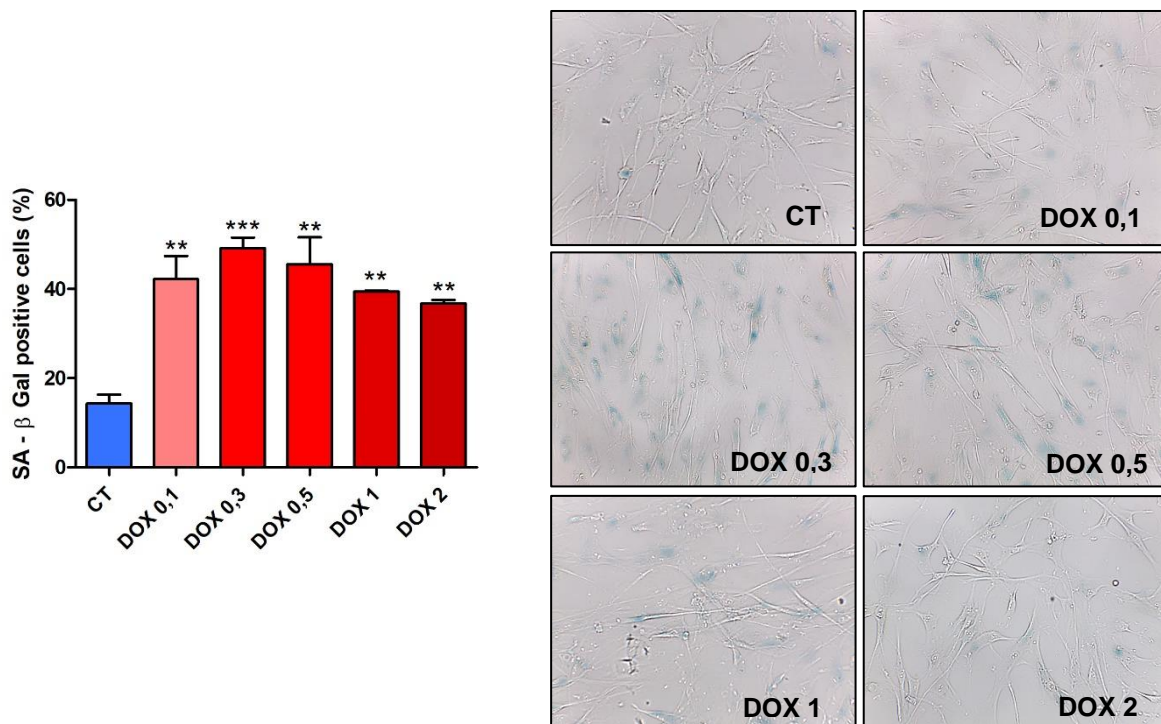


Figura 5.1. DOX 0,3 μ M induce la senescenza nei HCF. Saggio enzimatico colorimetrico di β -Gal.

P <0.0001. *P <0.0001. (n = 3).

È interessante osservare come alte concentrazioni di DOX (1 μ M, 2 μ M), sufficienti a causare un'estesa apoptosi dei cardiomiociti [33], inducono, invece, senescenza nei HCF, con una ridotta percentuale di cellule apoptotiche (positive alla colorazione per la proteina Caspasi-3), alle stesse dosi di farmaco (**Figura 5.2**).

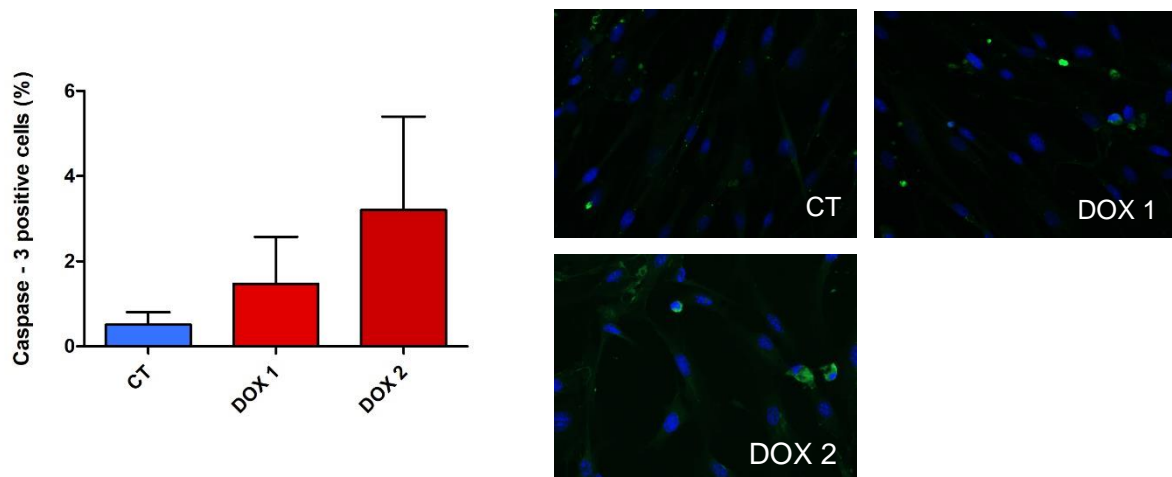


Figura 5.2. Alte concentrazioni di DOX inducono una scarsa apoptosi nei HCF. Immunofluorescenza per la proteina Caspasi-3 (Blu, DAPI; Verde, Caspasi-3). (n = 3).

Per studiare ed interpretare gli effetti dell'attivazione dei HCF nella cardiomiopatia fibrotica, indotta dalla DOX, è stata, per tanto, utilizzata la concentrazione di DOX di 0.3 μ M, capace e sufficiente per stimolare le cellule a rispondere allo stress in tempi precoci, senza attivarne la cascata apoptotica. Infatti, è possibile osservare come l'incremento dell'attività β -Gal (**Figura 5.1**) sia accompagnato da una diminuzione della proliferazione degli stessi HCF (**Figura 5.3**), che presentano un fenotipo piatto e allargato, con rilevante presenza di microfilamenti di F-actina (**Figura 5.4**). La DOX, somministrata ai HCF con una concentrazione di 0,3 μ M, blocca, quindi, la crescita cellulare e causa disfunzioni a carico dell'omeostasi cellulare, che portano i fibroblasti a modificare la loro struttura citoplasmatica e citoscheletrica, ed assumere un fenotipo secretorio, tipico dei miofibroblasti.

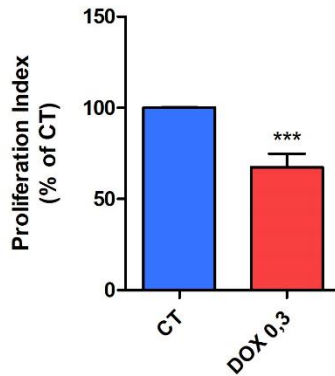


Figura 5.3. DOX 0,3 μ M induce l'arresto della proliferazione dei HCF. Indice di proliferazione calcolato sul numero di generazioni cellulari marcate con CFDA-SE (estere diacetato succinimidico della carbossifluoresceina). ***P < 0.0001. (n = 3).

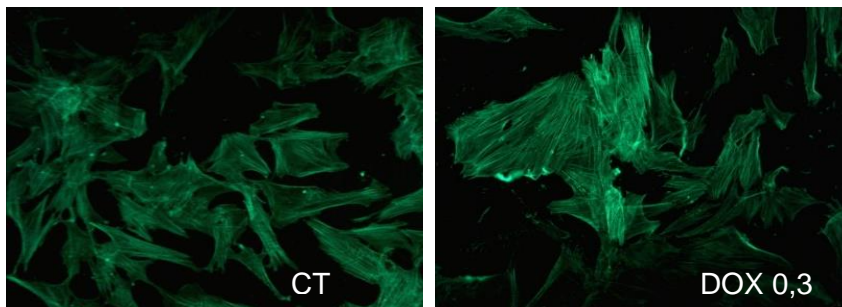


Figura 5.4. DOX 0,3 μ M induce l'accumulo di F-actina nei HCF. Immunofluorescenza per i filamenti citoscheletrici di F-actina (Verde).

5.2. La Doxorubicina induce l'espressione di p53, coinvolta nella patogenesi molecolare dei Fibroblasti Cardiaci Umani.

È stato già descritto e dimostrato che p53 è coinvolta nel danno indotto dalla DOX a carico dei cardiomiociti, e soprattutto gioca un ruolo chiave nell'apoptosi cardiaca [36]. Per tale motivo abbiamo rivolto la nostra attenzione sul possibile coinvolgimento di p53, anche,

nella patogenesi dei HCF, trattati con DOX 0,3 μ M. Per verificare la nostra ipotesi di un effetto cardiotossico della DOX, attraverso la cascata genica attivata da p53, abbiamo pretrattato le cellule con PFT: noto inibitore di p53, che protegge le cellule dagli eventi apoptotici - p53 dipendenti [36]. Lo stress ossidativo e i danni al DNA, a cui sono sottoposti i fibroblasti con il trattamento chemioterapico, inducono l'incremento di p53, 45 ore dopo la DOX, contenuto invece dal trattamento preventivo con PFT (**Figura 5.5**). Allo stesso modo l'arresto del ciclo cellulare, la senescenza (**Figura 5.6**) ed il rimodellamento strutturale dei fibroblasti cardiaci, sono irrilevanti nel caso del pretrattamento delle cellule con l'inibitore di p53 (**Figura 5.7**); in particolare non si osserva alcun effetto del PFT sulle cellule, quando somministrato alle stesse come controllo negativo per gli esperimenti. Infatti l'attività enzimatica β -Gal, tipica di uno stato cellulare senescente, è significativamente ridotta quando le cellule sono trattate con PFT in concomitanza con la DOX (**Figura 5.6**). Allo stesso modo anche l'accumulo di p16 e p21 (importanti inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare) 45h dopo il farmaco chemioterapico, si riduce nelle cellule pretrattate con PFT (**Figura 5.6**). Questi risultati supportano il coinvolgimento di p53, a valle di p21, nell'arresto del ciclo cellulare dei HCF, in risposta al danno da DOX. In particolare è possibile osservare come si attivi una seconda via di regolazione del ciclo cellulare, attraverso p16, a causa dello stress causato dalla DOX; un meccanismo che, dai risultati ottenuti, sembra essere inibito ugualmente da PFT. Anche il rimodellamento strutturale dei HCF, causato dalla DOX, sembra essere inibito dalla PFT; infatti la deposizione di matrice profibrotica (collagene e α -actina), tipica del trattamento con DOX, è invece ridotta per via del trattamento con PFT (**Figura 5.7**).

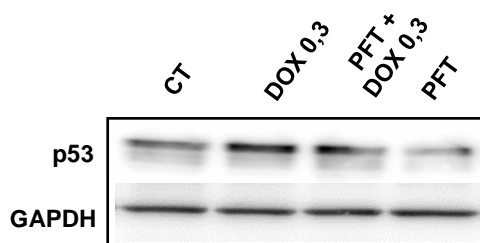


Figura 5.5. Il pretrattamento con PFT riduce l'espressione di p53 in seguito al trattamento con DOX 0,3 μ M nei HCF. Western Blot per p53.

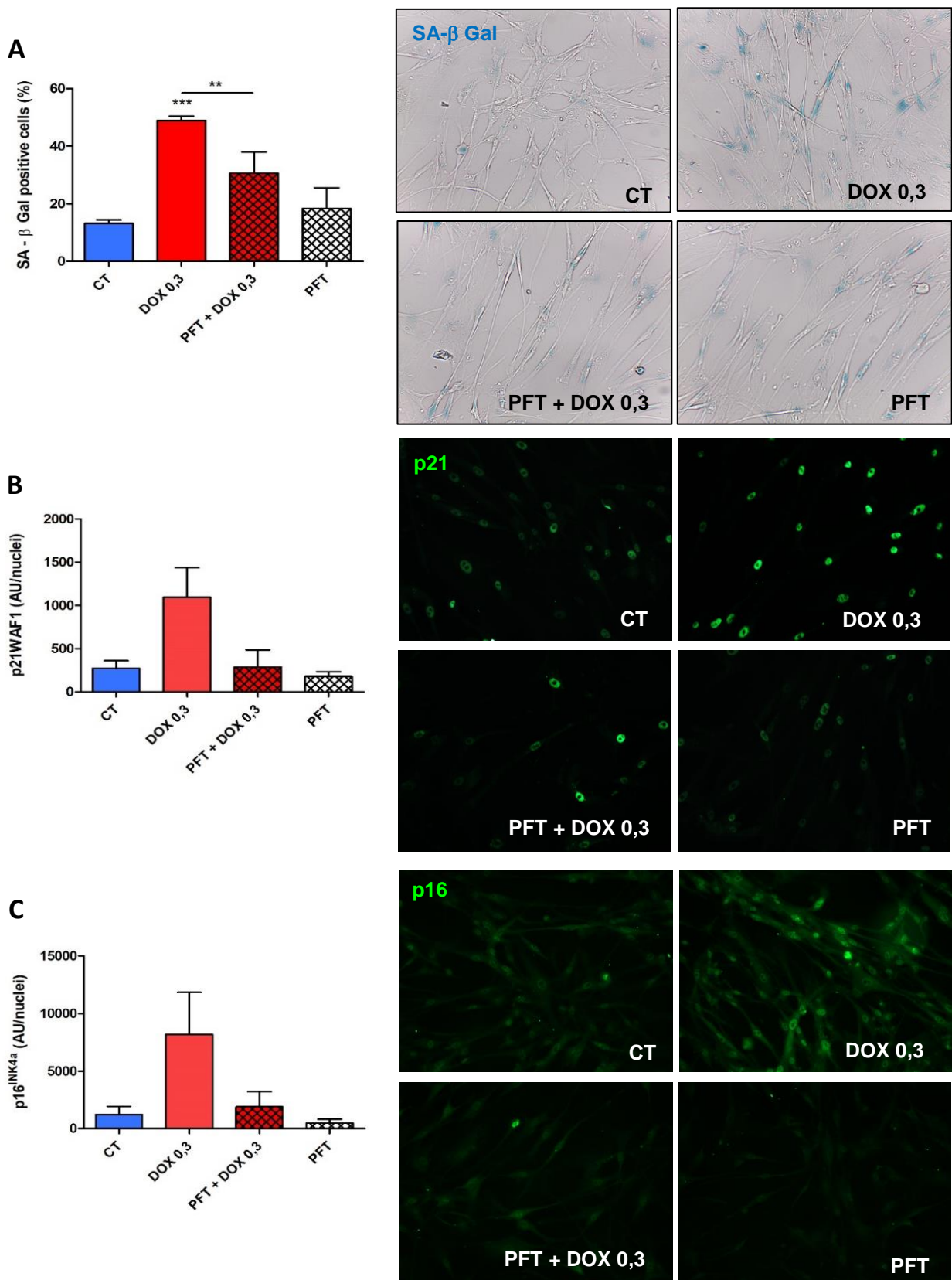


Figura 5.6. Il pretrattamento con PFT blocca la senescenza in seguito al trattamento con DOX 0,3 μ M nei HCF. (A) Saggio enzimatico colorimetrico di β -Gal (B) Immunofluorescenza per p21 (Verde). (C) Immunofluorescenza per p16 (Verde).**P <0.01. ***P <0.0001. (n = 3).

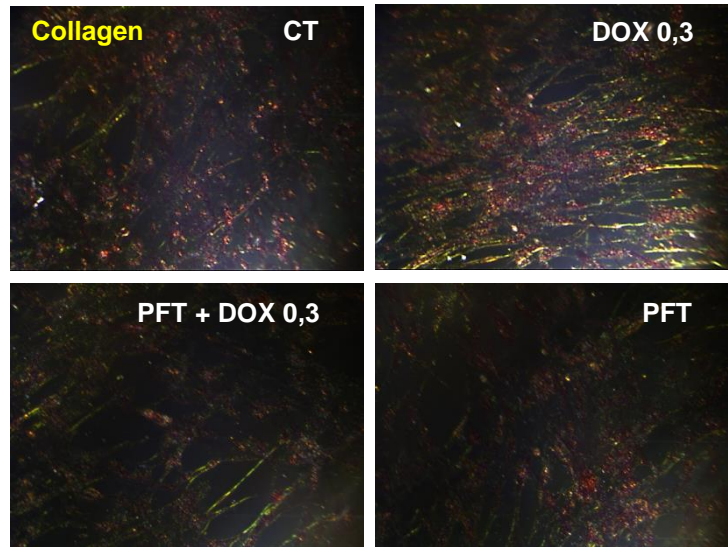
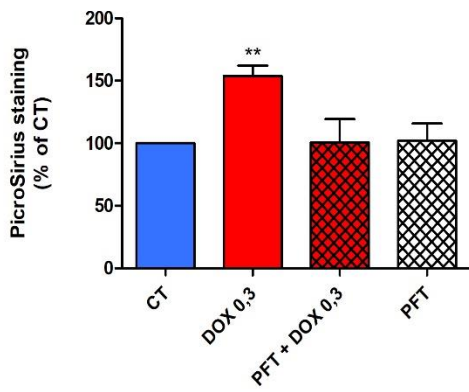
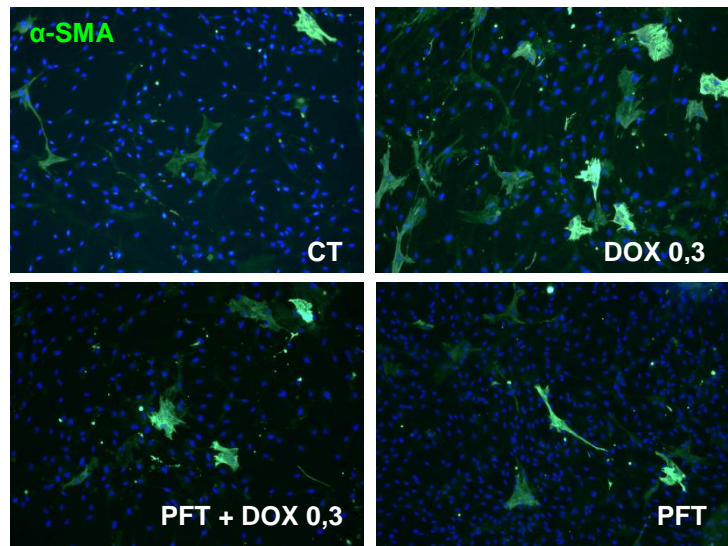
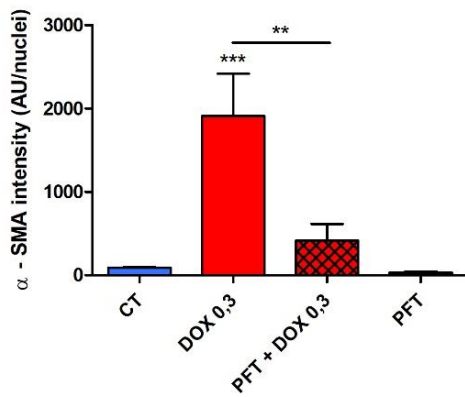
A**B**

Figura 5.7. Il pretrattamento con PFT previene il processo profibrotico dei HCF. (A) Colorazione con Picro Sirius Red per la deposizione di collagene I e III. (B) Immunofluorescenza per α -SMA (Blu, DAPI; Verde, α -SMA). **P < 0.01. ***P < 0.0001. (n = 3).

5.3. Il danno indotto dalla Doxorubicina nei Fibroblasti Cardiaci Umani è in parte mediata da TGF- β .

È certamente stato già descritto il coinvolgimento del *pathway* del TGF- β nella regolazione dell'omeostasi e delle funzioni cellulari, in particolare nel differenziamento e nella crescita dei fibroblasti [31]. Abbiamo rivolto, quindi, la nostra attenzione sul TGF- β , e studiato lo stato funzionale dei HCF, utilizzando il GW come inibitore specifico del recettore di tipo II del TGF- β . Come atteso il TGF- β è coinvolto nel blocco della crescita cellulare e nell'attivazione fibrotica dei fibroblasti in esame (**Figura 5.8, Figura 5.9**). Infatti è possibile osservare come, 45 ore dopo il trattamento con la DOX, il GW sia in grado di proteggere in maniera significativa le cellule dallo stato di senescenza, senza avere alcun impatto, nel controllo negativo del trattamento (GW), quando non si ha danno da DOX (**Figura 5.8**). Inoltre allo stesso modo, il TGF- β è coinvolto nel cambiamento funzionale e strutturale dei HCF; è possibile osservare come il trattamento con GW abbia effetti protettivi, inibendo la sintesi di proteine della matrice, quali α -SMA e collagene, che inducono l'attivazione dei fibroblasti in miofibroblasti (**Figura 5.9**).

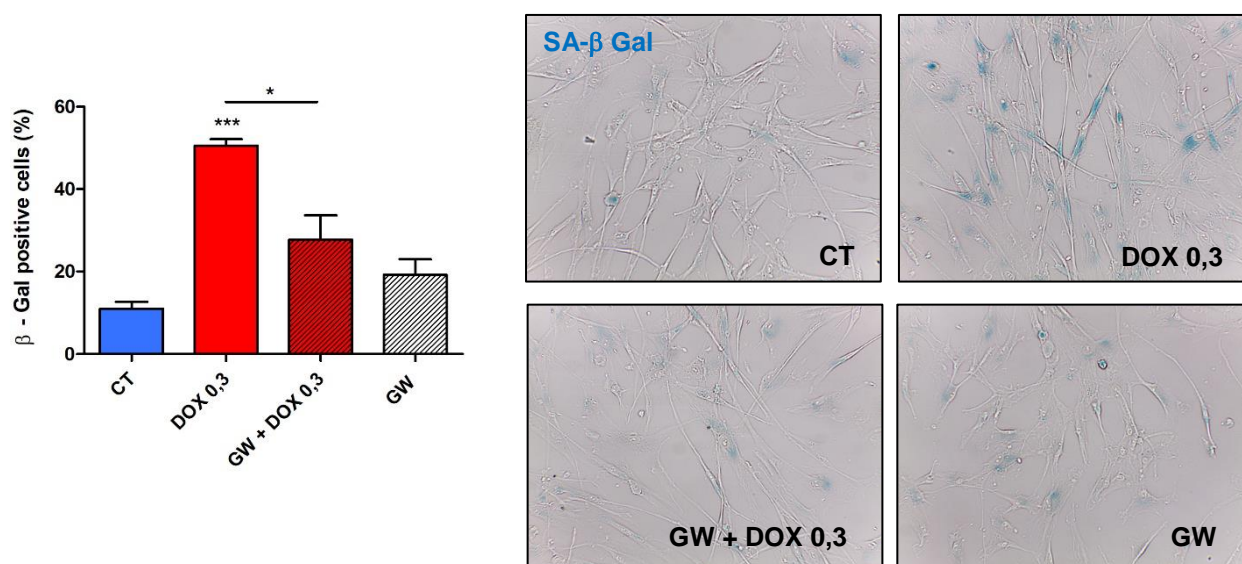


Figura 5.8. Il pretrattamento con GW blocca la senescenza in seguito al trattamento con DOX 0,3 μ M nei HCF. Saggio enzimatico colorimetrico di β -Gal. *P <0.05. ***P <0.0001. (n = 3).

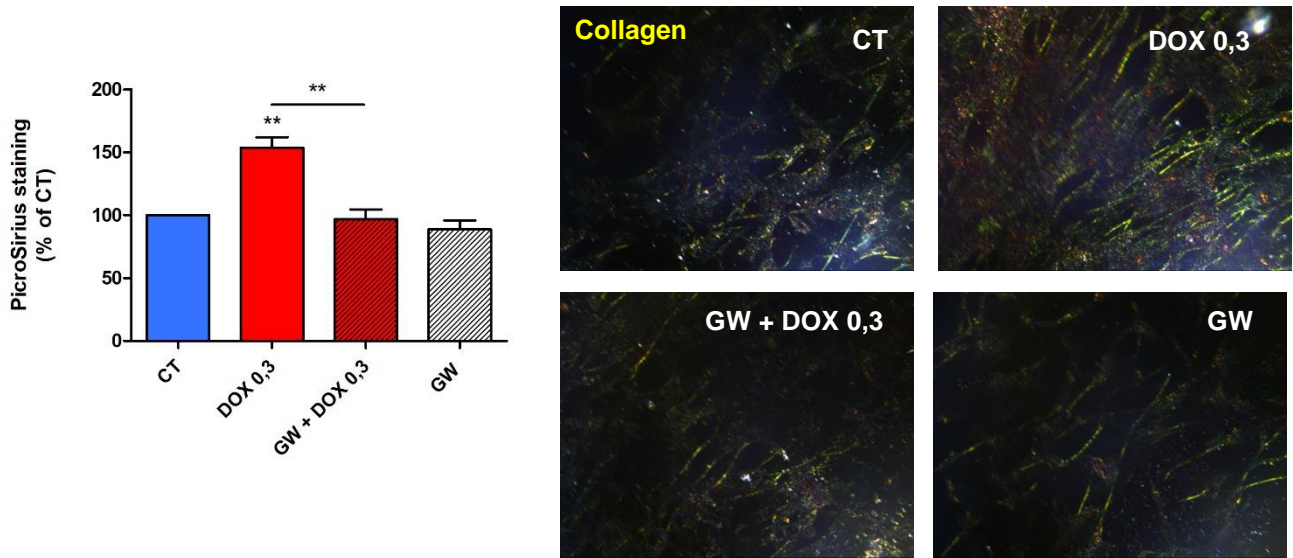
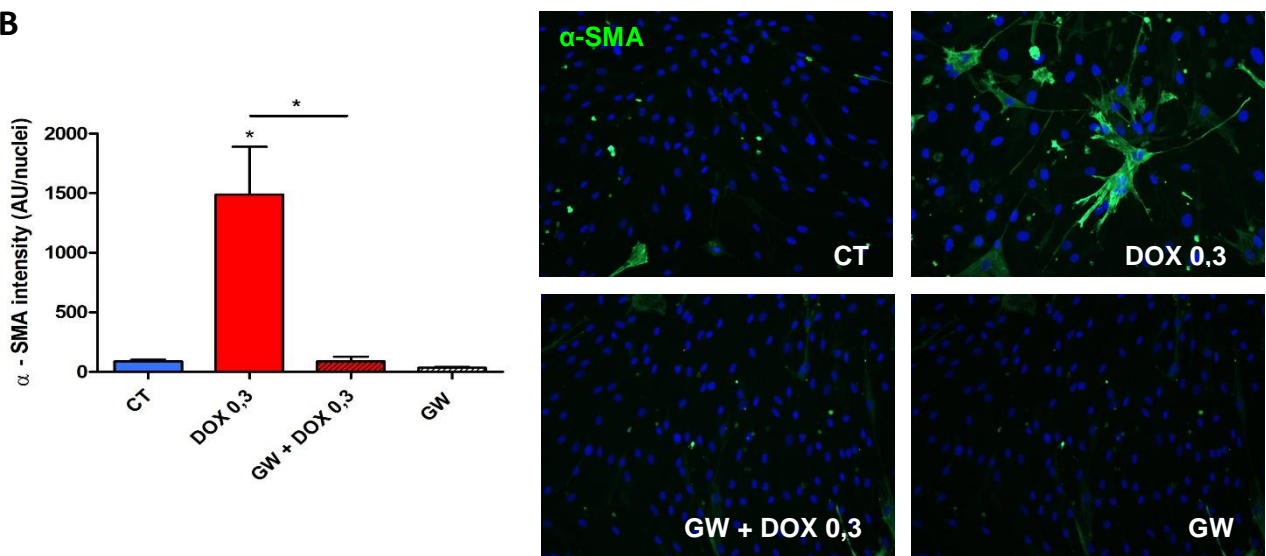
A**B**

Figura 5.9. Il pretrattamento con GW previene il processo profibrotico dei HCF. (A) Colorazione con Picro Sirius Red per la deposizione di collagene I e III. (B) Immunofluorescenza per α -SMA. (Blu, DAPI; Verde, α -SMA). * P < 0.05. **P < 0.01 (n = 3).

5.4. I Fibroblasti Cardiaci, esposti alla Doxorubicina, rivelano un'attività paracrina a carico dei cardiomiociti contigui.

Allo stato di senescenza cellulare si associa generalmente un particolare fenotipo secretorio, che porta le cellule, giacenti in questo stato di quiescenza, a rilasciare fattori chimici (proteine, citochine, RNA) nell'ambiente circostante, ed influenzare di conseguenza le cellule adiacenti. Questi fattori SASP (*Senescence-Associated Secretory Phenotype*) possono modificare lo stato delle cellule adiacenti o scatenare una risposta infiammatoria. Vista la risposta senescente dei fibroblasti cardiaci, esposti al trattamento con DOX, è stato studiato l'effetto del loro secretoma *in vitro* sui cardiomiociti murini. Lo studio della senescenza dei nMCM, trattati con il mezzo condizionato dei nMCF stressati dalla DOX, è stato eseguito per valutare il possibile coinvolgimento dei fibroblasti attivati nella disfunzione dei cardiomiociti (**Figura 5.10**). Dal grafico si evince che i nMCM trattati per 5 ore, con il mezzo condizionato dei nMCF a cui è stata somministrata la DOX (CM DOX 0,5), sono ugualmente affetti da senescenza come gli stessi nMCM trattati direttamente con la DOX (DOX 0,5). Come ulteriore prova dell'arresto del ciclo cellulare, è stata valutata, mediante immunofluorescenza, l'espressione di p16, importante regolatore del ciclo cellulare (**Figura 5.11**). Dalle immagini si osserva un accumulo della proteina in concomitanza della senescenza, osservata mediante saggio β -Gal; conferma dell'effetto paracrino dei miofibroblasti sui cardiomiociti. Lo stress ossidativo causato dalla DOX può provocare diverse disfunzioni cellulari, tra queste numerose possono colpire i mitocondri: regolatori essenziali del metabolismo e della respirazione cellulare, e dei quali i cardiomiociti ne sono particolarmente ricchi. Abbiamo pertanto studiato il potenziale di membrana mitocondriale, come indicatore dello stato cellulare, per il loro coinvolgimento nel processo apoptotico cellulare (**Figura 5.12**). Analizzando i dati della fluorescenza, emessa alle diverse lunghezze d'onda dalla sonda JC-1, abbiamo potuto constatare che, nei cardiomiociti, trattati direttamente con DOX 0,5 (μM) o con il mezzo condizionato CM DOX 0,5 dei nMCF, non sussiste alcuna depolarizzazione significativa delle membrane mitocondriali, 30 ore dopo il trattamento, e per tanto non si registrano disfunzioni nella catena respiratoria mitocondriale.

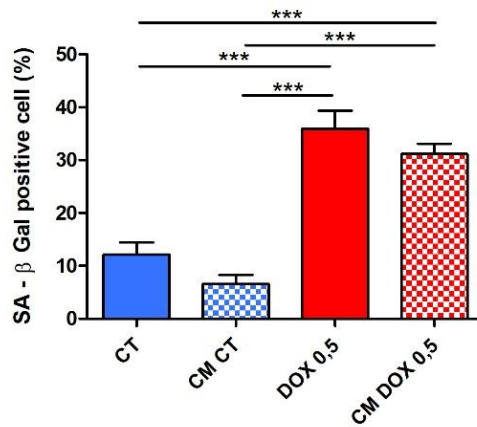


Figura 5.10. Il mezzo condizionato dei fibroblasti cardiaci induce senescenza nei cardiomiociti. Saggio enzimatico colorimetrico di β -Gal. ***P <0.0001. (n=5)

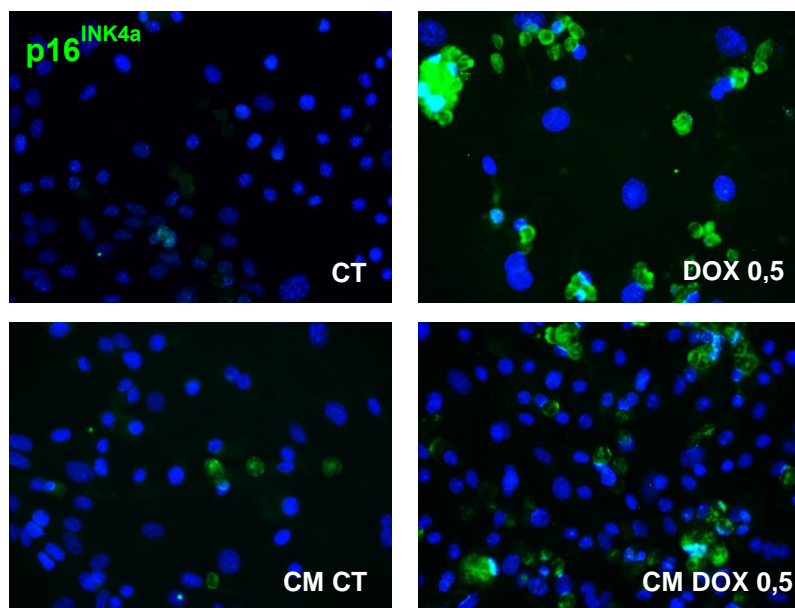


Figura 5.11. Il mezzo condizionato dei fibroblasti cardiaci induce senescenza nei cardiomiociti. Immunofluorescenza per p16. (Blu, DAPI; Verde, p16).

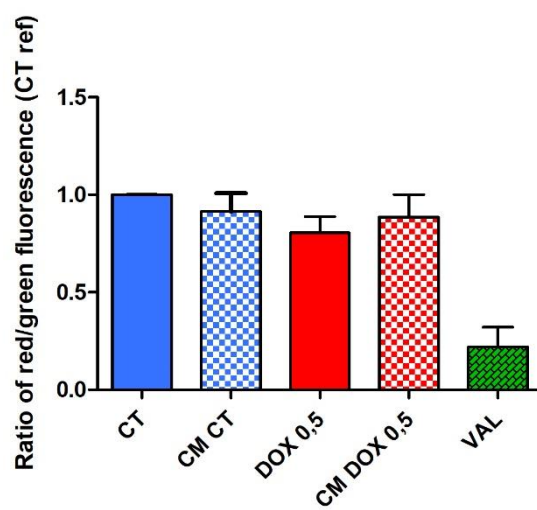


Figura 5.12. Il mezzo condizionato dei nMCF non causa apoptosi nei nMCM. Rapporto della fluorescenza rossa (560 nm) e verde (485 nm) del colorante di membrana mitocondriale JC-1. (n=3).

5.5 L'effetto paracrino dei Fibroblasti Cardiaci, esposti alla Doxorubicina, è causato da fattori SASP di diverso peso molecolare.

Le cellule, poiché dotate di membrana permeabile, sono in grado non solo di assorbire ma anche di espellere le molecole. Per escludere l'ipotesi che l'effetto paracrino dei fibroblasti cardiaci sui cardiomiociti dipendesse da possibili tracce di DOX, nel mezzo condizionato, abbiamo, prima di tutto, analizzato il secretoma dei nMCF (**Figura 5.13**, **Figura 5.14**), mediante analisi LC-MS, sia con metodo *targeted* che *untargeted*. Dall'analisi dei risultati ottenuti, confrontati con le curve di calibrazione dello standard di DOX, alle diverse concentrazioni, è possibile respingere l'idea di eventuali tracce di DOX, o metaboliti derivati, nei mezzi condizionati, con cui vengono a contatto i nMCM: infatti le possibili tracce di DOX potrebbero essere presenti in concentrazioni inferiori ad 1nM. Un'ulteriore prova, come conferma di quanto appena affermato, ha previsto l'utilizzo di filtri per separare il mezzo condizionato in due diverse fasi, una concentrata con metaboliti di peso molecolare superiore a 3000 KDa (CM CT CON e CM DOX 0,5 CON) ed una eluita comprendente eventuali tracce di DOX, o suoi metaboliti rilasciati dalle cellule (CM CT ELUIT e CM DOX 0,5 ELUIT) (**Figura 5.15**). Dai risultati ottenuti è possibile constatare come la senescenza indotta nei nMCM dipenda, non da possibili tracce di DOX o suoi metaboliti nel mezzo condizionato, ma bensì da molecole secrete dai nMCF senescenti. Inoltre dal grafico si evince che la senescenza indotta dai fibroblasti cardiaci è causata da fattori SASP di diverso peso molecolare, come evidenziato dalla persistenza della senescenza sia nel trattamento con CM DOX 0,5 CON che con CM DOX 0,5 ELUIT.

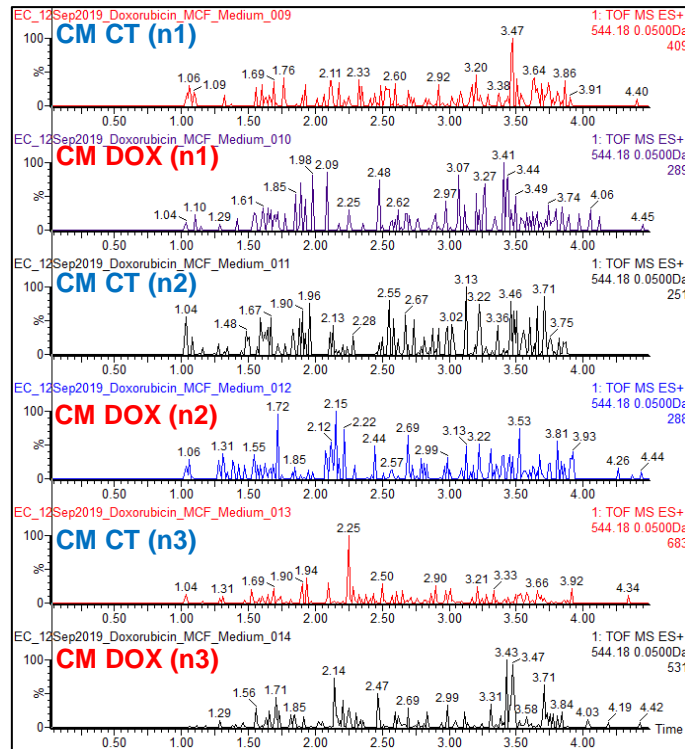
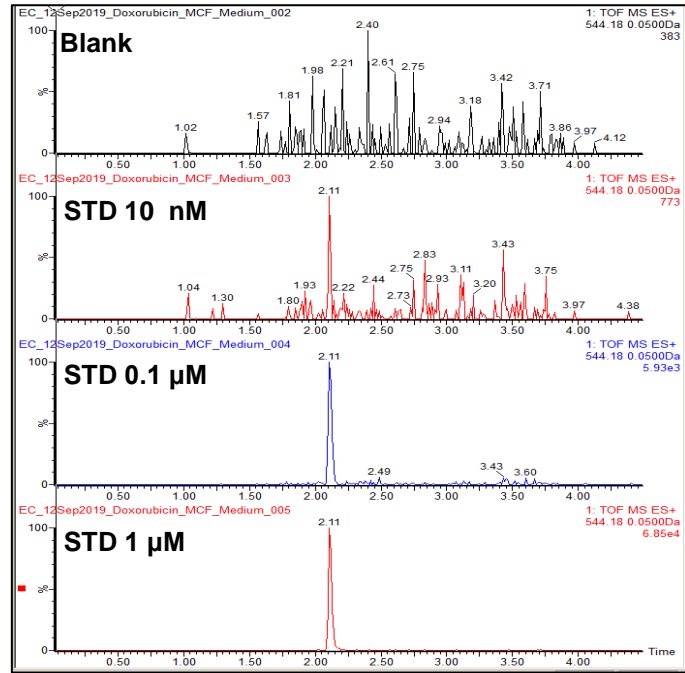


Figura 5.13. Non sono presenti tracce di DOX nel CM DOX di nMCF. Cromatogramma di ciascun campione con analisi *untargeted* (ESI+). STD (Standard DOX per curva di riferimento). (n=3).

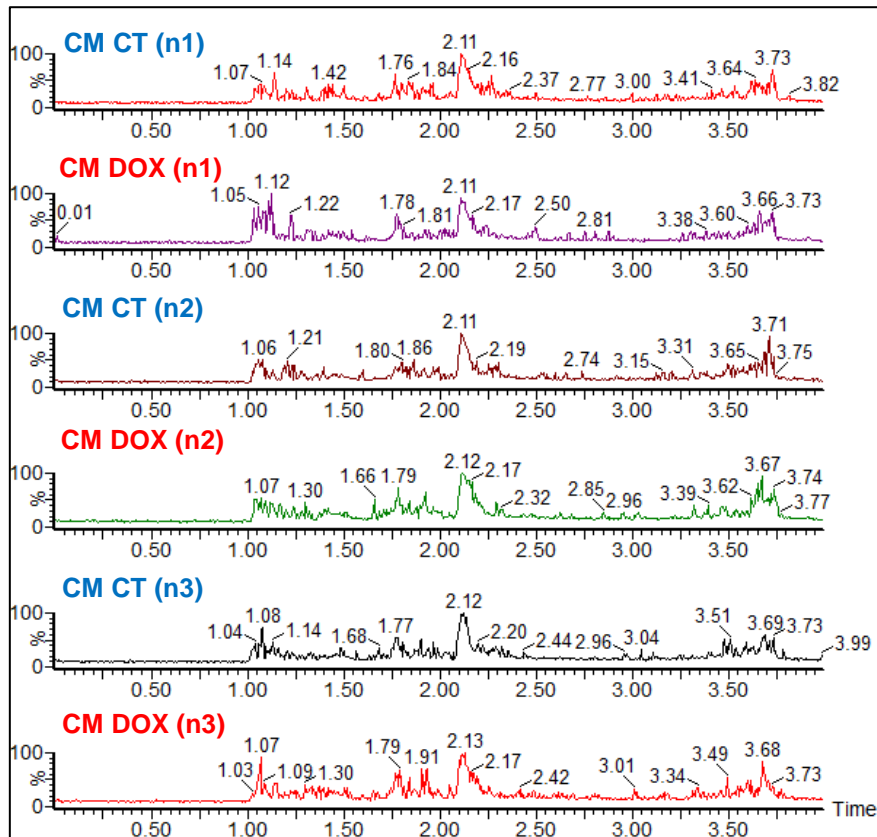
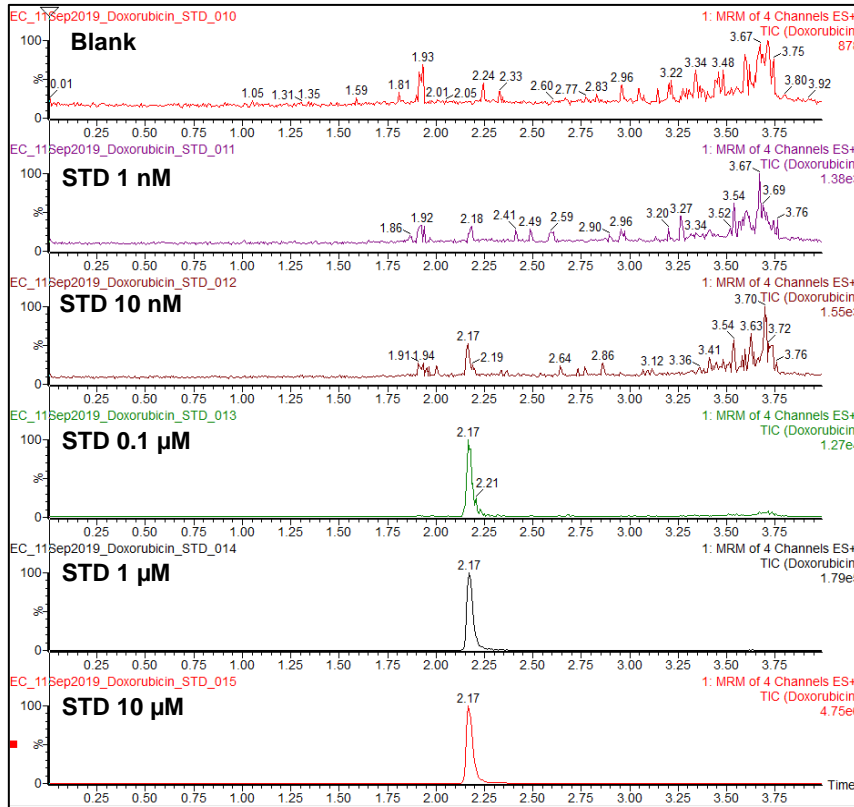


Figura 5.14. Non sono presenti tracce di DOX nel CM DOX di nMCF. Cromatogramma LC (MRM) di ciascun campione con analisi *targeted*. STD (Standard DOX per curva di riferimento). (n=3).

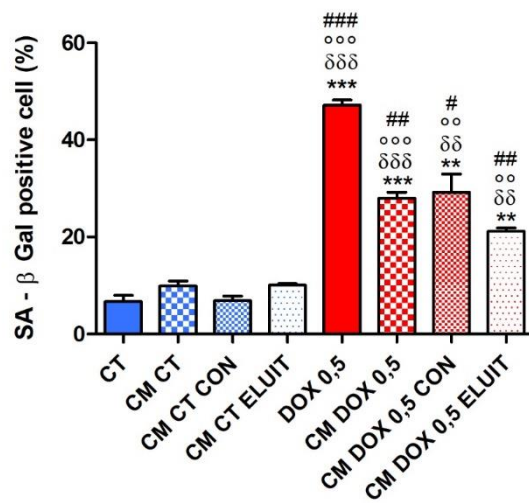


Figura 5.15. I nMCF, esposti alla DOX, causano la senescenza dei nMCM attraverso fattori SASP di diverso peso molecolare. Saggio enzimatico colorimetrico di β-Gal. *P vs CT; δ P vs CM CT; °P vs CM CT CON; #P vs CM CT ELUIT. (n=3).

5.6. I Fibroblasti Cardiaci umani, esposti alla Doxorubicina, attivano un segnale autocrino.

I fattori secreti dai fibroblasti sono gli effettori chiave della regolazione delle funzioni degli stessi fibroblasti. In particolare i fattori di crescita appartenenti alla famiglia del TGF- β sono noti essere stimolatori del fenotipo pro-fibrotico dei fibroblasti, sia *in vitro* che *in vivo*. Per studiarne il possibile coinvolgimento di questi fattori nell'attivazione dei fibroblasti in miofibroblasti, in maniera autocrina, il terreno di crescita dei HCF, condizionati o non condizionati con la DOX 0,3 μ M, è stato utilizzato per trattare HCF di pazienti diversi (**Figura 5.16**). Come si evince dai risultati ottenuti, valutando la senescenza mediante attività betagalattosidasica, è possibile affermare che i fattori secreti dagli stessi fibroblasti hanno un effetto stimolatorio pro-fibrotico autocrino; gli stessi fibroblasti sono protetti, quando pretrattati con PFT e GW, indicando che si tratta di fattori coinvolti nei *pathway* molecolari di p53 e TGF- β .

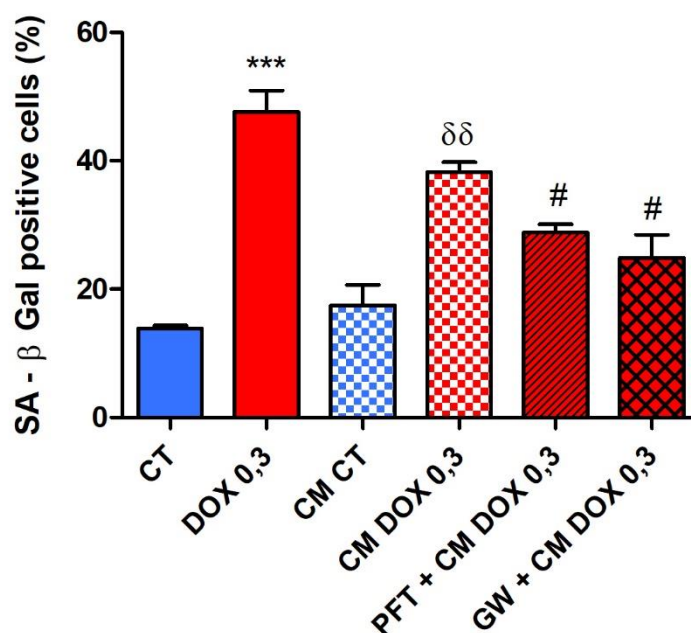


Figura 5.16. I HCF, esposti alla DOX, causano l'attivazione in maniera autocrina dei fibroblasti adiacenti. Saggio enzimatico colorimetrico di β -Gal. . *P vs CT; δ P vs CM CT; # P vs CM DOX. (n=3).

6. Discussione

La DOX è un antibiotico antineoplastico ad ampio spettro, appartenente alla classe delle antracicline, che può causare dapprima disfunzione ventricolare e poi cardiomiopatia dilatativa, in funzione, principalmente, della dose cumulativa somministrata e dell'età del paziente [12, 13, 14].

Il cuore è un organo complesso, costituito da una popolazione eterogena di cellule, tutte in perfetta sintonia tra loro, non solo strutturalmente, ma anche molecolarmente. Quando questo equilibrio viene intaccato, il cuore intero ne risente.

Molteplici studi sono stati svolti sulla cardiotossicità della DOX, e numerose strategie sono state proposte per ridurre o prevenire la tossicità a carico del tessuto cardiaco [37]. Tuttavia, si tratta esclusivamente di studi rivolti a comprendere il meccanismo d'azione della DOX sui cardiomiociti, ritenuto primario e responsabile della disfunzione cardiaca [38]. Fino a poco tempo fa, infatti, si riteneva che la DOX avesse un effetto diretto sui cardiomiociti, e si reputavano di scarsa importanza gli effetti sulla componente cellulare non cardiomiocitica, del cuore. Le cellule cardiache, però, sono connesse da comunicazioni morfo-funzionali, anche se di origine e natura differente, non solo attraverso connessioni di tipo strutturale (*gap-junction*) ma anche mediante traffici molecolari (recettori di membrana-ligando): questo è quanto accade nel caso di cardiomiociti e fibroblasti cardiaci, descritto in dettaglio da numerosi precedenti studi, soprattutto in condizioni patologiche [39, 40].

In particolare, l'attività della DOX sui fibroblasti cardiaci è stata poco investigata. È ormai consolidata la teoria riguardante lo stress diffuso che colpisce le cellule, quando ricevono la DOX [23, 24]: l'insieme dei molteplici solleciti molecolari, scatenati dall'antraciclina, possono essere causa della comparsa della senescenza [41]. È stato dimostrato, precedentemente nel nostro laboratorio, che il trattamento con l'antraciclina, a basse concentrazioni (DOX 0,1 μ M) induce la senescenza dei cardiomiociti [42]. Per questo motivo, abbiamo inizialmente condotto studi *in vitro* per saggiare lo stato cellulare di HCF, estratti dalle appendici atriali di donatori; abbiamo potuto constatare che la DOX induce la senescenza dei fibroblasti (**Figura 5.1**), anche a quelle concentrazioni che causano un'estesa apoptosi nei cardiomiociti [42]. Siamo riusciti ad individuare la concentrazione di

DOX (0,3 μ M), in grado di limitare la proliferazione dei HCF, senza avviare processi apoptotici. Al fenotipo senescente si accompagna generalmente un aumento delle dimensioni cellulari [43]: come atteso, la concentrazione di DOX utilizzata è stata sufficiente ad indurre un cambiamento morfologico dei HCF, che appaiano fenotipicamente appiattiti e allargati, rispetto a quelli che non hanno subito alcun trattamento (CT) (**Figura 5.4**).

La maggior parte delle condizioni patologiche miocardiche sono associate a fibrosi, dovuta alla deposizione di proteine della ECM; ed i fibroblasti cardiaci sono i principali fautori di questa condizione: riparano la lesione per mantener l'integrità strutturale, ma riducono il potere contraente dell'intero complesso [44]. Al cambio del fenotipo corrisponde un cambio nella sintesi delle molecole, imposto dalla trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti: nei nostri esperimenti infatti i HCF, in seguito al trattamento con DOX, aumentano l'espressione di α -SMA (**Figura 5.7**), proteina *marker* del differenziamento cellulare, e dei collagene (fibre di tipo I e III), propri della ECM (**Figura 5.7**). I nostri esperimenti individuano una risposta, di tipo acuta, dei fibroblasti, alla dose di DOX ricevuta, nelle ore successive (45 ore) al tempo di esposizione (3 ore); recentemente Narikawa [34] ed il suo gruppo hanno messo in evidenza un comportamento simile di HCF, sottoposti a trattamento prolungato (24, 48, 72 ore) di DOX (0,1 μ M), in cui si evidenzia un incremento di espressione di α -SMA, TGF- β e del collagene. Diversamente nei nostri esperimenti abbiamo potuto constatare che la DOX oltre a promuovere l'attivazione dei HCF, induce la senescenza cellulare.

Comprendere i meccanismi molecolari che si scatenano nelle cellule è certamente importante per studiare possibili strategie di riparazione del danno; per tale motivo abbiamo cercato di identificare i *pathway* attraverso cui la DOX agisce. In precedenti studi è stato attribuito a p53 un ruolo chiave nella senescenza delle cellule cardiache [41, 42]; questo è stato il motivo della nostra attenzione sul possibile coinvolgimento di p53 nella patogenesi da DOX nei fibroblasti. Lo stress ossidativo ed il danno al DNA, scatenati dalla DOX, inducono l'incremento di p53, inibito invece dal trattamento preventivo con PFT (**Figura 5.5**). L'andamento di espressione di p53 rispecchia quello di p21: quando fosforilato, p53 attiva la trascrizione di p21 nel nucleo. *In vitro* abbiamo messo in evidenza il coinvolgimento di p53 nella senescenza e nell'attivazione dei HCF, che opera a monte di p21 (**Figura 5.6**). Siamo riusciti a dare risalto ad una seconda via di regolazione del ciclo cellulare, attuata da p16: il trattamento della DOX può essere contenuto pretrattando le cellule con PFT, e riducendo la percentuale di cellule senescenti (**Figura 5.6**). Questi esperimenti dimostrano la presenza di due vie di regolazione della senescenza dei HCF: una mediata da p53,

attraverso p21, ed una parallela dipendente da p16, ma entrambe bloccate dal pretrattamento con PFT (**Figura 5.6**). Un comportamento identico si osserva nei HCF trattati con GW: il suo effetto protettivo dalla senescenza e dal differenziamento pro-fibrotico a causa della DOX (**Figura 5.8, 5.9**), dimostrano che il *pathway* di TGF- β è coinvolto nella regolazione nel differenziamento e nella crescita dei fibroblasti [45,46]. I risultati che abbiamo ottenuto individuano due possibili meccanismi molecolari che intervengono nella patogenesi dei HCF: quello di p53, a valle di p21, e quello del TGF- β . In particolare dagli esperimenti abbiamo osservato che si attiva una seconda via di regolazione del ciclo cellulare, attraverso p16, a causa dello stress causato dalla DOX, e che anch'essa è inibita da PFT.

Lo stato di senescenza cellulare non è un fenomeno isolato, ma coinvolge le cellule adiacenti mediante il rilascio di molecole "segnale", o meglio conosciute come fattori SASP, sufficienti ad indurre proliferazione o senescenza, e ad attivare il sistema immunitario. Abbiamo analizzato, per tanto, il secretoma dei nMCF ed il suo effetto sui nMCM contigui. Il CM DOX dei nMCF induce la senescenza dei nMCM (**Figura 5.10**), e porta all'attivazione parallela del *pathway* di p16 nella regolazione del ciclo cellulare (**Figura 5.11**), senza indurre alterazioni mitocondriali, e conseguente apoptosi (**Figura 5.12**). Siamo riusciti ad escludere la possibilità dell'eventuale presenza di DOX o suoi metaboliti nel mezzo condizionato dei nMCF trattati con la DOX 0,5 μ M; inoltre lo stesso CM induce la senescenza dei cardiomiociti. Concentrando il mezzo condizionato dei nMCF, con filtri da 3000 KDa, sia la porzione CM DOX CON, che quella CM DOX ELUIT inducono la senescenza dei nMCM; questo risultato ci fa ipotizzare che nel secretoma dei nMCF siano presenti fattori SASP di diverso peso molecolare, che avviano stessi processi, o diversi, ma che conducono, in ugual misura, i nMCM nello stato di senescenza (**Figura 5.15**). Questi risultati supportano e sono supportati dalla teoria dell'esistenza di interazioni di tipo biochimico tra cardiomiociti e fibroblasti cardiaci [39], che si influenzano vicendevolmente per mantenere e garantire l'integrità tissutale.

All'effetto paracrino dei fattori SASP si può affiancare un effetto autocrino [47], in cui i fibroblasti secernenti rilasciano fattori che guidano la loro stessa regolazione. Questo è quanto abbiamo potuto constatare nei HCF trattati con i CM di altri HCF, precedentemente sottoposti alla terapia con DOX: allo stesso modo il CM induce la senescenza in HCF proliferanti (**Figura 5.16**).

Nel complesso, gli esperimenti eseguiti suggeriscono che la DOX, a concentrazioni subapoptotiche, esercita un effetto diretto sui fibroblasti cardiaci. Il ruolo di questo tipo cellulare nella cardiotossicità da DOX, perciò, potrebbe essere più rilevante di quanto sinora apprezzato da un'ampia attività di ricerca, che è stata, invece, incentrata sullo studio degli effetti della DOX sui cardiomiociti. I fibroblasti, attivati dalla DOX in miofibroblasti, sono in grado di guidare i processi alla base della regolazione cellulare, nello stato cardiaco patologico, in senso autocrino e paracrino, attraverso il loro secretoma; coerentemente con l'evidenza sperimentale che esiste una comunicazione biochimica, elettrica e biomeccanica tra i fibroblasti e i cardiomiociti. Questo studio rappresenta l'inizio di una lunga ricerca dei meccanismi e delle molecole, che si attivano nella tossicità da DOX, specificamente a carico dei fibroblasti cardiaci, e che inducono una regolazione a valle dei cardiomiociti. Ulteriori esperimenti saranno per tanto rivolti alla caratterizzazione del secretoma dei miofibroblasti indotti dalla DOX, alla stessa concentrazione subapoptotica, per poter meglio identificare i processi che si instaurano nei cardiomiociti e ne causano la loro instabilità, nella cardiotossicità da DOX.

7. Bibliografia

- [1] Thibodeau GA, Patton KT: Anatomy & physiology, ed 3, St Louis, 1996, Mosby.
- [2] Nag AC. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios.* 1980;28(109):41-61. PubMed PMID:7428441.
- [3] Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, Kuwabara JT, D'Antoni ML, Debuque R, Chandran A, Wang L, Arora K, Rosenthal NA, Tallquist MD. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res.* 2016 Feb 5;118(3):400-9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307778. Epub 2015 Dec 3. PubMed PMID: 26635390; PubMed Central PMCID: PMC4744092.
- [4] Wang L, Yu P, Zhou B, Song J, Li Z, Zhang M, Guo G, Wang Y, Chen X, Han L, Hu S. Single-cell reconstruction of the adult human heart during heart failure and recovery reveals the cellular landscape underlying cardiac function. *Nat Cell Biol.* 2020 Jan;22(1):108-119. doi: 10.1038/s41556-019-0446-7. Epub 2020 Jan 8. PubMed PMID: 31915373.
- [5] Von Hoff DD, Layard MW, Basa P, Davis HL Jr, Von Hoff AL, Rozenzweig M, Muggia FM. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med.* 1979 Nov;91(5):710-7. PubMed PMID: 496103.
- [6] Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer.* 2003 Jun 1;97(11):2869-79. PubMed PMID: 12767102.
- [7] Curigliano G, Cardinale D, Suter T, Plataniotis G, de Azambuja E, Sandri MT, Criscitiello C, Goldhirsch A, Cipolla C, Roila F; ESMO Guidelines Working Group. Cardiovascular toxicity induced by chemotherapy, targeted agents and radiotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol.* 2012 Oct;23 Suppl 7:vii155-66. PubMed PMID: 22997448.
- [8] Shakir DK, Rasul KI. Chemotherapy induced cardiomyopathy: pathogenesis, monitoring and management. *J Clin Med Res.* 2009 Apr;1(1):8-12. doi: 10.4021/jocmr2009.02.1225. Epub 2009 Mar 24. PubMed PMID: 22505958; PubMed Central PMCID: PMC3318862.

- [9] Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, Civelli M, Lamantia G, Colombo N, Curigliano G, Fiorentini C, Cipolla CM. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*. 2015 Jun 2;131(22):1981-8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777. Epub 2015 May 6. PubMed PMID: 25948538.
- [10] Tocchetti CG, Cadeddu C, Di Lisi D, Femminò S, Madonna R, Mele D, Monte I, Novo G, Penna C, Pepe A, Spallarossa P, Varricchi G, Zito C, Pagliaro P, Mercurio G. From Molecular Mechanisms to Clinical Management of Antineoplastic Drug-Induced Cardiovascular Toxicity: A Translational Overview. *Antioxid Redox Signal*. 2019 Jun 20;30(18):2110-2153. doi: 10.1089/ars.2016.6930. Epub 2017 May 15. PubMed PMID: 28398124; PubMed Central PMCID: PMC6529857.
- [11] Xing M, Yan F, Yu S, Shen P. Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials. *PLoS One*. 2015 Jul 23;10(7):e0133569. doi: 10.1371/journal.pone.0133569. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26204517; PubMed Central PMCID: PMC4512701.
- [12] Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Jun 16;53(24):2231-47. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.050. Review. PubMed PMID: 19520246
- [13] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007 Mar-Apr;49(5):330-52. Review. PubMed PMID: 17329180
- [14] Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*. 2010;115(2):155-62. doi: 10.1159/000265166. Epub 2009 Dec 11. Review. PubMed PMID: 20016174; PubMed Central PMCID: PMC2848530.
- [15] Lipshultz SE, Miller TL, Scully RE, Lipsitz SR, Rifai N, Silverman LB, Colan SD, Neuberg DS, Dahlberg SE, Henkel JM, Asselin BL, Athale UH, Clavell LA, Laverdière C, Michon B, Schorin MA, Sallan SE. Changes in cardiac biomarkers during doxorubicin treatment of pediatric patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: associations with long-term echocardiographic outcomes. *J Clin Oncol*. 2012 Apr 1;30(10):1042-9. doi: 10.1200/JCO.2010.30.3404. Epub 2012 Feb 27. PubMed PMID: 22370326; PubMed Central PMCID: PMC3341148.

- [16] Thavendiranathan P, Poulin F, Lim KD, Plana JC, Woo A, Marwick TH. Use of myocardial strain imaging by echocardiography for the early detection of cardiotoxicity in patients during and after cancer chemotherapy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 1;63(25 Pt A):2751-68. doi: 10.1016/j.jacc.2014.01.073. Epub 2014 Apr 2. Review. PubMed PMID: 24703918.
- [17] Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnol Bioeng*. 2000 Mar 20;67(6):704-13. PubMed PMID: 10699851.
- [18] Marafino BJ Jr, Giri SN, Siegel DM. Pharmacokinetics, covalent binding and subcellular distribution of [³H]doxorubicin after intravenous administration in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981 Jan;216(1):55-61. PubMed PMID: 7452508.
- [19] Dessypris EN, Brenner DE, Baer MR, Hande KR. Uptake and intracellular distribution of doxorubicin metabolites in B-lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res*. 1988 Feb 1;48(3):503-6. PubMed PMID: 3257165.
- [20] Farhane Z, Bonnier F, Byrne HJ. Monitoring doxorubicin cellular uptake and trafficking using in vitro Raman microspectroscopy: short and long time exposure effects on lung cancer cell lines. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Feb;409(5):1333-1346. doi: 10.1007/s00216-016-0065-0. Epub 2016 Nov 25. PubMed PMID: 27888307.
- [21] Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res*. 2001 Mar 15;61(6):2467-71. PubMed PMID: 11289116.
- [22] Carpenter AJ, Porter AC. Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell*. 2004 Dec;15(12):5700-11. Epub 2004 Sep 29. PubMed PMID: 15456904; PubMed Central PMCID: PMC532048.
- [23] Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, Yeh ET. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med*. 2012 Nov;18(11):1639-42. doi: 10.1038/nm.2919. Epub 2012 Oct 28. PubMed PMID: 23104132.

- [24] Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*. 2007 May 15;115(19):2540-8. PubMed PMID: 17502589.
- [25] Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res*. 2012 Oct 12;111(9):1198-207. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268946. Review. PubMed PMID: 23065343.
- [26] Koleini N, Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget*. 2017 Jul 11;8(28):46663-46680. doi: 10.18632/oncotarget.16944. Review. PubMed PMID: 28445146; PubMed Central PMCID: PMC5542301.
- [27] Wenzel DG, Cosma GN. A model system for measuring comparative toxicities of cardiotoxic drugs for cultured rat heart myocytes, endothelial cells and fibroblasts. II. Doxorubicin, 5-fluorouracil and cyclophosphamide. *Toxicology*. 1984 Nov;33(2):117-28. PubMed PMID: 6506081.
- [28] Snider P, Standley KN, Wang J, Azhar M, Doetschman T, Conway SJ. Origin of cardiac fibroblasts and the role of periostin. *Circ Res*. 2009 Nov 6;105(10):934-47. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.201400. Review. PubMed PMID:19893021; PubMed Central PMCID: PMC2786053.
- [29] Naugle JE, Olson ER, Zhang X, Mase SE, Pilati CF, Maron MB, Folkesson HG, Horne WI, Doane KJ, Meszaros JG. Type VI collagen induces cardiac myofibroblast differentiation: implications for postinfarction remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jan;290(1):H323-30. Epub 2005 Sep 2. PubMed PMID: 16143656.
- [30] Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res*. 2009 Dec 4;105(12):1164-76. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209809. Review. PubMed PMID: 19959782; PubMed Central PMCID: PMC3345531.
- [31] Ottaviano FG, Yee KO. Communication signals between cardiac fibroblasts and cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011 May;57(5):513-21. doi: 10.1097/FJC.0b013e31821209ee. Review. PubMed PMID: 21297490.
- [32] Kakkar R, Lee RT. Intramyocardial fibroblast myocyte communication. *Circ Res*. 2010 Jan 8;106(1):47-57. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207456. Review. PubMed PMID: 20056945; PubMed Central PMCID: PMC2805465.

- [33] Levick SP, Soto-Pantoja DR, Bi J, Hundley WG, Widiapradja A, Manteufel EJ, Bradshaw TW, Meléndez GC. Doxorubicin-Induced Myocardial Fibrosis Involves the Neurokinin-1 Receptor and Direct Effects on Cardiac Fibroblasts. *Heart Lung Circ.* 2019 Oct;28(10):1598-1605. doi: 10.1016/j.hlc.2018.08.003. Epub 2018 Sep 2. PubMed PMID: 30205930.
- [34] Narikawa M, Umemura M, Tanaka R, Hikichi M, Nagasako A, Fujita T, Yokoyama U, Ishigami T, Kimura K, Tamura K, Ishikawa Y. Doxorubicin induces trans-differentiation and MMP1 expression in cardiac fibroblasts via cell death-independent pathways. *PLoS One.* 2019 Sep 12;14(9):e0221940. doi: 10.1371/journal.pone.0221940. eCollection 2019. PubMed PMID: 31513610; PubMed Central PMCID: PMC6742217.
- [35] Altieri P, Bertolotto M, Fabbi P, Sportelli E, Balbi M, Santini F, Brunelli C, Canepa M, Montecucco F, Ameri P. Thrombin induces protease-activated receptor 1 signaling and activation of human atrial fibroblasts and dabigatran prevents these effects. *Int J Cardiol.* 2018 Nov 15;271:219-227. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.05.033. Epub 2018 May 24. PubMed PMID: 29801760.
- [36] Spallarossa P, Altieri P, Aloï C, Garibaldi S, Barisione C, Ghigliotti G, Fugazza G, Barsotti A, Brunelli C. Doxorubicin induces senescence or apoptosis in rat neonatal cardiomyocytes by regulating the expression levels of the telomere binding factors 1 and 2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Dec;297(6):H2169-81. doi: 10.1152/ajpheart.00068.2009. Epub 2009 Oct 2. PubMed PMID: 19801496.
- [37] Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Sep 2;64(9):938-45. doi: 10.1016/j.jacc.2014.06.1167. Review. PubMed PMID: 25169180.
- [38] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004 Jun;56(2):185-229. Review. PubMed PMID: 15169927.
- [39] Pellman J, Zhang J, Sheikh F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems. *J Mol Cell Cardiol.* 2016 May;94:22-31. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.005. Epub 2016 Mar 18. Review. PubMed PMID: 26996756; PubMed Central PMCID: PMC4861678.
- [40] Civitarese RA, Kapus A, McCulloch CA, Connelly KA. Role of integrins in mediating cardiac fibroblast-cardiomyocyte cross talk: a dynamic relationship in cardiac biology

- and pathophysiology. *Basic Res Cardiol*. 2017 Jan;112(1):6. doi: 10.1007/s00395-016-0598-6. Epub 2016 Dec 20. Review. PubMed PMID: 28000001.
- [41] Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell*. 2008 Mar;7(2):125-36. Epub 2007 Nov 21. PubMed PMID: 18031568.
- [42] Altieri P, Barisione C, Lazzarini E, Garuti A, Bezante GP, Canepa M, Spallarossa P, Tocchetti CG, Bollini S, Brunelli C, Ameri P. Testosterone Antagonizes Doxorubicin-Induced Senescence of Cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*. 2016 Jan 8;5(1). pii: e002383. doi: 10.1161/JAHA.115.002383. PubMed PMID: 26746999; PubMed Central PMCID: PMC4859360.
- [43] Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011 Feb 21;192(4):547-56. doi: 10.1083/jcb.201009094. Epub 2011 Feb 14. Review. PubMed PMID: 21321098; PubMed Central PMCID: PMC3044123.
- [44] Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 Jun 24;4(3):449-467. doi: 10.1016/j.jacbts.2019.02.006. eCollection 2019 Jun. Review. PubMed PMID: 31312768; PubMed Central PMCID: PMC6610002.
- [45] Lyu G, Guan Y, Zhang C, Zong L, Sun L, Huang X, Huang L, Zhang L, Tian XL, Zhou Z, Tao W. TGF- β signaling alters H4K20me3 status via miR-29 and contributes to cellular senescence and cardiac aging. *Nat Commun*. 2018 Jul 2;9(1):2560. doi: 10.1038/s41467-018-04994-z. PubMed PMID: 29967491; PubMed Central PMCID: PMC6028646.
- [46] Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, Correll RN, Fu X, Schips T, Vagnozzi RJ, Liu R, Huynh T, Lee SJ, Karch J, Molkentin JD. Fibroblast-specific TGF- β -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. 2017 Oct 2;127(10):3770-3783. doi: 10.1172/JCI94753. Epub 2017 Sep 11. PubMed PMID: 28891814; PubMed Central PMCID: PMC5617658.
- [47] Wagner JUG, Dimmeler S. Cellular cross-talks in the diseased and aging heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2019 Nov 26;138:136-146. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.11.152. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 31783034.