

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra (DiBEST)

Dottorato di Ricerca in

Scienze della vita

CICLO

XXXII

Livelli fisiologici della Cromogranina A esercitano potente effetto cardioprotettivo contro la cardiotoxicità indotta da doxorubicina

Settore Scientifico Disciplinare (BIO/09)

Coordinatore:

Chiar.ma Prof. ssa Maria Carmela Cerra

Tutor:

Chiar.mo Prof. Tommaso Angelone

Dottorando:

Dott.ssa Maria Concetta Granieri

Co-Tutor:

Dott.ssa Teresa Pasqua

Indice

<i>Abstract</i>	3
<i>Premessa e scopo</i>	10
<i>Introduzione</i>	14
1. Antracicline	15
2. Doxorubicina	16
2.1 Meccanismo d'azione	18
2.2 Doxo e cardiotoxicità: fattori di rischio	21
2.3 Strategie di prevenzione	23
3. Cromogranina A	26
3.1 Ruolo dei peptidi CgA derivati	29
3.2 CgA come biomarker	33
3.2.1 Ruolo cardiovascolare	35
3.3 Effetti cardiaci	38
3.4 Ruolo nella cardioprotezione	43
<i>Materiali e Metodi</i>	46
1. Sostanze utilizzate	46
2. Esperimenti <i>in vivo</i> su ratto	46
3. Esperimenti <i>Ex vivo</i> sul cuore di ratto	47
3.1 Perfusioni cardiaca	47
3.2 Apparato di perfusione	48
3.3 Composizione del Krebs Henseleit (KHs)	49
3.4 Sistema di acquisizione dei parametri cardiaci	50
3.5 Parametri dell'attività cardiaca	51
3.6 Protocolli di Ischemia/Riperfusione	52
3.7 Area d'infarto	53
4. ELISA	54
5. Determinazione del LDH	55
6. Western Blotting	55
7. Analisi istologica e apoptosi	56
8. Studi <i>in vivo</i> in topi impiantati con tumori	57
9. Statistica	58
<i>Risultati</i>	60
1. La CgA protegge contro la cardiotoxicità indotta da Doxo in un modello di ratto	61
1.1 La CgA esogena riduce l'infiammazione dipendente da Doxo	61

1.2 La CgA esogena previene la fibrosi cardiaca dipendente da Doxo	61
1.3 La CgA riduce il danno da I/R nel cuore di ratto	63
1.4 Effetto dei peptidi CgA derivati (Cts, VS1, Serp) sul danno da I/R	65
1.5 La CgA attiva pathway intracellulari protettivi e disattiva l'up-regolazione dei componenti infiammatori nel tessuto cardiaco dopo I/R	66
1.6 La CgA riduce la produzione di radicali liberi indotti da I/R nei cuori dei ratti trattati con Doxo	67
1.7 La CgA protegge il cuore dall'apoptosi	69
2. Il trattamento con Doxo riduce l'espressione intracardiaca della CgA	71
3. Il trattamento con Doxo causa la riduzione endogena della CgA plasmatica	72
4. La CgA non influisce sull'attività antitumorale della Doxo in modelli murini	75
<i>Discussione</i>	77
<i>Conclusione</i>	88
<i>Bibliografia</i>	90

Abstract

The clinical use of doxorubicin (Doxo), a widely used anticancer chemotherapeutic drug, is limited by dose-dependent cardiotoxicity. We have investigated whether chromogranin A (CgA), a cardioregulatory protein released in the blood by the neuroendocrine system and by the heart itself, may contribute to the regulation of cardiotoxic and antitumor activities of Doxo. We evaluated whether and to which extent, the *in vivo* administration of physiological doses of recombinant full-length CgA may exert cardioprotection in a Doxo-induced cardiotoxicity rat model and modulate the anticancer activity of Doxo in murine models of melanoma, fibrosarcoma, lymphoma, and lung cancer, respectively. The effect of Doxo on circulating levels of CgA was also investigated. At the end of the treatment, hearts were perfused by Langendorff method and Ischemic protocols were used. Western Blot, Immunohistochemistry techniques, and ELISA assay were used for molecular analysis and plasma measurements of TNF α , IL-1 β , ROS, LDH, cTnT and CgA. We found that CgA mitigated Doxo-dependent adverse effects, as revealed by the reduction of pro-inflammatory and cardiotoxic markers. Doxo reduced CgA plasma levels. When given together with Doxo, CgA increased the systolic function after ischemia and reduced the infarct size, compared to the Doxo group alone. Molecular analysis indicated that CgA reduced CTGF expression, induced activation of the RISK and SAFE pathways and of AMPK, and reduced inflammatory targets such as iNOS, COX2, NLRP3. CgA reduced intracardiac ROS and the expression of AOX-1 and XO. CgA-dependent cardioprotection was mediated by ARC activation, by the increase of Bcl2 and the reduction of BAX, Caspase3 and the apoptotic nuclei. Furthermore, we observed that Doxo reduces the intracardiac expression and release of CgA (i.e., an important cardioprotective agent) in the blood. On the other hand, CgA did not impair the anticancer activity of Doxo in all the investigated murine models. These data suggest that CgA could mitigate Doxo-induced cardiotoxicity by limiting ischemic injury. The protein can be proposed as a possible biomarker and the administration of exogenous CgA to patients with low levels of the endogenous protein might represent a novel approach to prevent Doxo-induced adverse events without impairing its antitumor effects.

University of Calabria

Laboratory of Cellular and Molecular Cardiovascular Physiopathology

Dept. of Biology, Ecology and E.S. University of Calabria

XXXII Cycle of Doctorate in

Scienze della Vita

Ph.D. Student: Maria Concetta Granieri

Thesis: *Physiological levels of Chromogranin A exert a potent cardioprotective effect against Doxorubicin-induced cardiotoxicity*

Research:

Dr. Maria Concetta Granieri holds a research doctorate scientific activity in the Laboratory of cellular and molecular cardiovascular physiopathology, under the supervision of Prof. Tommaso Angelone, Department of Biology, Ecology and Earth Sciences, University of Calabria.

Dr. Granieri used *in vivo* and *ex vivo* rat models to investigate, for the first time, the cardioprotective effects of Chromogranin A against Doxorubicin-induced cardiotoxicity. In particular, Dr. Granieri demonstrated that Chromogranin A (CgA) can prevent Doxo-induced acute cardiotoxicity. Her study demonstrated that systemic administration of low-dose CgA (10.71 µg/kg/d, ip) protects rats against Doxo-induced inflammation, cardiac fibrosis, damage, and I/R lesions. Using the isolated and perfused Langendorff rat heart, she studied the cardioprotective effects of CgA that were evident by a significant recovery of contractility (developed left ventricular pressure, dLVP) and by a reduction of the infarct size (IS), without changes in cardiac contracture (left diastolic and left ventricular pressure, LVEDP). Western Blot and immunohistochemistry techniques, together with ELISA assays, were used for molecular analysis and plasma measurements of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α), Interleukin 1-beta (IL-1 β), cardiac Troponin T (cTnT), Reactive Oxygen Species (ROS), Lactate Dehydrogenase (LDH), plasma proteins and CgA. Results showed that CgA mitigated Doxo-dependent adverse effects, as revealed by the restored levels of TNF α , IL-1 β , cTnT, plasma proteins and ROS. Molecular analysis indicated that CgA reduced the expression of connective tissue growth factor (CTGF), induced activation of the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK), of the Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE), and of AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways, reducing inflammatory targets such as inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), Cyclooxygenase-2 (COX2), and Inflammasome (NLRP3). CgA reduced intracardiac ROS, Aldehyde oxidase 1 (AOX-1), and Xanthine oxidase (XO) expression.

The CgA-dependent cardioprotection was mediated by the activation of the Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein (ARC), by the increase of B-cell lymphoma 2 (Bcl2) and by the reduction of Bcl2 Associated X (BAX), Caspase3 and apoptotic nuclei.

The effects of a physiological dose of recombinant full-length CgA on cardiotoxicity and on Doxo-induced anticancer activity were studied in mouse models of melanoma, fibrosarcoma, lymphoma and lung carcinoma, respectively. CgA did not compromise the antitumor activity of Doxo in all the mouse models studied. Furthermore, Doxo can reduce intracardiac expression and cardiac release of CgA in the blood (i.e. an important cardioprotective agent).

During her doctorate activity, Dr. Granieri participated in seminars within the PhD in Life Sciences. During her doctorate period, Dr. Granieri obtained important novel and publishable data that are illustrated in her thesis. Most of this work has been published on international journal (Faseb Journal) and presented in national and international meetings. Dr. Granieri has been tutor of several students of Biology and Pharmacy degree courses during their thesis preparation and support teacher for Physiology courses.

Academic College exhibits a positive opinion for the excellent research work conducted by Dr. Granieri.

Publications:

1. Carmine Rocca, Francesco Scavello, Barbara Colombo, Anna Maria Gasparri, Alice Dallatomasina, **Maria Concetta Granieri**, Daniela Amelio, Teresa Pasqua, Maria Carmela Cerra, Bruno Tota, Angelo Corti and Tommaso Angelone. Physiological levels of Chromogranin A prevent doxorubicin-induced cardiotoxicity without impairing its anticancer activity." FASEB JOURNAL 2019, 33(6):7734-7747 doi: 10.1096/fj.201802707R." IF:5.498
2. Teresa Casacchia, Maria Antonietta Occhiuzzi, Fedora Grandea, Bruno Rizzuti, **Maria Concetta Granieri**, Carmine Rocca, Alfonsina Gattuso, Antonio Garofalo, Tommaso Angelone, Giancarlo Statti. A pilot study on the nutraceutical properties of the Citrus hybrid Tacle® as a dietary source of polyphenols for supplementation in metabolic disorders. "Journal of Functional Foods 52 (2019) 370–381" IF:3.470
3. Rocca C, Femminò S, Aquila G, **Granieri MC**, De Francesco EM, Pasqua T, Rigracciolo DC, Fortini F, Cerra MC, Maggiolini M, Pagliaro P, Rizzo P, Angelone T and Penna C.
Notch
1
Mediates Preconditioning Protection Induced by GPER in Normotensive and Hypertensive Female Rat Hearts. "Frontiers in Physiology 15;9:521. doi: 10.3389/fphys.2018.00521." IF:3.394
4. C. Rocca, L. Boukhzar, **M.C. Granieri**, I. Alsharif, R. Mazza, B. Lefranc, B. Tota, J. Leprince, M.C. Cerra, Y. Anouar and T. Angelone. A selenoprotein T-derived peptide as a novel cardiac modulator: protection against ischemia/reperfusion injury and mechanism of action. "Acta Physiologica 223(4):e13067. doi: 10.1111/apha.13067." IF:5.930
5. T. Casacchia, F. Scavello, C. Rocca, **M.C. Granieri**, G. Beretta, D. Amelio, F. Gelmini, A. Spina, R. Mazza, C. Toma, T. Angelone, G. Statti, T. Pasqua. Leopoldia comosa prevents metabolic disorders in rats with high-fat diet- induced obesity. "European Journal of Nutrition doi:

10.1007/s00394-018-1609-1."IF:4.423

6. C. Rocca, F. Scavello, **M.C. Granieri**, T. Pasqua, N. Amodio, S. Imbrogno, A. Gattuso, R. Mazza, M.C. Cerra & T. Angelone. Phoenixin-14: detection and novel physiological implications in cardiac modulation and cardioprotection. "Cellular and Molecular Life Sciences 75(4):743-756. doi: 10.1007/s00018-017-2661-3." IF:6.721

Oral communications:

1. Pasqua T, Rocca C, **Granieri MC**, Palasz A, Cerra MC, and Angelone T. Phoenixin-14 induces cardioprotection as post-conditioning agent in rats with high-fat diet induced obesity. Sottomesso e approvato per il "XIII Annual Meeting of Young Researchers In Physiology", Italian Physiological Society (SIF), Anacapri, 10-12 May 2019.

Poster communications:

1. De Bartolo A, **Granieri MC**, Rocca C, Pasqua T, Schneider F, Panno ML, Metz-Boutigue MH, Giordano F, Angelone T. Cateslytin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced cardiomyocyte injury by switching off inflammation. Sottomesso e approvato per il "22th Congress of the Italian Society of Cardiovascular Research (SIRC)", Imola 6-8 November 2019. Award TRAVEL GRANT
2. **Maria Concetta Granieri**, C. Rocca, M.C. Cerra, T. Pasqua & T. Angelone. The hypothalamic Phoenixin14: a novel protector of cardiac function in the metabolic syndrome. Sottomesso e approvato per il "IV Forum New Roads in Cardiovascular Research", Italian Society of Cardiovascular Research (SIRC), Rome, 6 October 2018.
3. **Maria Concetta Granieri**, C. Rocca, M.C. Cerra, T. Pasqua & T. Angelone. The novel function of Phoenixin14 as a cardioprotector in the obese rat. Sottomesso e approvato per il "69th Congress of the Italian Physiological Society (SIF)", Florence, Italy, 19-21 September 2018. Selected from the best works for oral presentation in the PITCH CONTEST section.
4. C. Rocca, L. Albano, **M.C. Granieri**, D. Amelio, I.C. Nettore, P.E. Macchia, S. Sinicropi, P. Ungaro and T. Angelone. Novel Anti-obesity Quercetin-derived Q2 prevents metabolic disorders in rats fed with high-fat diet. Sottomesso e approvato per il "21th Congress of the Italian Society of Cardiovascular Research (SIRC)", Imola 16-18 November 2017. Award TRAVEL GRANT
5. C. Rocca, F. Scavello, **M.C. Granieri**, T. Pasqua, S. Imbrogno, A. Gattuso, R. Mazza, M.C. Cerra & T. Angelone. Novel physiological role of the hypothalamic peptide Phoenixin-14: cardiac modulation and cardioprotection in normal and obese rats. Sottomesso e approvato per il "68th Congress of the Italian Physiological Society (SIF)", Pavia, Italy, 6-8 September 2017.
6. C. Rocca, L. Albano, **M.C. Granieri**, D. Amelio, I.C. Nettore, P.E. Macchia, S. Sinicropi, P. Ungaro and T. Angelone. Novel Anti-obesity Quercetin-derived Q2 prevents metabolic disorders in rats fed with high fat diet. Sottomesso e approvato per il "68th Congress of the Italian Physiological Society (SIF)", Pavia, Italy, 6-8 September 2017.

Congress Organization:

1. **Member of the Organizing Committee of the XX Congress of the ITALIAN ASSOCIATION OF DEVELOPMENTAL AND COMPARATIVE IMMUNOBIOLOGY**, Cosenza, 13th -15th February 2019. Organizing Committee: Anita Giglio, Pietro Brandmayr, Federica Talarico, Antonio Mazzei, Stefania Marsico, Attilio Naccarato, Francesco Cavaliere, Maria Luigia Vommaro, **Maria Concetta Granieri**.

November 25th, 2019

University of Calabria

Rende (CS), 87036

Italy

PhD student:

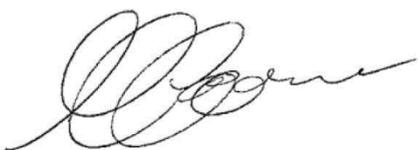


Tutor: Prof. Tommaso Angelone

Co-Tutor: Dr.ssa Teresa Pasqua



Director of Doctorate in Scienze della Vita: Prof.ssa Maria Carmela Cerra



Premessa e scopo

L'uso terapeutico delle antracicline, una classe di farmaci ampiamente utilizzati nella terapia antitumorale, è fortemente limitato dai loro effetti cardiotossici (Gianni et al., 2008; Yeh et al., 2009). L'utilizzo delle antracicline è, infatti, associato allo sviluppo di cardiomiopatia, disfunzione del ventricolo sinistro (LV) e scompenso cardiaco, dipendentemente dalla dose cumulativa ricevuta, dal tipo di programma di somministrazione e dall'uso concomitante di altre terapie che potrebbero, nell'insieme, risultare cardiotossiche (Yeh et al., 2009). La cardiotossicità si può presentare come insufficienza cardiaca congestizia, alterazione asintomatica della frazione di eiezione del LV, ipertensione, aritmia, alterazione del tracciato elettrocardiografico (complesso QRS, intervalli S-T) e ischemia miocardica (Yeh et al., 2009). La cardiotossicità da antracicline può essere acuta (ad es. durante la somministrazione del farmaco), subacuta o cronica (può manifestarsi anche anni dopo la fine del trattamento) (Yeh et al., 2009). Tra le antracicline, la più utilizzata in clinica è la doxorubicina (Doxo) ampiamente usata per il trattamento di vari tumori come il cancro al seno, alla vescica, alla prostata, il sarcoma di Kaposi, la leucemia linfocitica acuta, il linfoma, il melanoma ed altri (Minotti et al., 2004). La sua efficacia in clinica è dovuta al suo meccanismo d'azione; l'effetto antitumorale della Doxo è dato, principalmente, dall'inibizione della topoisomerasi che blocca, poi, la replicazione del DNA (Zhang et al., 2012). Uno degli effetti collaterali della cardiotossicità indotta da Doxo, acuta o cronica, è rappresentato dalla cardiomiopatia dilatativa (Legha et al., 1985; Wojnowski et al., 2005). Difatti, pazienti che ricevono terapia con Doxo hanno un aumentato rischio di presentare infarto del miocardio fino a 25 anni dopo il trattamento (Swerdlow et al., 2007). La cardiotossicità Doxo-dipendente coinvolge la produzione di radicali liberi con formazione di perossinitriti, sovraccarico di calcio, disfunzione mitocondriale, alterazione della segnalazione dei recettori beta-adrenergici e attivazione della metalloproteinasi (Minotti et al., 2004; Singal et al., 2005; Ichikawa et al., 2014). Nell'ultimo decennio, sono state proposte diverse terapie adiuvanti per ridurre gli effetti cardiotossici della Doxo. Tuttavia, nonostante i vari interventi terapeutici, il deterioramento delle funzioni cardiache rappresenta ancora una delle cause principali della mortalità secondaria al trattamento con antracicline (Singal et al., 2005). Il dexrazoxano è l'unico agente cardioprotettivo approvato dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti da poter utilizzare come adiuvante per contrastare la cardiotossicità indotta da Doxo (Zhang et al., 2016; Reichardt et al., 2018). Tuttavia, solo il 26% dei pazienti trattati con il dexrazoxano tollera le maggiori dosi cumulative di Doxo, in quanto, questo farmaco può essere associato alla terapia con Doxo solo se le dosi superano i 300 mg/m² (Swain et al., 2004). Pertanto, diversi studi mirano a chiarire il

meccanismo alla base della cardiotoxicità indotta dalla Doxo e nuove molecole farmacologiche cardioprotettive in via di sviluppo rimangono di grande interesse sperimentale e clinico.

Alla luce di tali dati, l'attenzione in questo lavoro si è voluta focalizzare sul possibile ruolo adiuvante e protettivo della Cromogranina A (CgA), una proteina di 439 amminoacidi situata nelle vescicole secretorie di molte cellule neuroendocrine, neuroni, granulociti e cardiomiociti (Helle et al., 2007). In seguito a stimolazione, la CgA è esocitoticamente rilasciata nel sangue per raggiungere, in soggetti sani, concentrazioni plasmatiche di 0,5-1 nM, e livelli più elevati nei pazienti con cancro, sepsi, disturbi infiammatori o malattie cardiovascolari come ipertensione, insufficienza cardiaca cronica e acuta, infarto del miocardio, scompenso e ipertrofia cardiaca e sindromi coronariche acute (Angelone et al., 2012; Corti et al., 2018; Tota et al., 2014; Ceconi et al., 2002; Goetze et al., 2014; Pieroni et al., 2007; Bartolomucci et al., 2011). I livelli di CgA endogena derivano principalmente dalla midollare del surrene e dal sistema neuroendocrino (Helle et al., 2007). Un'ulteriore fonte di CgA è rappresentata dal cuore. Nel cuore di ratto, la CgA è stata rilevata sia nei granuli endocrini e che nelle fibre di conduzione del Purkinje (Steiner et al., 1990; Weiergraber et al., 2000). Inoltre, Pieroni et al. (2007), mediante analisi di immunistochemica, hanno dimostrato come la CgA sia espressa anche nel miocardio umano di pazienti con cardiomiopatia dilatativa e ipertrofica. In questi pazienti, si è visto come la CgA co-localizzi con il peptide natriuretico di tipo B (BNP) nei cardiomiociti ventricolari, mentre i livelli plasmatici di CgA correlano fortemente con il BNP circolante o con il frammento precursore dell'endotelina-C-terminale (CT-proET-1), indicando che questa proteina rappresenta un importante marker per le patologie cardiovascolari (Goetze et al., 2014). La scissione proteolitica della CgA può portare alla produzione di vari peptidi bioattivi, tra cui CgA₁₋₇₆ [Vasostatina-1 (VS1)], CgA₃₅₂₋₃₇₂ [Catestatina (Cts)], e CgA₄₁₁₋₄₃₆ [Serpina (Serp)], tutti caratterizzati da attività cardiovascolare (Helle et al., 2007; Tota et al., 2014). Studi *ex vivo* hanno dimostrato che VS1 e Cts possono indurre effetti cardiodepressivi su cuori di ratto isolati e perfusi secondo metodica Langendorff attraverso l'attivazione del pathway intracellulare dell'ossido nitrico (NO) dipendente (anti- β -adrenergico-NO-cGMP) (Cerra et al., 2006; Angelone et al., 2008), mentre Serp si comporta come un agente adrenergico β_1 -agonista-simile attraverso l'attivazione di un pathway adenilato ciclastasi-cAMP-indipendente da NO (Tota et al., 2012). Inoltre, è stato visto come questi peptidi possano esercitare azione cardioprotettiva *ex vivo* dopo un evento ischemico su cuore isolato e perfuso alla Langendorff (protocolli di ischemia/riperfusion, I/R). Per quanto riguarda gli effetti della CgA *full-length*, su cuore isolato e perfuso, è stato visto che può ridurre la contrattilità e il rilassamento del miocardio e

indurre dilatazione coronarica attivando un pathway intracellulare endotelio/NO dipendente (Pasqua et al., 2013).

Partendo da questi dati di letteratura, e considerato l'importante ruolo cardioregolatorio della CgA e dei suoi frammenti, nel presente lavoro di tesi si è voluto valutare se questa proteina potesse contribuire alla prevenzione degli effetti cardiotossici acuti indotti dal trattamento con Doxo senza però prevenire gli effetti antitumorali di questo farmaco. A questo scopo, è stato studiato l'effetto sistemico della somministrazione della CgA *full length*, a concentrazioni fisiologiche, sull'infiammazione indotta da Doxo, sull'alterazione della struttura cardiaca e sulla suscettibilità al danno da I/R in un modello sperimentale di ratto; Inoltre, sono stati indagati i meccanismi cardioprotettivi intracellulari attivati dalla proteina e il suo effetto sull'attività antitumorale della Doxo in vari modelli murini portatori di tumori solidi.

Introduzione

1. Antracicline

Il cancro, ad oggi, colpisce una persona su tre nel mondo e, insieme alle malattie cardiovascolari, rappresenta una delle principali cause di morte nelle nazioni sviluppate. Le antracicline giocano un ruolo importante nell'era moderna nel trattamento contro il cancro. La scoperta fortuita della Doxo, un antibiotico appartenente alla classe delle antracicline, da *Streptomyces peucetius* e il suo precursore daunorubicina, ha rappresentato una pietra miliare nella produzione di antibiotici per la terapia contro il cancro (Rimal et al., 2015). Secondo la World Health Organization (WHO) le antracicline sono la classe di farmaci più efficaci per questo tipo di patologia (McGowan et al., 2017) Tuttavia il loro uso in clinica è fortemente ostacolato dai numerosi effetti collaterali, primo fra tutti la cardiotossicità (Mitry M.A. et al., 2016). Infatti, a cinquant'anni dalla sua scoperta, la Doxo e i meccanismi di cardiotossicità ad essa correlati continuano a suscitare notevole interesse per gli studi clinici e per la ricerca di base. La sopravvivenza dei pazienti sottoposti a terapia con antracicline negli ultimi 10 anni risulta essere maggiore o uguale all'80% dei casi di tumori tra cui carcinoma mammario, linfoma, melanoma e carcinoma uterino (Giordano et al., 2012; Nabhan et al., 2015; Chihara et al., 2016; Smith et al., 2010). Paradossalmente, questo miglioramento nella cura contro il cancro ha portato ad una maggiore consapevolezza degli effetti cardiaci avversi nel trattamento del cancro stesso (Armstrong et al., 2016; Patnaik et al., 2011). Le quattro antracicline più comuni sono la Doxo, la daunorubicina, l'epirubicina e la idarubicina (Fig. 1). Doxo e daunorubicina sono state le prime ad essere utilizzate nella pratica clinica. L'epirubicina, uno stereoisomero della Doxo, ha un'emivita più lunga rispetto alla Doxo, mentre l'idarubicina, derivato della daunorubicina, è più lipofila e ha un valore più elevato di assorbimento cellulare rispetto alla daunorubicina. Il meccanismo d'azione della cardiotossicità indotta dalla terapia con antracicline rimane poco chiaro, anche se è probabile che sia multifattoriale. L'ipotesi più attendibile riguarda la capacità di questi farmaci di interferire con meccanismi redox intracellulari causando danni al DNA dovuti alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Singal et al., 1998). Altro meccanismo plausibile riguarda l'interazione con la topoisomerasi di tipo 2 suggerita come mediatore principale della cardiotossicità.

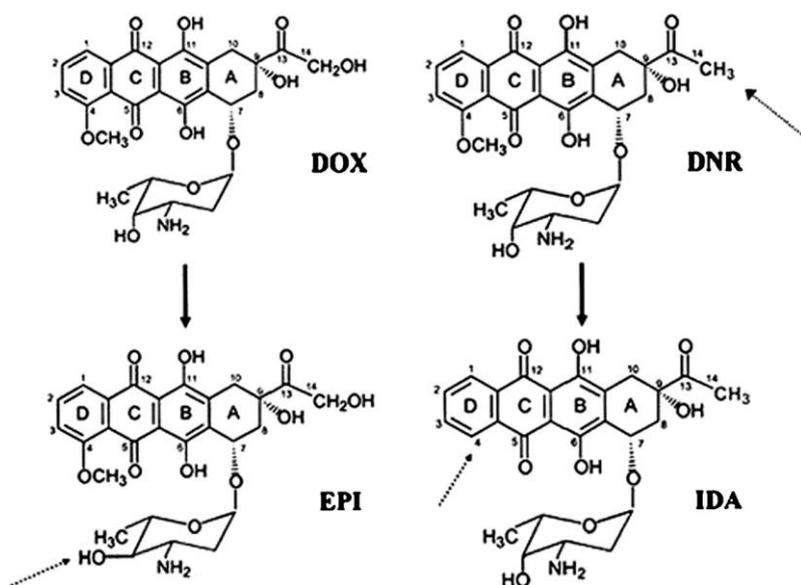


Fig. 1 Antracicline: Doxorubicina (DOX), Daunorubicina (DNR), Epirubicina (EPI) e Idarubicina (IDA). Le antracicline condividono una struttura tetraciclica agliconica di quattro cicloesani con una porzione glucidica da daunosammina a carbonio C7 dell'anello A; adiacente ai gruppi chinone-idrochinone negli anelli B e C; un sostituito metossi carbonio C4 nell'anello D; un gruppo carbonilico C13; e una catena laterale corta all'interno C9. La Doxo e la daunorubicina differiscono nelle loro catene corte. La Doxo ha un alcool primario, mentre la daunorubicina ha un gruppo metile. L'epirubicina deriva dall'epimerizzazione del gruppo idrossile da assiale a equatoriale della Doxo. L'idarubicina è identica alla daunorubicina con l'eccezione del 4-metossi nel gruppo dell'anello D che è stato rimosso (Mitry et al., 2016).

2. Doxorubicina

La Doxo, nota anche come Adriamycin® o Rubex®, è un metabolita secondario di *Streptomyces peucetius*, appartenente alla famiglia delle antracicline (Octavia et al., 2012), altamente efficace, usata per trattare diversi tipi di tumori, come tumori solidi, leucemie, linfomi e cancro al seno, e viene usata come agente terapeutico sia nei pazienti adulti che in quelli pediatrici (Octavia et al., 2012). L'uso in clinica viene limitato dalla tossicità del farmaco che presenta come reazioni avverse soppressione ematopoietica, nausea, vomito e alopecia, ma l'effetto collaterale più importante è la cardiotoxicità (Octavia et al., 2012). La cardiotoxicità può essere acuta o cronica e presentarsi fino a un massimo di 10-15 anni dopo l'interruzione della chemioterapia (Octavia et al., 2012). È caratterizzata da un ampio spettro di sintomi che vanno dall'elettrocardiografia sintomatica, (ECG)-modificato, pericardite e cardiomiopatia scompensata (Octavia et al., 2012). La probabilità di sviluppare cardiomiopatia risulta essere in gran parte dose-dipendente (Allen, 1992), mentre la cardiotoxicità può verificarsi a basse dosi a causa dell'aumento della suscettibilità individuale di ogni paziente alla terapia (Jain, 2000).

La differenza di genere è stata menzionata anche come uno dei fattori di rischio negli effetti tossici della Doxo. Lipshultz et al. (1995) hanno riportato infatti che nella donna la cardiotossicità risulta essere più grave ed è caratterizzata da una riduzione della contrattilità cardiaca (Lanzarini et al., 2000; Silber et al., 1993). Altro fattore di rischio è rappresentato dall'età; ad esempio, anziani di età superiore ai 65 anni o bambini di età inferiore ai 4 anni hanno un rischio maggiore per lo sviluppo della cardiotossicità indotta dalla Doxo (Biancaniello et al., 1980; Hershman et al., 2008; Godoy et al., 1997). Inoltre, la somministrazione di altri farmaci cardiotossici, radioterapia mediastinica, insieme alla dose cumulativa di Doxo, possono essere correlati a un aumento del rischio di cardiomiopatia indotta dalla terapia con Doxo (Jain, 2000). Inoltre, condizioni croniche come ipertensione, diabete mellito, malattie epatiche e patologie cardiache precedenti alla chemioterapia, possono contribuire ad un aumento del rischio di cardiotossicità (Godoy et al., 1997).

La Doxo è costituita da un nucleo tetracenico, composto da un chinone sull'anello C adiacente ad un idrochinone sull'anello B ed uno zucchero amminico, la daunosammina (Mitry et al., 2016). Questa molecola ha regioni sia idrofile che idrofobiche, che le consentono di legarsi alle proteine plasmatiche e alle membrane cellulari (Mitry et al., 2016). La Doxo è anche anfotera; può avere funzioni sia acide che basiche (Mitry et al., 2016). Sono queste le caratteristiche che rendono la Doxo un composto versatile, consentendole di entrare in vari compartimenti cellulari (Mitry et al., 2016). La Doxo può essere ridotta a livello intracellulare in doxorubicinolo e anche questo metabolita ha attività biologica (Octavia et al., 2012). La Doxo può anche essere ridotta a radicale semichinonico da molte delle ossidoreduttasi intracellulari (Mitry et al., 2016). La riossidazione di questo radicale comporta poi la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Mitry et al., 2016). La generazione di ROS è alla base del meccanismo antineoplastico e antibiotico (Mitry et al., 2016). L'escrezione avviene attraverso il fegato e i reni (Joerger et al., 2005; Ryu et al., 2014). Negli anni sono state sviluppate forme alternative di Doxo, comprese le forme incapsulate nei liposomi, nel tentativo di ridurre la cardiotossicità (Lipshultz et al., 1991).

2.1 Meccanismo d'azione

I meccanismi coinvolti nell'insorgenza della cardiotoxicità da Doxo sono multipli. La cardiomiopatia indotta dalla Doxo è fortemente legata ad un aumento dello stress ossidativo cardiaco, come evidenziato da un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), da un'umentata perossidazione lipidica, insieme ad una drastica riduzione dei livelli degli agenti antiossidanti (Vejpongsa et al., 2014). Anche il deterioramento miofibrillare e la disregolazione del calcio intracellulare sono importanti meccanismi comunemente associati alla tossicità cardiaca indotta dalla Doxo (Vejpongsa et al., 2014). La Doxo ha come bersaglio non solo i cardiomiociti, ma anche le cellule endoteliali mediante attivazione dei pathway apoptotici, come indicato dall'attivazione delle caspasi e dalla degradazione del DNA internucleosomiale (Vejpongsa et al., 2014). Inoltre, la tossicità cardiaca associata alla somministrazione di Doxo è mediata, almeno in parte, da cambiamenti nel pool energetico di ATP, dai livelli di endotelina-1 e dall'alterazione nella segnalazione adrenergica a livello del miocardio (Vejpongsa et al., 2014).

L'ipotesi maggiormente accertata riguardo la cardiomiopatia indotta dal trattamento con Doxo è la generazione di ROS mediante scambio di elettroni tra la porzione di chinone dell'antraciclina, molecole di ossigeno e altri donatori di elettroni cellulari (Doroshov, 1983). Le antracicline formano anche complessi con il ferro che subiscono il ciclo redox e generano radicali dell'ossigeno (Link et al., 1996). Sebbene gli studi *in vivo* e *in vitro* abbiano confermato un aumento della produzione di ROS nei cardiomiociti dopo terapia con antracicline, né gli antiossidanti né la chelazione di ferro hanno impedito l'insorgenza della cardiomiopatia (Dresdale et al., 1982; Hasinoff et al., 2003).

La topoisomerasi (Top) 2 β è stata recentemente rilevata come il mediatore chiave della cardiotoxicità indotta dalle antracicline (Zhang et al., 2012). Top2 interagisce con i filamenti di acido desossiribonucleico (DNA) durante la replicazione, la trascrizione o la ricombinazione del DNA (Liu et al., 1987). Nell'uomo esistono 2 tipi di enzimi Top2: Top2 α e Top2 β (Drake et al., 1987). L'enzima Top2 α , che si trova principalmente nelle cellule proliferanti, è necessario per la replicazione del DNA ed è considerato la base molecolare dell'attività tumoricida dell'antraciclina (Tewey et al., 1984). Al contrario, Top2 β è presente in tutte le cellule quiescenti, compresi i cardiomiociti (Capranico et al., 1992). L'inibizione di Top2 β da parte dell'antraciclina provoca rotture al doppio filamento del DNA, che possono portare alla morte di cardiomiociti (Zhang et al., 2012).

Altro meccanismo responsabile di cardiotoxicità Doxo-dipendente, prevede l'attivazione di p53 e della via apoptotica (Zhu et al., 2009). Top2 β è richiesto per l'attivazione di p53 in risposta al danno indotto al DNA dalle antracicline nei cardiomiociti (Zhang et al., 2012), mentre la produzione di ROS indotta dalle antracicline è dovuta a una riduzione della trascrizione del gene enzimatico antiossidante, anch'essa dipendente da Top2 β (Zhang et al., 2012). La Doxo riduce anche l'espressione delle proteine disaccoppianti 2 e 3, che regolano la produzione di ROS mitocondriali (Bugger et al., 2011). Inoltre, Top2 β e le antracicline riducono drasticamente la sintesi del co-attivatore del recettore- γ attivato dal proliferatore del perossisoma 1- α e del coattivatore del recettore- γ attivato dal proliferatore del perossisoma 1- β (PGC1 α e PGC1 β rispettivamente), che sono fondamentali per la biogenesi mitocondriale (Zhang et al., 2012). Questi risultati suggeriscono che Top2 β possa avviare la cardiotoxicità indotta dalle antracicline (Fig. 2).

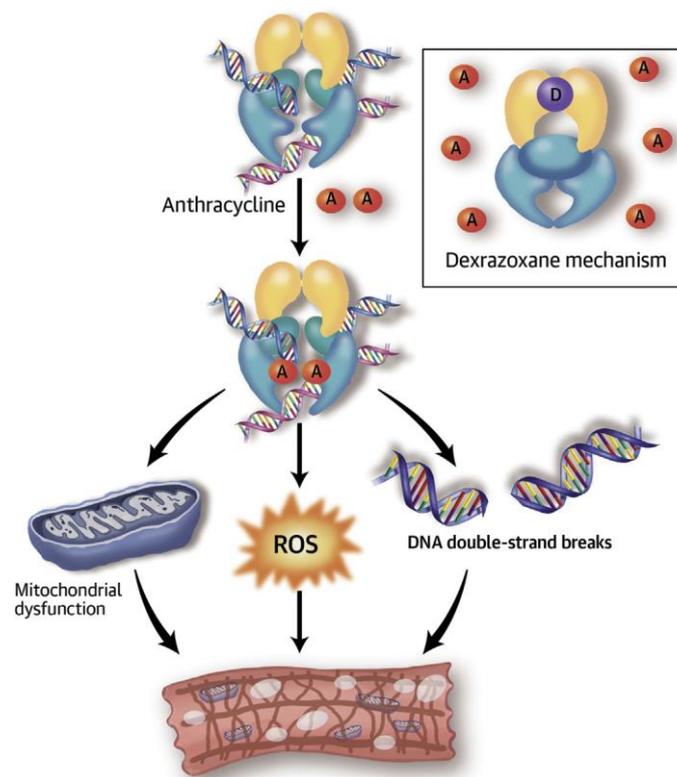


Fig. 2 Meccanismo di cardiotoxicità indotta da antraciclina: La Doxo interrompe il normale ciclo catalitico di Top2 β , causando rotture al doppio filamento di DNA. Cambia ulteriormente il trascrittoma, portando alla biogenesi mitocondriale difettosa e ad un aumento dei ROS. Di conseguenza, i cardiomiociti mostrano disordine e vacuolizzazione miofibrillare (Mitry et al., 2016).

Altri meccanismi correlati alla cardiotoxicità indotta dal trattamento con Doxo sono dati dalla perdita dell'omeostasi del calcio e dall'alterazione dell'espressione dell'endotelina 1 (ET-1) (Mitry et al., 2016). Difatti, è stato dimostrato che la Doxo interferisce con il calcio del reticolo sarcoplasmatico alterando la pompa per il calcio SERCA (Nicolay et al., 1986). Il trattamento con Doxo influenza anche la pompa Na^+/K^+ del sarcolemma, interrompendo il gradiente di sodio necessario affinché il calcio fluisca nel sarcolemma di un cardiomiocita (Mitry et al., 2016). La Doxo può anche interagire con il recettore della rianodina, consentendo un flusso incontrollato di calcio dal reticolo sarcoplasmatico (Mitry et al., 2016). Inoltre, è stato dimostrato che la Doxo riduce la capacità di immagazzinamento del calcio nei mitocondri attivando in modo specifico il canale CsA sensibile al calcio esacerbando il sovraccarico dello stesso (Zhou et al., 2001). L'alterazione di queste pompe e canali altera l'omeostasi del calcio, che porta anche a disfunzione mitocondriale e apoptosi (Mitry et al., 2016).

L'alterazione dell'espressione della ET-1 nei cardiomiociti osservata dopo il trattamento con Doxo fornisce un ulteriore meccanismo di cardiotoxicità. La ET-1 modula la via dell'inositolo 3 fosfato (IP3) nei cardiomiociti, causando un aumento del rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico e stimolando quindi la contrazione (Mitry et al., 2016). Dopo il trattamento con Doxo, i livelli di mRNA e i livelli plasmatici di ET-1 nei cardiomiociti dei topi risultano essere significativamente aumentati (Bien et al., 2010). Questo aumento di ET-1 causato dalla Doxo potenzia l'aumento del carico di calcio nei cardiomiociti, facilitando così l'apoptosi e la disfunzione cardiaca (Mitry et al., 2016). Sebbene la regolazione della ET-1 promuova normalmente la sopravvivenza cellulare nel cuore, le proprietà vasocostrittive di questa molecola nel sistema vascolare sono deleterie nei pazienti trattati con Doxo (Mitry et al., 2016).

Inoltre, numerosi studi ritengono che un aspetto importante della cardiotoxicità indotta dalla Doxo sia l'infiammazione cardiaca (Mitry et al., 2016). Gli effetti della Doxo sulle citochine proinfiammatorie, infiltrazione di cellule infiammatorie e necrosi si verificano quando è già in atto un danno funzionale, dato dalla dose cumulativa di Doxo ricevuta durante il trattamento (Mitry et al., 2016). La Doxo provoca una significativa produzione di citochine proinfiammatorie (come Tumor Necrosis Factor-alpha, $\text{TNF-}\alpha$, e Interleuchina-6, IL-6), up-regolazione dei livelli di NO sintasi inducibile (iNOS) nel tessuto cardiaco e una concomitante riduzione di IL-10, una nota citochina antiinfiammatoria (Mitry et al., 2016). L'innescare dei processi infiammatori a livello cardiaco e sistemico potrebbero rappresentare i primi eventi responsabili della successiva insorgenza del rimodellamento cardiaco che portano poi all'insorgenza di cardiomiopatia indotta da Doxo (Pecoraro et al., 2016).

2.2 Doxo e cardiotoxicità: fattori di rischio

Le complicanze cardiache indotte dal trattamento con Doxo sono state riportate per la prima volta nel 1979 (Tan et al., 1967), quando è stata tracciata la curva di tossicità dose-dipendente, generata rappresentando il grado di incidenza di insufficienza cardiaca (definita da segni clinici e sintomi come mancanza di respiro, distensione della vena del collo, cardiomegalia, epatomegalia, o versamento pericardico) in base alla dose di Doxo totale utilizzata in molti studi (Von Hoff et al., 1979). L'incidenza di insufficienza cardiaca era del 3%, 7% e 18% nei pazienti che avevano ricevuto una dose cumulativa di 400, 550 o 700 mg/m² di Doxo, rispettivamente (Lefrak et al., 1973). L'introduzione dell'imaging cardiaco, tecnologia che consente il rilevamento di insufficienza cardiaca o addirittura di disfunzione asintomatica del LV, ha permesso di indagare maggiormente questo aspetto e di notare che l'incidenza era superiore a quella precedentemente stimata (Vejpongsa et al., 2014). Nel 2003 è stata stimata l'incidenza di insufficienza cardiaca nel 5%, 16% e 26% dei pazienti per dosi cumulative di Doxo di 400, 500 e 550 mg/m², rispettivamente (Swain et al., 2003), con conseguente modifica nel limitare la dose cumulativa di Doxo da 400 a 450 mg/m² (Vejpongsa et al., 2014). Altri esami, quali la biopsia cardiaca, sono stati utilizzati per valutare la cardiopatia nei pazienti che hanno subito trattamento con Doxo, valutando i cambiamenti morfologici e classificando il danno in base al Sistema Billingham (Billingham et al., 1984). Questo sistema valuta la gravità della cardiotoxicità usando il grado di perdita o vacuolizzazione miofibrillare (Vejpongsa et al., 2014). Alcuni pazienti hanno mostrato cambiamenti morfologici con una dose cumulativa bassa come 200 mg/m² (Ewer et al., 1984; Cardinale et al., 2004). Tuttavia, la biopsia cardiaca non è regolarmente eseguita nella pratica clinica a causa della sua invasività (Ewer et al., 1984; Cardinale et al., 2004).

La cardiomiopatia indotta dal trattamento con Doxo è stata classificata come esordio precoce o tardivo utilizzando un cut-off di 1 anno dopo il trattamento (Yeh et al., 2009). L'incidenza cumulativa degli eventi cardiaci ha raggiunto il picco dopo 1 anno di trattamento (Perez et al., 2008; Tan-Chiu et al., 2005). L'incidenza effettiva di cardiotoxicità tardiva è difficile da accertare perché non c'è un buon numero di studi.

Per valutare l'insorgenza della cardiomiopatia acuta indotta dalla Doxo possono essere usati anche i biomarcatori, nello specifico quelli più comunemente usati in clinica per rilevare l'ischemia cardiaca (Mitry et al., 2016). Sebbene siano stati riportati livelli circolanti elevati di troponina T cardiaca (cTnT), gli aumenti non sono quantitativamente coerenti con il grado di

danno cardiaco indotto dalla Doxo (Panjrath et al., 2005; Sparano et al., 2002). Sono state dimostrate invece correlazioni più forti tra il BNP circolante e la disfunzione cardiaca indotta dalla Doxo, rispetto al peptide natriuretico atriale (ANP) (Sparano et al., 2002). Aumenti della cTnT indicano un danno cardiomiocitico più tardivo rispetto all'aumento dei peptidi natriuretici che riflettono una risposta precoce all'insufficienza cardiaca (Mitry et al., 2016). Recentemente sono stati introdotti nel monitoraggio e nella previsione dell'insufficienza cardiaca indotta dalla Doxo anche biomarcatori di tipo genomico (Mitry et al., 2016). Sono stati effettuati studi su animali nei quali sono stati esaminati i cambiamenti nell'espressione di specifici microRNA, tra cui miR-208 e miR-216B, indicatori di danno cardiaco, che sembravano essere sensibili al trattamento con Doxo (Nishimura et al., 2012; Vacchi-Suzzi et al., 2012). Tuttavia, i livelli circolanti elevati possono essere rilevati solo come un indicatore conseguente del danno miocitario (Nishimura et al., 2012; Vacchi-Suzzi et al., 2012)

La cardiotossicità acuta, che può manifestarsi durante o subito dopo il trattamento, presenta alterazioni anomale del battito cardiaco, che possono essere osservate con alterazioni non specifiche dell'onda ST-T negli elettrocardiogrammi (Shan et al., 1992; Steinberg et al., 1987; Villani et al., 1986). Alcuni studi riportano che episodi acuti di cardiotossicità si verificano nel 40% dei pazienti trattati con Doxo (Lebrecht et al., 2007). Il verificarsi di un episodio acuto non è predittivo di disfunzione cardiaca ad esordio tardivo (Panjrath et al., 2007).

Oltre agli effetti precoci, la cardiotossicità sub-acuta può presentarsi entro poche settimane o alcuni mesi dopo il trattamento. Questi effetti possono essere attribuiti ad alterate concentrazioni di Ca^{2+} o ad un aumento dello stress ossidativo (Davies et al., 1986; Doroshov et al., 1986; Mukhopadhyay et al., 2007; Octavia et al., 2012). Effetti a lungo termine sono stati riportati in studi su pazienti pediatrici da 4 a 20 anni dopo il trattamento con Doxo, con riduzioni significative nella frazione di eiezione (Floyd et al., 2005; Ganz et al., 2008; Ganz et al., 1996; Geenen et al., 2007; Jensen et al., 2006; Lipshultz et al., 1991; Lipshultz et al., 2002; Steinherz et al., 1995; Steinherz et al., 1991). Sembra esserci una relazione tra lo sviluppo ritardato dell'insufficienza cardiaca congestizia e la dose cumulativa di Doxo ricevuta. A una dose cumulativa di 500 mg/m^2 , c'è un rischio del 4% di insufficienza cardiaca congestizia (Machado et al., 2008). Tuttavia, vi è una rapida *escalation* del rischio di insufficienza cardiaca congestizia al 36% quando le dosi cumulative superano i 600 mg/m^2 (Machado et al., 2008).

Mentre la dose cumulativa è il principale fattore di rischio per lo sviluppo di cardiotossicità indotta dalla Doxo, altri fattori possono contribuire alla probabilità di sviluppare insufficienza cardiaca. La ricezione di altri farmaci chemioterapici cardiotossici, come trastuzumab o

ciclofosfamide, ma anche altre cure, ad esempio le radiazioni, aumentano significativamente la possibilità di sviluppare cardiotossicità (Mitry et al., 2016). Uno studio ha riportato che, pazienti che hanno ricevuto radiazioni mediastiniche, un trattamento usato per il linfoma di Hodgkin, presentavano una maggiore probabilità di sviluppare cardiotossicità se al loro trattamento primario veniva associata la somministrazione di Doxo (Mancuso et al., 2011). Inoltre, dati di letteratura riportano che oltre al genere (Chatterjee et al., 2005), anche l'età gioca un ruolo importante, infatti, più giovane è un paziente quando riceve un trattamento, maggiore è il rischio di sviluppare cardiotossicità ad esordio tardivo (Lipshultz et al., 2012). Circa il 65% dei bambini esposti alla Doxo manifesta qualche tipo di disfunzione cardiaca almeno un anno dopo il trattamento (Lipshultz et al., 2012).

2.3 Strategie di prevenzione

La Doxo è un efficace agente chemioterapico e trattamenti che proteggano i pazienti dalla cardiotossicità acuta e cronica, senza alterare il suo meccanismo d'azione, sono l'obiettivo ideale per la gestione dei pazienti oncologici. Diversi agenti cardioprotettivi sono stati esplorati nel trattamento e nella prevenzione della cardiomiopatia indotta dalla Doxo, compresi i farmaci che interferiscono direttamente con i meccanismi cellulari della Doxo o utilizzati nella gestione tradizionale dell'insufficienza cardiaca. Studi volti ad indagare strategie di prevenzione nel trattamento con antracicline, in particolare Doxo, includono antiossidanti come flavonoidi o Probucol (Mitry et al., 2016). Ad esempio, il flavonoide, monoidrossietilrutoside (monoHER), è attualmente studiato in clinica (Mitry et al., 2016). Studi preclinici, hanno mostrato come monoHER, somministrato in combinazione con la Doxo, su modelli animali con xenotrapianti di linee cellulari tumorali umane, aveva effetti a breve termine sulla cardiotossicità indotta dalla Doxo senza alterarne l'attività antitumorale (Bast et al., 2005). Nella fase clinica, fase 1, monoHER è stato somministrato fino ad una dose di 1500 mg/m², ma nella fase 2, in pazienti con carcinoma metastatico, monoHER non sembrava essere cardioprotettivo e gli autori dello studio hanno suggerito che la dose elevata scelta, probabilmente, potrebbe essere stata un errore che ha causato l'inefficacia del farmaco (Bruynzeel et al., 2014). Invece il Probucol, un potente antiossidante, precedentemente usato per trattare varie malattie cardiovascolari, viene utilizzato ancora nella fase preclinica, dove è stato visto offrire protezione contro la cardiotossicità indotta dalla Doxo (Kumar et al., 2001; Singal et al., 1995). Più recentemente, gli inibitori della

fosfodiesterasi-5, come il Sildenafil, hanno dimostrato effetti cardioprotettivi quando somministrati come profilassi (Das et al., 2015; Kukreja, 2013). Fisher et al. (2005) hanno invece dimostrato gli effetti del Sildenafil in combinazione con la Doxo. Lo studio è stato condotto su topi per due settimane, e sono stati monitorati la funzione cardiaca e i livelli di apoptosi nel corso delle dieci settimane successive al trattamento (Fisher et al., 2005). I risultati hanno mostrato come i topi trattati con la sola Doxo avevano un indice apoptotico significativamente aumentato rispetto a quelli trattati con Doxo in combinazione con Sildenafil. Un altro esempio di applicazione farmaceutica nel contrastare gli effetti della cardiotoxicità indotta dalla Doxo è il Rimonabant (Viner et al., 2010). L'antagonista del recettore dei cannabinoidi-1 è approvato in Europa come farmaco dimagrante per pazienti obesi ad alto rischio di sviluppare altre malattie come il diabete di tipo II e la dislipidemia (Viner et al., 2010). Il suo potenziale non è chiaro, poiché la stimolazione del recettore dei cannabinoidi-1 nel cuore è cardiodepressiva e non è noto se Rimonabant interagisca con la Doxo o abbia un'influenza positiva bloccando il recettore dei cannabinoidi-1 (Bonz et al., 2003). I risultati di uno studio preclinico hanno suggerito che Rimonabant può contrastare alcune vie cardiotoxiche della Doxo (Bonz et al., 2003). I topi trattati con la sola Doxo hanno mostrato una riduzione significativa della funzione cardiaca, dimostrata da una ridotta frazione di eiezione, gittata cardiaca e pressione sistolica ventricolare sinistra, rispetto ai topi di controllo che hanno ricevuto Rimonabant da solo (Bonz et al., 2003). Al contrario, gli animali che hanno ricevuto la Doxo in combinazione con Rimonabant hanno mostrato un recupero significativo dell'attività cardiaca rispetto a quelli trattati con la sola Doxo (Bonz et al., 2003). Tuttavia, le informazioni sul recupero dell'attività cardiaca risultano significativamente inferiori rispetto alle condizioni di controllo, suggerendo la necessità di ulteriori studi (Mukhopadhyay et al., 2007). Sebbene promettenti, ad oggi questi studi preclinici hanno esaminato solo risultati a breve termine.

Per quanto riguarda gli studi clinici, sono stati testati sia gli antagonisti β -adrenergici che gli inibitori degli enzimi di conversione dell'angiotensina (ACE), che sono i farmaci più utilizzati nella terapia standard per l'insufficienza cardiaca (Octavia et al., 2012). Studi in fase clinica hanno dimostrato che l'utilizzo di β -bloccanti e di ACE migliorava la contrattilità miocardica nella cardiotoxicità indotta dalla Doxo, ma l'esatto meccanismo non è ancora chiaro (Tallaj et al., 2005). Questi risultati indicano che alcuni aspetti della segnalazione dell'angiotensina potrebbero essere coinvolti nell'alleviare la cardiomiopatia indotta dalla Doxo (Octavia et al., 2012). Un'altra strategia terapeutica interessante è l'eritropoietina (EPO), comunemente usata per il trattamento dell'anemia in pazienti sottoposti a chemioterapia in grado di ripristinare la produzione del sangue (Octavia et al., 2012). L'EPO ha il potenziale per agire come agente

cardioprotettivo contro l'apoptosi indotta dalla Doxo e la cardiomiopatia, specialmente se somministrato in via profilattica (Ramond et al., 2008). Gli studi clinici con epoetina α in pazienti con linfoma di Hodgkin in stadio avanzato hanno mostrato un miglioramento dell'anemia senza influire sull'attività antitumorale della Doxo (Engert et al., 2010).

Il farmaco più efficace testato fino ad oggi per contrastare la cardiotossicità da Doxo è il dexrazoxano, difatti anche approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) come agente cardioprotettivo in tale trattamento (Hudson et al., 2013). È un agente cardioprotettivo adeguato da utilizzare contro le antracicline e viene utilizzato in una varietà di tumori sia pediatrici che negli adulti (Ivanova et al., 2012; Jaenke et al., 1974). L'efficacia del dexrazoxano è dovuta al suo meccanismo d'azione che, oltre a competere direttamente con la topoisomerasi 2, può ridurre lo stress ossidativo nei cardiomiociti causato dall'interazione della Doxo con il ferro e può anche stimolare la sintesi di enzimi mitocondriali antiossidanti (Mitry et al., 2016). Sulla base di queste proprietà, il dexrazoxano, noto anche come Zinecard (Pfizer Pharmaceuticals, New York, NY), è riconosciuto come agente cardioprotettivo quando somministrato in associazione alla Doxo ed è il protocollo più comunemente usato in clinica (Mitry et al., 2016). Il suo utilizzo però mostra degli effetti collaterali, infatti alcuni studi dimostrano che il dexrazoxano può ridurre l'azione antineoplastica della Doxo, quando somministrato in associazione con essa, e al contempo può portare all'insorgenza di neoplasie secondarie (Tebbi et al., 2007). Inoltre, la somministrazione di questo farmaco è approvata solo con dosi cumulative di Doxo elevata, quando supera i 300 mg/m^2 , come ad esempio nel trattamento del carcinoma mammario metastatico avanzato, e solo il 26% dei pazienti trattati con dexrazoxano tollera maggiori dosi cumulative di Doxo (Billingham et al., 1978; Swain et al., 1997a; Swain et al., 1997b).

3. Cromogranina A

La CgA è una proteina di 49 kDa co-immagazzinata con ammine, nucleotidi, calcio e altri ormoni peptidici nei granuli secretori di diverse cellule endocrine e neuronali e viene rilasciata nell'ambiente extracellulare mediante esocitosi (Winkler et al., 1992; Helle et al., 2007; Curnis et al., 2012). Appartiene alla famiglia delle granine, proteine acide e ubiquitarie nelle vescicole secretorie di cellule nervose, endocrine e del sistema immunitario (Banks et al., 1965). La CgA è stata la prima granina ad essere caratterizzata come proteina unicamente acida co-immagazzinata e co-rilasciata con le catecolamine dalla midollare del surrene bovina (Metz-Boutigue et al., 1993; Koshimizu et al., 2011). Forme praticamente identiche di CgA sono associate a diversi tessuti come la midollare del surrene (Steiner et al., 1990), la ghiandola paratiroidea (Pieroni et al., 2007) e il sistema gastrointestinale e pancreatico (Aardal et al., 1992; Cerra et al., 2006), con alcune differenze nella sequenza primaria e nelle modifiche post-traduzionali. Ad esempio, la proteina bovina (bCgA₁₋₄₃₁) è più corta di quella umana (hCgA₁₋₄₃₉) e di quella di ratto (rCgA₁₋₄₄₈) (Angelone et al., 2008). In particolare, i domini N- e C-terminale, CgA₁₋₇₆ e CgA₃₁₆₋₄₃₁ rispettivamente, essendo sequenze altamente conservate nei mammiferi (Steiner et al., 1990; Cerra et al., 2008; Ceconi et al., 2002), hanno suggerito come la CgA funga da pro-ormone per frammenti più piccoli con attività biologica (Ceconi et al., 2002; Taupenot et al., 2003). Numerose coppie di aminoacidi basici presenti nella sequenza intera della proteina indicano i potenziali siti di scissione da parte delle pro-ormone convertasi (PC1/3 e PC2), che si presentano co-immagazzinati come componenti dei granuli neurosecretori (Helle et al., 2007) per la produzione di questi peptidi. La CgA è la maggiore proteina solubile secreta dalle cellule cromaffini (Banks et al., 1965), con molteplici proprietà che vanno da azioni sia a livello tissutale che a livello sistemico. Partecipa a numerosi processi biologici, fisiologici e fisiopatologici sia in condizioni normali che patologiche, inclusa la biogenesi dei granuli secretori, l'immunità innata, le reazioni infiammatorie e il metabolismo del glucosio (Helle et al., 2007). Molte delle sue azioni derivano dalla sua funzione di pro-ormone con produzione dei diversi peptidi biologicamente attivi generati dagli eventi proteolitici (Metz-Boutigue et al., 1993). Questi includono VS1, Cts, pancreastatina, parastatina e Serp (Figura 3) (Koshimizu et al., 2011).

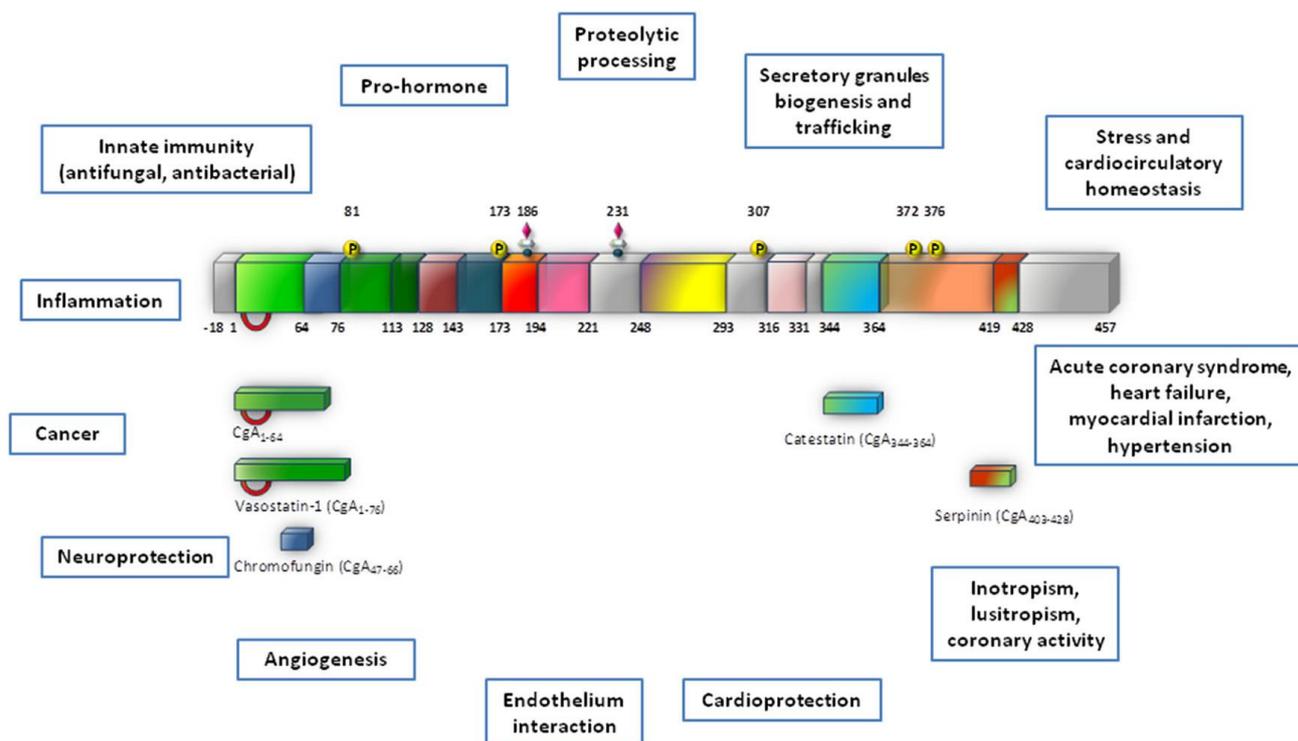


Fig. 3: illustrazione dell'attività biologica della CgA e dei suoi peptidi (Tota et al., 2014)

Poco dopo la sua scoperta, sono emerse osservazioni biomediche riguardo la concentrazione plasmatica della CgA, che normalmente è nell'intervallo di 0,5-4 nM (a seconda della tecnica di rilevazione) (Ceconi et al., 2002), e un aumento delle concentrazioni plasmatiche di questa proteina è indice di gravi patologie, come tumori neuroendocrini (Metz-Boutigue et al., 1994), renali (Koshimizu et al., 2011) o epatici (Steiner et al., 1990). Ad esempio, in presenza di tumori neuroendocrini i livelli plasmatici di CgA raggiungono valori di circa 200 volte più alti, e di conseguenza la CgA viene usata come marker diagnostico e prognostico di routine (Taupenot et al., 2003; Stridsberg et al., 2003). Un altro aspetto importante come marker diagnostico e prognostico è dato dall'analisi dei livelli di CgA nel monitoraggio di patologie cardiovascolari (Angelone et al., 2012). I livelli sierici di CgA sono correlati alla gravità della disfunzione cardiaca e sono un fattore predittivo per la mortalità nei pazienti con insufficienza cardiaca cronica e in pazienti con infarto del miocardio (Ceconi et al., 2002; Taupenot et al., 2003). Il primo indizio di un ruolo cardiovascolare per la CgA è stato fornito da studi clinici che hanno rilevato che i pazienti con ipertensione essenziale e renovascolare mostravano livelli alterati di CgA plasmatica (O'Connor et al., 1984; O'Connor et al., 1985). Rispetto ai controlli normotesi, le concentrazioni plasmatiche di CgA sono più elevate nei pazienti con ipertensione essenziale

o con ipertensione secondaria alla malattia parenchimale renale, e con feocromocitoma (Papewalis et al., 2011). Successivamente, uno studio clinico pilota di Ceconi e collaboratori (Ceconi et al., 2002) ha rilevato un aumento delle concentrazioni plasmatiche di CgA anche in pazienti con insufficienza cardiaca cronica (CHF), dove i livelli alterati della proteina possono essere un indice prognostico di mortalità. Il recente sviluppo di un modello animale privo della CgA (*CgA knockout mouse* (Papewalis et al., 2011) ha fornito un *input* significativo per chiarire l'influenza cardiovascolare della CgA. È stato riscontrato che i topi *knockout* per la CgA sono fenotipicamente simili a pazienti ipertesi, con ipertensione essenziale e frequenza cardiaca elevata (Papewalis et al., 2011). Questi modelli animali sviluppavano ipertrofia ventricolare sinistra, mostravano una risposta esagerata allo stress, esemplificata da incrementi della pressione arteriosa sistolica e della frequenza cardiaca (Papewalis et al., 2011; Gayen et al., 2009). È interessante notare che l'introduzione del gene per la CgA (CHGA umano), nonché la somministrazione del frammento C-terminale, Cts, derivato dalla CgA (352-372), impediva l'insorgenza dell'ipertensione, suggerendo una funzione antipertensiva in condizioni stressanti da parte della CgA e del suo derivato (Papewalis et al., 2011). A livello del sistema nervoso centrale la CgA può svolgere un ruolo autocrino come inibitore glucocorticoide-responsivo regolando la secrezione dei peptidi derivati dalla proopiomelanocortina nella ghiandola pituitaria (Wand et al., 1991). Inoltre, la CgA causa indirettamente apoptosi neuronale inducendo la produzione, da parte delle cellule della microglia, sia di agenti neurotossici termostabili che di TNF- α (Ciesielski-Treska et al., 2001). Studi recenti hanno evidenziato, inoltre, che livelli circolanti più bassi di CgA sono correlati alla diagnosi di pazienti con sclerosi laterale amiotrofica (circa nel 44% dei casi) rispetto ad individui sani (Schrott-Fischer et al.; 2009), mentre i dati sul coinvolgimento della CgA nelle malattie psichiatriche e su pazienti schizofrenici non sono univoci e hanno dato risultati contraddittori riguardo il suo coinvolgimento nell'insorgenza di queste malattie neurodegenerative (Lande'n et al., 1999; Takahashi et al., 2006).

3.1 Ruolo dei peptidi CgA derivati

La CgA può essere suddivisa in diversi frammenti bioattivi, che esercitano diverse azioni biologiche (Fig. 4) (Loh et al., 2012). Alcuni peptidi esercitano effetti simili, mentre altri suscitano risposte opposte. Per questo motivo, la produzione dei peptidi è fondamentale per la regolazione di diverse condizioni fisiologiche e patologiche e sono fondamentali per il contro-bilanciamento degli effetti esercitati e per il mantenimento dell'omeostasi.

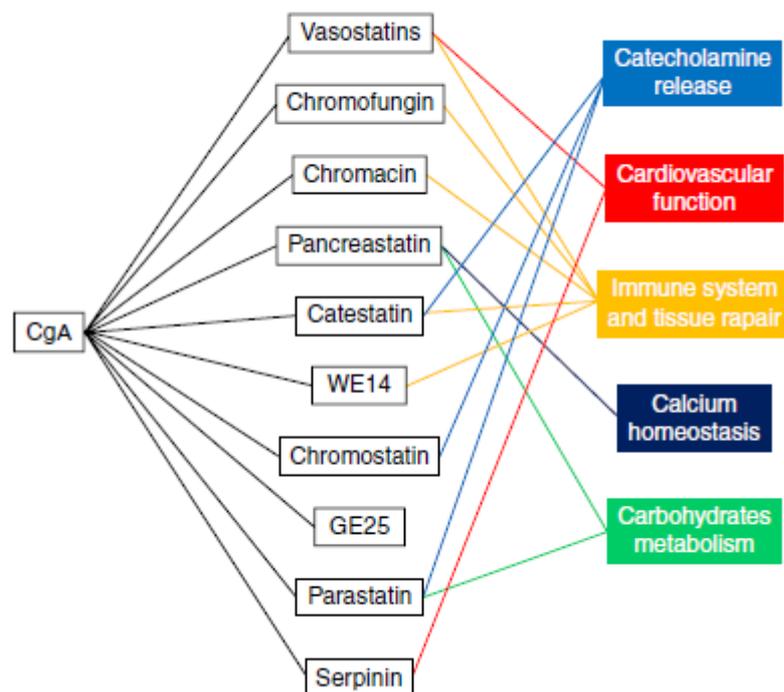


Fig. 4: Effetti fisiologici dei peptidi CgA derivati. Lo schema riassume le principali funzioni fisiologiche dei prodotti di scissione della CgA (D'Amico et al., 2014)

- **Pancreastatina (PST):** è stato il primo peptide derivato dalla CgA ad essere identificato (Eiden et al., 1987). La forma principale rilevata nel plasma umano è composta da 52 aminoacidi (hCgA₂₅₀₋₃₀₁), viene rilasciato insieme alle catecolamine dal sistema nervoso simpatico in situazioni di stress, e sembra essere coinvolto nel metabolismo energetico. Inoltre, influenza molteplici aspetti del metabolismo sia dei carboidrati che dei lipidi e riduce l'uptake del glucosio di circa il 50% (O'Connor et al., 2005). In una situazione di attivazione simpatica sbilanciata, un eccesso di catecolamine e un aumento dei livelli di pancreastatina potrebbero contribuire allo sviluppo dell'insulino-resistenza (O'Connor et al., 2005). Questa ipotesi è supportata dall'osservazione per cui i livelli di pancreastatina aumentano nell'ipertensione e nel diabete gestazionale o di tipo 2 (Sa´nchez-Margalet et al., 2010). Tuttavia, il ruolo esatto della pancreastatina nella patogenesi degli stati insulino-resistenti e del diabete rimane poco chiaro. La regione pancreastatinica derivante dalla CgA dà origine a tre varianti genetiche, una delle quali (Gly297Ser) aumenta sostanzialmente l'efficacia del peptide per inibire l'assorbimento del glucosio (Sa´nchez-Margalet et al., 2010). Queste osservazioni suggeriscono che alterazioni ereditarie nella struttura primaria della pancreastatina possono dare origine a differenze interindividuali del metabolismo glucidico e lipidico. Inoltre, la pancreastatina inibisce anche a livello pancreatico e gastrico la secrezione e il rilascio di paratormoni (Sa´nchez-Margalet et al., 2010).
- **VS1 e VS2:** VS1 (CgA₁₋₇₆) e VS2 (CgA₁₋₁₁₃) rappresentano i frammenti N-terminali derivanti dalla CgA ed esercitano un ampio spettro di azioni omeostatiche, tra cui vasodilatazione, effetti antifungini e antimicrobici, modulazione di adesione cellulare e inibizione della secrezione ormonale della paratiroide (Glattard et al., 2006; Helle et al., 2000). La VS1 e VS2 sono strutturalmente molto simili e inducono effetti comparabili attraverso meccanismi autocrini, paracrini ed endocrini (Glattard et al., 2006; Helle et al., 2000). I loro meccanismi d'azione sono solo parzialmente chiariti. La VS1 e VS2 sono state collegate alla vasculogenesi e al rimodellamento vascolare (Mazza et al., 2010). A differenza della Cts, la VS1 inibisce la proliferazione delle cellule endoteliali indotta dal *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), la migrazione e la formazione di strutture simili ai capillari (Belloni et al., 2007). Inoltre, la VS1 ha un effetto inotropo e lusitropo negativo sul cuore, in particolare, in presenza di intensi stimoli adrenergici (Imbrogno et al., 2007; Tota et al., 2008). Insieme, le proprietà cardiotropiche e vasoattive delle vasostatine suggeriscono che questi peptidi possono svolgere un ruolo

come stabilizzatori omeostatici del sistema cardiovascolare, in particolare in condizioni di sovrastimolazione simpatica, come quelle che si verificano in risposta allo stress (Helle et al., 2000; Tota et al., 2008). Studi recenti hanno inoltre dimostrato che la VS1 modula l'immunità innata, inibisce la crescita di lieviti, batteri e funghi penetrando attraverso le loro membrane (Helle et al., 2000; Tota et al., 2008). Questi effetti sono probabilmente dovuti ad una parte della sequenza del peptide che comprende quella della cromofungina, altro derivato della CgA, che svolge principalmente azioni antibatteriche (Helle et al., 2000; Tota et al., 2008).

- **Cts:** la Cts (hCgA₃₄₄₋₃₆₄) è un peptide CgA derivato composto da 21 aminoacidi che agisce sui recettori colinergici nicotinici come un potente inibitore autocrino della secrezione di catecolamine (Chen et al., 2010). Inoltre, i pazienti con ipertensione mostrano un aumento dei livelli plasmatici di CgA (Chen et al., 2010) e una riduzione della Cts (O'Connor et al., 2002). Queste osservazioni suggeriscono che una carenza della Cts potrebbe svolgere un ruolo importante nello sviluppo dell'ipertensione. Inoltre, sembra che una variante genetica della Cts, la Cst-Gly364Ser, possa offrire protezione contro lo sviluppo dell'ipertensione (Rao et al., 2007). La Cts può indurre risposte cardiovascolari sia a livello locale che sistemico (Friese et al., 2010). In particolare, induce effetti vasorilassanti e antiipertensivi (Angelone et al., 2008; Biswas et al., 2009). Anche la Cts, come la VS1, mostra attività angiogeniche e vasculogeniche, induce migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali e stimola la chemiotassi delle cellule muscolari lisce vascolari (Guo et al., 2011). Inoltre, recentemente, è stato evidenziato il coinvolgimento della Cts nell'infiammazione in termini di chemiotassi e di induzione di citochine pro-infiammatorie (Egger et al., 2011; Aung et al., 2011). Questi i risultati suggeriscono un ruolo nelle malattie neurodegenerative, in quanto la CgA intera rappresenta un importante costituente per lo sviluppo della malattia di Alzheimer (Rangon et al., 2007) così la Cts svolge un effetto chemiotattico sui monociti che invadono e circondano le placche amiloidi che favoriscono l'insorgenza della patologia (Lechner et al., 2004). Inoltre, la Cts inibisce la crescita di funghi, lieviti e batteri, sia Gram-positivi che Gram-negativi, probabilmente a causa della sua natura altamente cationica, una caratteristica dei composti con attività antibatterica (Aslam et al., 2013).

- **Parastatina:** la parastatina (CgA₃₄₇₋₄₁₉) è composta da un dominio altamente conservato derivante dalla CgA, individuato per la prima volta nella paratiroide suina (D'Amico et al., 2014). La parastatina modula il rilascio di paratormone da parte delle cellule paratiroidi suine attraverso un meccanismo autocrino (D'Amico et al., 2014).
- **Serp:** è un peptide derivato dall'estremità C-terminale della CgA. Per la Serp possiamo distinguere tre differenti peptidi: Serp (Ala26Leu, hCgA429-454), Pyroglutamina-Serp (pGlu23Leu, hCgA432-454), Serp-Arg-Arg-Gly (Ala29Gly, hCgA429-457) (Koshimizu et al., 2011). La forma più attiva è la pGlu-Serp, trovata nel cervello, principalmente in assoni e dendriti, con importanti effetti protettivi contro lo stress ossidativo su neuroni e sulle cellule ipofisarie (Koshimizu H. et al., 2011). Inoltre, è stato dimostrato che la Serp interviene nella biogenesi dei granuli secretori delle cellule endocrine regolando sia l'azione delle proteasi che agiscono sulla forma intera della CgA che la trascrizione della proteasi nexina-1 attraverso una via cAMP-PKA-sp1 (Loh et al., 2012). Più recentemente è stato visto che la pGlu-Serp agisce anche a livello cardiaco migliorando sia la contrattilità miocardica (inotropia) che il rilassamento (lusitropismo) (Loh et al., 2012). I peptidi serpininici svolgono numerosi effetti che influenzano il sistema endocrino, il sistema nervoso e la funzione cardiaca (Loh et al., 2012).

3.2 CgA come biomarker

I livelli plasmatici di CgA e dei peptidi da essa derivati sono comunemente utilizzati come marker diagnostici e prognostici o per monitorare la risposta all'intervento farmacoterapeutico in diverse malattie come tumori neuroendocrini, insufficienza cardiaca, ipertensione, e malattie neurodegenerative e neuropsichiatriche (es. depressione, schizofrenia e malattia bipolare) (Conlon, 2010; O'Toole et al., 2009; Bartolomucci et al., 2010) (Fig. 5).

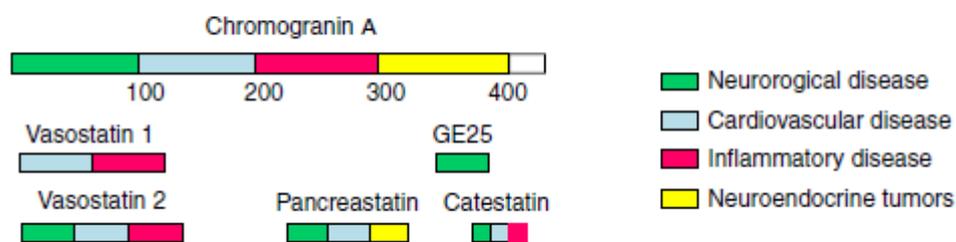


Fig. 5: CgA e suoi peptidi derivati come biomarker. Lo schema riassume l'uso di questi peptidi come biomarcatori nei tumori neuroendocrini neurologici, nelle malattie cardiovascolari e infiammatorie (D'Amico et al., 2014).

- **Tumori:** i tumori neuroendocrini (NET) rappresentano una famiglia eterogenea di tumori con diverse caratteristiche morfologiche e cliniche che originano da diversi tipi cellulari distribuite in tutto il corpo (Duque et al., 2013). Ad oggi, i livelli plasmatici di CgA rappresentano una proteina costitutivamente espressa in questo tipo di patologie, e sono il biomarcatore più utilizzato, essendo elevati nel 60–80% dei casi (Duque et al., 2013). La CgA raggiunge infatti, nel caso dei tumori, dei valori che sono fino a 1000 volte più elevati rispetto alle condizioni fisiologiche (Stridsberg, 2000). I livelli di CgA sono correlati con l'insorgenza e la progressione della malattia (Díaz Pérez et al., 2014) e, nei NET del pancreas, ad esempio, è stato visto come un calo precoce dei livelli di CgA, durante il trattamento con chemioterapici, sia associato ad una prognosi migliore e ad un recupero dalla patologia stessa (Massironi et al., 2010; Yao et al., 2010; Kouvaraki et al., 2004). Recentemente, inoltre, è stato supposto che i livelli di CgA siano molto importanti nei primi stadi di sviluppo di piccoli NET a livello intestinale

(Giovinazzo et al., 2013) e quindi molto importanti per la diagnosi e l'azione preventiva per lo sviluppo di tali patologie. Tuttavia, l'utilità della CgA per il monitoraggio e la risposta al trattamento rimane ancora uno studio prospettico (Belli et al., 2009).

- **Infiammazione:** la CgA sierica viene utilizzata anche come biomarcatore precoce per valutare la gravità dell'infiammazione sistemica (Zhang et al., 2009). Difatti, è stata vista una relazione tra i livelli di TNF- α e CgA nell'artrite reumatoide (Di Comite et al., 2004), utilizzati rispettivamente come marker diagnostico e prognostico di tale sindrome. Le situazioni di stress sono considerate un fattore significativo di predisposizione per le malattie immunitarie e i livelli di CgA sono stati correlati all'insorgenza e alla progressione di tali patologie (Zhang et al., 2009; Di Comite et al., 2004).

- **Malattie neurologiche:** la potenziale utilità della CgA come biomarcatore nei disturbi neurologici è stata stabilita solo di recente. In particolare, si è osservata una riduzione dei livelli di CgA nel liquido cerebrospinale di pazienti che manifestavano uno sviluppo canonico dell'Alzheimer rispetto a quelli ad esordio tardivo, che non mostravano una riduzione significativa di questa proteina (Kamboh et al., 2004). Inoltre, sono stati osservati anche livelli ridotti di VS1 in pazienti che soffrono di demenza frontotemporale rispetto ai soggetti di controllo sani (Simonsen et al., 2007). Questi dati suggeriscono la potenziale utilità dei frammenti CgA derivati e della CgA stessa nella diagnosi differenziale di malattie neurodegenerative. Recentemente, la CgA è stata individuata come un potenziale biomarcatore per la sclerosi multipla, in quanto nel liquido cerebrospinale di questi pazienti è stato evidenziato un aumento significativo del frammento CgA₁₉₄₋₂₁₃ (Stoop et al., 2008).

- **Altre condizioni patologiche:** gastrite atrofica e gastrite dovuta all'infezione da *Helicobacter pylori* possono determinare un aumento dei livelli sierici di CgA, come conseguenza dell'aumento cronico dei livelli di gastrina (Syversen et al., 2004; Peracchi et al., 2005). In questi pazienti, specialmente in quelli trattati con inibitori della pompa protonica, la misurazione dei livelli sierici di CgA potrebbe essere utile per monitorare l'iperplasia delle cellule enterocromaffini dello stomaco (Syversen et al., 2004; Peracchi et al., 2005). Quando si parla di disfunzione d'organo come insufficienza renale o epatica, i livelli sierici o plasmatici di CgA possono essere marcatamente aumentati

(O'Toole et al., 2003; O'Connor et al., 1989; Nobels et al., 1993). Inoltre, sono stati registrati anche aumenti nelle concentrazioni plasmatiche di CgA nella colite ulcerosa, nel morbo di Crohn, nell'iperparatiroidismo, nell'ipertiroidismo, durante la menopausa e la gravidanza (O'Toole et al., 2003; O'Connor et al., 1989; Nobels et al., 1993).

3.2.1 Ruolo cardiovascolare

L'insorgenza delle malattie cardiovascolari è caratterizzata da molteplici eventi fisiopatologici che alla fine portano a disfunzione cardiaca, fibrosi interstiziale, aritmie e morte (Angelone et al., 2008). Il processo patologico che si innesca è combinato con meccanismi di compensazione che operano sia a livello sistemico che locale (Angelone et al., 2008). I primi includono importanti modificazioni della funzione renale e dell'attività nervosa attraverso l'attivazione dell'asse neuroendocrino, che porta ad un rilascio di catecolamine, così come componenti del sistema renina-angiotensina (Baba et al., 2008). Poiché la CgA è molto più stabile delle catecolamine nel sistema circolatorio, i suoi livelli plasmatici riflettono meglio l'attività del sistema nervoso simpatico e del sistema surrenalico, risultando alterati nell'insufficienza cardiaca, nella sindrome coronarica acuta e nell'ipertensione (Angelone et al., 2012). I livelli plasmatici elevati di CgA sono strettamente associati con il rischio di mortalità dopo infarto del miocardio, sindrome coronarica acuta e scompenso cardiaco, mentre un aumento dei livelli di Cts determinano un recupero post-ischemico, dopo infarto del miocardio, con riduzione dell'area d'infarto e aumento della pressione ventricolare sinistra (Tota et al., 2008; Estensen et al., 2006; Jansson et al., 2009). La prima evidenza del ruolo cardiovascolare della CgA è stata fornita da studi clinici che hanno rilevato un aumento delle concentrazioni plasmatiche di CgA e delle catecolamine in pazienti con ipertensione essenziale e renovascolare (O'Connor, 1984; O'Connor, 1985). Rispetto ai valori di riferimento, le concentrazioni plasmatiche di CgA risultavano più elevate nei pazienti con ipertensione essenziale (198 ± 32 contro 129 ± 12 ng / ml) e con ipertensione secondaria alla malattia parenchimale renale (192 ± 36 ng / ml) (Papewalis et al., 2016). In condizioni normali, i livelli di espressione della proteina sono bassi e rilevabili solo con PCR ed ELISA, ma in presenza di cardiomiopatia dilatativa e ipertrofica, questa può essere anche identificata immunologicamente su sezioni di tessuto (Pieroni et al., 2007). Nell'uomo la CgA risulta essere coinvolta nella modulazione della funzione cardiaca, e

la produzione miocardica di CgA è supportata da analisi di immunoistochimica e RT-PCR che hanno mostrato nel tessuto cardiaco la presenza di mRNA di CgA. Nell'uomo la CgA localizza a livello dei miocardiociti ventricolari con il BNP (Pieroni et al., 2007) e questo suggerisce una correlazione con i peptidi natriuretici, che rappresentano il principale sistema ormonale del cuore (Pieroni et al., 2007). La CgA viene costantemente rilasciata dalle cellule del miocardio e considerando l'emivita plasmatica della proteina (circa 18,4 min) (Biswas et al., 2010) è ragionevole ipotizzare che il cuore contribuisca in modo significativo all'aumento dei suoi livelli circolanti nei pazienti con patologie cardiovascolari (Biswas et al., 2010). I risultati ottenuti da Pieroni et al., (2007) suggeriscono che la CgA potrebbe avere effetti negativi nell'insufficienza cardiaca e contribuire in modo autocrino/paracrino alla disfunzione sistolica e diastolica con un ruolo nel rimodellamento cardiaco. Ad esempio, nello studio di Ceconi et al., (2002) sono state analizzate le concentrazioni plasmatiche della CgA in 160 pazienti che presentavano insufficienza cardiaca, ed è stato visto che i livelli di CgA aumentavano parallelamente con la progressione della malattia valutata secondo le classi di gravità della New York Heart Association (NYHA) (Ceconi et al., 2002). In soggetti sani, le concentrazioni di CgA nel plasma risultavano nel range fisiologico, mentre la classe IV della NYHA (costituita da pazienti cardiopatici incapaci di svolgere qualunque attività fisica e che accusavano disturbi anche se a riposo) mostrava concentrazioni plasmatiche massime della proteina (545 ng/ml). Inoltre, un aumento delle concentrazioni plasmatiche di CgA rappresenta un forte fattore di predizione nell'ospedalizzazione e di morte nei pazienti con infarto del miocardio (Angelone et al., 2012). Il valore prognostico della CgA è indipendente da potenziali fattori di rischio come l'età del paziente, la funzione renale e il frammento N-terminale del pro-BNP (NT-pro-BNP), che sono i più importanti marker utilizzati per l'infarto miocardico (Estensen et al., 2006). In questi eventi, le concentrazioni di CgA sono predittive per la sopravvivenza, indipendentemente dalla frazione di eiezione ventricolare sinistra, di noradrenalina e di ANP (Estensen et al., 2006). Inoltre, nell'infarto miocardico, l'incremento dei livelli circolanti di CgA potrebbe essere probabilmente determinato da un aumento della produzione della proteina da parte del miocardio stesso, come avviene nel caso dell'insufficienza cardiaca (Pieroni et al., 2007). Nella sindrome coronarica acuta, aumenti dei livelli circolanti di CgA, almeno all'inizio della patologia, potrebbero essere compensativi, probabilmente per le caratteristiche "antinfiammatorie" della proteina (Ferrero et al., 2002). Tuttavia, il potenziale effetto della CgA sulla funzione cardiaca deve essere considerato in un contesto più ampio di attivazione neuro-umorale che si verifica nel caso di queste patologie, e in particolare in relazione al BNP, con proprietà vasodilatatorie e antifibrotiche, utilizzato come indice sia prognostico che diagnostico

di patologie cardiovascolari, co-immagazzinato e co-rilasciato con la CgA (Pieroni et al., 2007). Sulla base di queste osservazioni, come visto con altre molecole coinvolte nella risposta neuromorale compensativa, il rilascio della CgA potrebbe avere un beneficio iniziale e diventare deleterio con la progressione della malattia, probabilmente in modo dose-dipendente (Pieroni et al., 2007). Nel cuore di ratto, la CgA è presente all'interno dei granuli secretori delle cellule mioendocrine atriali (Steiner, et al., 1990), dove è co-immagazzinata con il peptide ANP, e nelle cellule del sistema di conduzione in cui localizza con la subunità $\alpha 1E$ del canale del calcio (Nastainczyk et al., 2000) ed è stato visto che l'espressione della CgA si associa ad un processamento intracardiaco (Glattard et al., 2006). L'analisi proteomica degli estratti cardiaci infatti ha rilevato la presenza di quattro peptidi N-terminali endogeni che contengono la sequenza della VS [CgA₄₋₁₁₃, CgA₁₋₁₂₄, CgA₁₋₁₃₅ e CgA₁₋₁₉₉] e una banda immunoreattiva maggiore di 80-50 kDa, corrispondente al peso molecolare della CgA *full-length* di ratto (con e senza modifiche post-traduzionali) (Glattard et al., 2006). I frammenti a basso peso molecolare identificati negli estratti cardiaci di ratto includono il motivo cardioattivo, ovvero la sequenza VS1 o parte di esso (Angelone et al., 2012). Più recentemente, Biswas et al. (2010) hanno rilevato anche la presenza della Cts nei cardiomiociti murini, suggerendo un processo di maturazione e frammentazione della proteina a livello cardiaco. Sulla base di questi dati, Pasqua et al (2013) hanno dimostrato che il cuore, in condizioni normali o sotto stress, in risposta a una specifica attivazione proteolitica indotta dallo stimolo chimico (ET-1 o Isoproterenolo) o fisico, può portare alla produzione dei frammenti a basso peso molecolare (Mazza et al., 2010). La presenza della CgA e dei suoi derivati nel tessuto cardiaco di mammifero può implicare, quindi, una funzione protettiva diretta sia della proteina che dei suoi derivati in modo autocrino/paracrino (Angelone et al., 2008; Cerra et al., 2008).

3.3 Effetti cardiaci

In linea con l'ipotesi di un coinvolgimento diretto a livello cardiaco della CgA e dei peptidi da essa derivati (principalmente VS1, Cts e SERP), sono stati condotti numerosi studi fisiofarmacologici atti a dimostrare gli effetti cardiaci di questa proteina e dei suoi derivati.

- **Effetti cardiaci della VS1:** è stato dimostrato su campioni di cuore intero *in vitro*, di pesce (anguilla), anfibio (rana) e ratto, che la porzione N-terminale ricombinante umana della CgA (hrCgA) VS1 (CgA₁₋₇₈), e VS2 (CgA₁₋₁₁₃), induce, a concentrazioni nell'intervallo del nanomolare, un'azione cardio-inibitoria dose-dipendente (effetto inotropo negativo), confermando il diretto coinvolgimento del peptide nella regolazione dell'attività contrattile del cuore (Tota et al., 2008). Nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff, Cerra et al. (2008) hanno dimostrato che concentrazioni nel range del nanomolare (da 33 a 165 nM) del frammento CgA₁₋₆₄ (rCgA₁₋₆₄), corrispondente alla VS1 nell'uomo, esercitano una modulazione negativa dose-dipendente sulla contrattilità e sul rilassamento miocardico con una riduzione della pressione coronarica. Tutti questi effetti richiedono l'attivazione del pathway intracellulare eNOS/NO/cGMP/PKG e differiscono da quelli osservati nel cuore di rana, in cui la cardioinibizione recluta una via indipendente dallo NO (Corti et al., 2004). Inoltre, sul cuore di ratto è stato visto che la rCgA₁₋₆₄ contrasta l'effetto inotropo positivo dipendente da stimolazione β -adrenergica (Isoproterenolo: Iso) e gli effetti indotti dal trattamento con ET-1 sulla pressione coronarica (vasocostrizione) (Cerra et al., 2008). Il confronto tra il frammento di ratto e quello umano (rCgA₁₋₆₄ e hCgA₁₋₇₈, rispettivamente) ha rilevato azioni inotrope negative e anti-adrenergiche simili [EC₅₀ di rCgA₁₋₆₄ (65 nM): $-7,8 \pm 1,15$; hCgA₁₋₇₈ (65 nM): $-7,8 \pm 0,78$] (Cerra et al., 2008). Coerentemente con questa azione anti-adrenergica, gli effetti provocati da rCgA₁₋₆₄ sulla performance cardiaca, senza stimolazione adrenergica, sono accompagnati da un aumento di guanilato ciclasasi monofosfato (cGMP) intracardiaca e da una diminuzione delle concentrazioni di Adenosina monofosfato ciclico (cAMP), che generalmente risultano aumentate dopo stimolazione con Iso. Inoltre, esperimenti su cellule ventricolari isolate hanno mostrato che il peptide non influenza le correnti transitorie di calcio (Cerra et al., 2008). Sulla base di queste osservazioni si può supporre che la VS1,

e in particolare l'omologo rCgA₁₋₆₄, può agire come un modulatore autocrino/paracrino sulla performance cardiaca e sulla pressione coronarica (Fig. 6).

- ***Effetti cardiaci della Cts***: simile alla VS1, la Cts influenza direttamente la performance cardiaca basale su cuori di ratto, rana e pesce. Questo peptide induce effetti cardio-soppressivi coinvolgendo il pathway NO-cGMP (Angelone et al., 2012). In particolare, nel cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff, gli effetti inotropi e lusitropi negativi indotti dalla Cts richiedono l'interazione con i recettori adrenergici β_2/β_3 (β_2/β_3 -AR), mostrando una maggiore affinità per β_2 -AR (Angelone et al., 2012). La somiglianza tra VS1 e Cts è determinata anche dal meccanismo d'azione intracellulare che viene attivato, infatti, nel cuore di ratto il pathway richiede il reclutamento β_2 -AR/G_i/eNOS/NO/cGMP, NO dipendente, con attivazione a valle di PI3K e conseguente inotropismo negativo (Angelone et al., 2008; Cappello et al., 2007). I peptidi cardio-soppressivi derivati dalla CgA, VS1 e Cts, controbilanciano gli effetti mediati dal segnale adrenergico e della ET-1 con aumento dell'inotropismo e attivazione dello NO endogeno come bloccante del segnale adrenergico (Angelone et al., 2012). Inoltre, è interessante notare che il pathway della Cts sembra coinvolgere sia eventi rapidi (fosfodiesterasi di tipo 2, fosfolambano) che a medio termine (desensitizzazione β_1 -AR mediata da β -arrestina) come regolatori della sua attività (Fig. 6) (Angelone et al., 2012). L'influenza negativa di contrattilità/rilassamento indotta dal peptide, così come la sua azione a livello coronarico, potrebbe essere associata a diversi stimoli che coinvolgono l'attivazione del sistema nervoso simpatico e determinano una maggiore attività a livello surrenalico, come ad esempio stress prolungato, scompenso cardiaco e ipertensione, ovvero condizioni caratterizzate da un aumento di catecolamine, ET-1 e agonisti del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (Angelone et al., 2012). Queste proprietà cardiache del peptide, insieme alla sua azione anti-ipertensiva e vasoattiva, suggeriscono che la Cts può funzionare come modulatore autocrino-paracrino che collabora con la CgA *full-length*, mentre la VS-I interviene nei processi di omeostasi cardiocircolatoria.

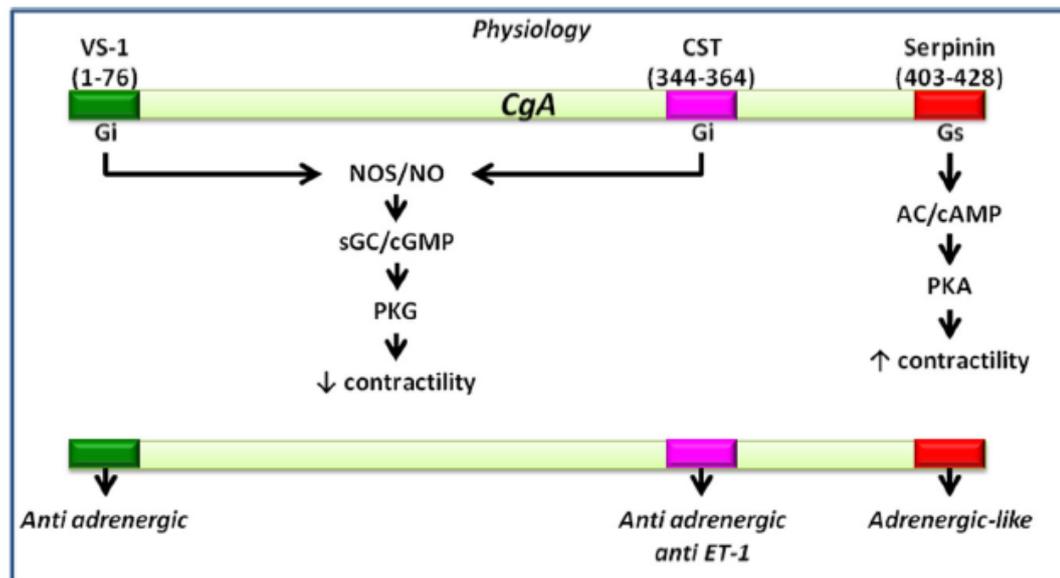


Fig. 6: effetto cardio-inibitorio della VS1 e Cts con coinvolgimento del pathway NOS / NO / cGMP / PKG. SERP induce inotropismo positivo attraverso l'attivazione del pathway AD / cAMP / PKA (Tota et al., 2014).

- **Effetti cardiaci della Serp:** Serp, che rappresenta il frammento C-terminale della CgA, e la forma modificata pyro-Glu-Serp, vengono prodotte entrambe dal cuore (Tota et al., 2012). Esperimenti su cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff hanno mostrato che contrariamente a VS1 e Cts, questo peptide potenzia la performance cardiaca determinando un effetto inotropo e lusitropo positivo dose-dipendente (Tota et al., 2012). Il pathway attivato richiede il coinvolgimento del recettore β 1-AR/adenilato ciclasi /cAMP/PKA (Tota et al., 2012). Di conseguenza, questo peptide, visti i risultati ottenuti, è stato proposto come β 1-adrenergico mimetico (Fig. 6).

Dai dati presenti in letteratura possiamo quindi affermare che i peptidi CgA-derivati possiedono un'azione cardioattiva e che la proteina come pro-ormone presenta due domini, uno N-terminale cardioinibitorio ed uno C-terminale cardiostimolatore (Fig.7).

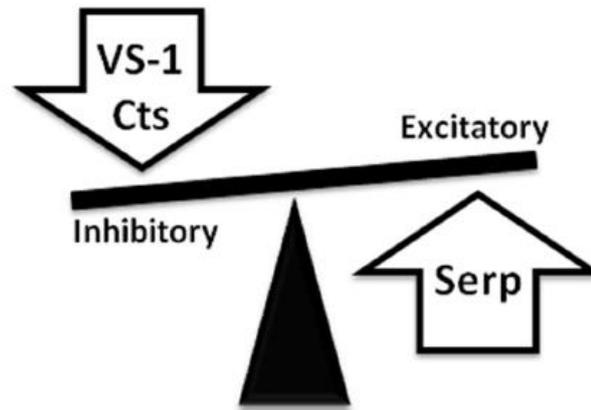


Fig. 7: porzione N-terminale e C-terminale della CgA ed i relativi effetti (Tota et al., 2014).

- **Effetti cardiaci della CgA full-length:** la CgA *full length*, così come i peptidi da essa derivati VS1 e Cts, su cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff, a concentrazioni molto basse (range nanomolari simili a quelli trovati nel plasma umano in condizioni normali), induce effetto inotropo e lusitropo negativo che scompare ad alte concentrazioni (10 e 16 nM), generando una curva a campana (Pasqua et al., 2013). Inoltre, la CgA alle dosi di 1 e 4 nM suscita una significativa dilatazione coronarica (Pasqua et al., 2013). Tuttavia, a differenza di VS1 e Cts, nel caso della CgA *full length*, gli effetti sono visibili in un range di concentrazioni fisiologiche, lasciando spazio ad una presunta influenza dei peptidi derivati a concentrazioni più elevate. Analogamente a VS1 e Cts, l'inotropismo negativo e il lusitropismo suscitati dalla CgA sono mediati dal pathway NO/cGMP/PKG (Angelone et al., 2008). Di conseguenza, nel cuore di mammiferi, VS, Cts e CgA reclutano percorsi parzialmente sovrapponibili per esercitare i loro effetti cardioinibitori. Sulla base dei dati presenti in letteratura, probabilmente la CgA *full length*, VS e Cts incontrano la barriera endoteliale con conseguente attivazione di una cascata locale (ad es. PI3K/Akt/NO) che è responsabile degli effetti finali sui miocardiociti (Pasqua et al., 2013). Nel caso della CgA *full length* questo meccanismo endoteliale può essere di particolare importanza, dal momento che le dimensioni della proteina potrebbero ostacolare il passaggio a livello del miocardio (Tab. 1).

Peptide	Tissue	Contractility/ Relaxation	Heart rate	Vasoactivity	Doses	Adrenergic Stimulation	References
CgA	<i>Ex vivo rat</i> heart	Reduction	No changes	Vasodilation	1 pM ÷ 4 nM	-	Pasqua et al., 2013
VS1	<i>Ex vivo rat</i> heart	Reduction	No changes	No changes	11 ÷ 165nM	Non-competitive Antagonism	Cerra et al., 2008
rCGA1-64	<i>Ex vivo rat</i> heart Rat Papillary muscles	Reduction	No changes	Vasodilation	33 ÷ 165 nM 10 ÷ 100 nM	Non-competitive Antagonism	Cerra et al., 2008
CST	<i>Ex vivo rat</i> heart	Reduction	No changes	Vasodilation	11 ÷ 200 nM	Non-competitive Antagonism	Angelone et al., 2008, 2012a
Serpinin	<i>Ex vivo rat</i> heart Rat Papillary muscles	Increase	No changes	No changes	11 ÷ 165 nM 1 ÷ 33 nM	Beta-adrenergic like inotropim	Tota et al., 2012

Tab. 1: sinossi degli effetti cardiaci della CgA e dei peptidi derivati (Tota et al., 2014).

3.4 Ruolo nella cardioprotezione

Il danno da riperfusione dopo un'ischemia miocardica è la principale causa di morte nei pazienti con malattie cardiovascolari (Heusch et al., 2019). Interventi come il pre- e il post-condizionamento ischemico proteggono dalle lesioni causate dalla riperfusione dopo un'ischemia (Xia et al., 2016). La riperfusione è un processo obbligatorio per salvare il miocardio dal danno ischemico dopo un infarto; tuttavia, la riperfusione contribuisce anche a danni (Heusch et al., 2004; Yellon et al., 2007; Ovize et al., 2010; Heusch et al., 2013). Nel mondo, la prevalenza di pazienti con malattie cardiovascolari è in continuo aumento e di conseguenza esiste una maggiore predisposizione ad eventi ischemici (Heusch et al., 2019). In questi pazienti con infarto del miocardio la sopravvivenza risulta aumentata grazie ad un tempestivo intervento di riperfusione (Heusch et al., 2019). Inoltre, si è osservato un progressivo miglioramento nel rimodellamento cardiaco e nella riduzione dell'area infartuata dopo l'evento ischemico, quindi la riperfusione risulta essere importante anche per minimizzare la dimensione dell'area d'infarto (Yellon et al., 2007; Murray et al., 2012; Vedanthan et al., 2014). Attualmente, per quanto riguarda i meccanismi di cardioprotezione, quelli più tempestivi risultano i protocolli di condizionamento (Heusch et al., 2019). Il protocollo di condizionamento fornisce cardioprotezione, praticando brevi episodi di occlusione/riperfusione coronarica prima (pre-condizionamento ischemico, Pre-C) o dopo (post-condizionamento ischemico, Post-C) l'ischemia miocardica seguita da una riperfusione, con conseguente riduzione dell'area d'infarto (Heusch et al., 2019). I meccanismi molecolari che si attivano durante questi processi di protezione sono molteplici ma i pathway più studiati sono il *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK) e il *Survival Activating Factor Enhancement* (SAFE) (Heusch et al., 2019) (Fig. 8). Il RISK pathway richiede l'attivazione di chinasi fosfoinositide-dipendente, fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) /proteina chinasi B (Akt / PKB) / la proteina chinasi C (PKC) e la glicogeno sintasi chinasi β (GSK 3 β), durante i processi di riperfusione sia in Pre-C che in Post-C con conseguente riduzione dell'area d'infarto (Schulman et al., 2002; Hausenloy et al., 2005; Hausenloy et al., 2004). L'importanza del RISK pathway è stata ulteriormente supportata da studi che dimostrano un ruolo cruciale di PI3K, Akt e ulteriori chinasi a valle, come p70S6 chinasi e GSK 3 β , sia su modelli murini che su cellule atriali umane (Sivaraman et al., 2007). GSK 3 β è stato proposto come punto di convergenza a valle del RISK pathway, in quanto la sua fosforilazione determina l'inibizione dell'apertura del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mPTP) e di conseguenza l'inibizione dei processi

apoptotici (Juhaszova et al., 2004; Marber et al., 1993). Anche il SAFE pathway si attiva sia in Pre-C che in Post-C con conseguente riduzione dell'area d'infarto (Juhaszova et al., 2004; Marber et al., 1993). In questo caso il mediatore è la proteina fattore di segnalazione e attivazione della trascrizione-3 (STAT-3) che induce protezione funzionale (Huffman et al., 2008). STAT-3 e il sottotipo 2 del recettore per il TNF α rappresentano la via di segnalazione principale per la cardioprotezione nel SAFE pathway (Tissier et al., 2005). L'attivazione di STAT-3 non ha solo un ruolo nella sovraregolazione trascrizionale a lungo termine di proteine cardioprotettive (Bolli et al., 2011), ma anche un effetto acuto a livello mitocondriale (Wegrzyn et al., 2009) in particolare durante il Post-C per attenuare l'apoptosi.

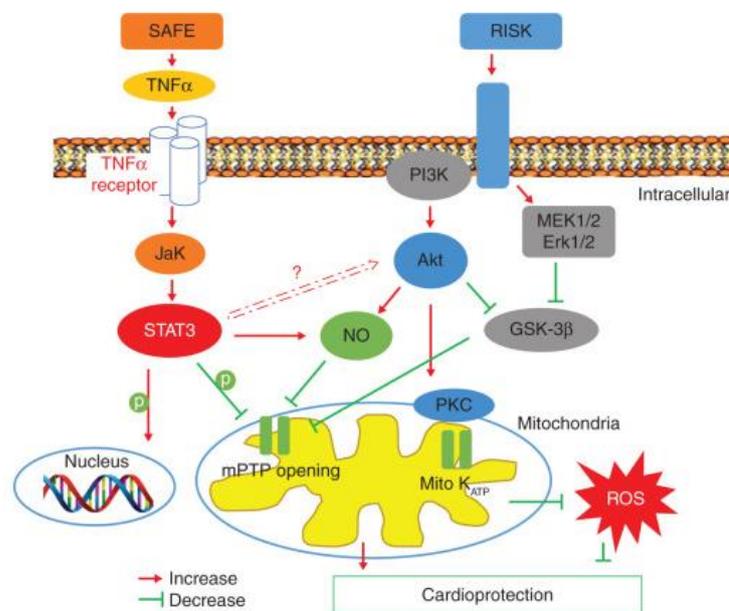


Fig.8: rappresentazione schematica dei pathway RISK e SAFE (Heusch et al., 2019).

Vari peptidi possono suscitare cardioprotezione, innescando pathway di segnalazione intracellulare sia come agenti farmacologici che in Pre- e Post-C (Heusch et al., 2019). A tal proposito è stato valutato ampiamente il ruolo cardioprotettivo dei peptidi CgA derivati su cuori isolati e perfusi secondo metodica Langendorff, sottoposti a protocolli di Ischemia/Riperfusione (I/R).

Il confronto degli effetti cardioprotettivi di VS1 e Cts nel condizionamento ischemico evidenzia una notevole somiglianza e sottili differenze. La VS1 sembra agire come induttore di Pre-C

mentre la Cts funge da agente Post-condizionante (Penna et al., 2012). È stato dimostrato infatti che la VS1 ricombinante umana protegge dall'infarto miocardico convergendo sulla PKC attraverso due percorsi diversi, uno mediato dai recettori dell'adenosina A1 e l'altro mediato dal rilascio di NO (Cappello et al., 2007). D'altra parte, la protezione indotta da Cts riduce le dimensioni dell'area d'infarto e migliora la funzione cardiaca post-ischemica tramite la via di segnalazione PI3K/Akt/PKC (Perrelli et al., 2013) in protocolli di Post-C su cuori isolati e perfusi secondo metodica Langendorff. La Cts è anche in grado di esercitare una protezione miocardica diretta attraverso un meccanismo indipendente dall'endotelio, come dimostrato da Penna et al. (2010) su cardiomiociti adulti isolati e sottoposti a protocolli di I/R (Perrelli et al., 2013). Inoltre, è stato dimostrato come la Cts protegga il cuore di Ratti Spontaneamente Ipertesi (SHR) in Post-C, aumentando l'espressione di fattori anti-apoptotici e pro-angiogenici, supportando il suo potenziale ruolo terapeutico, anche in presenza di comorbidità, come ipertensione e cardiomiopatia ipertrofica (Penna et al., 2014).

Per quanto riguarda la Serp, sembra indurre la fosforilazione di ERK1/2 e GSK3 β per mediare i processi di segnalazione intracellulare di cardioprotezione (Tota et al., 2012). Tota et al. (2012) hanno dimostrato che, somministrata in Pre- e Post-C, la pGlu-Serp riduce l'area d'infarto e preserva la funzione emodinamica sia su cuori normotesi che ipertesi, essendo più protettiva in questi ultimi.

Sulla base dei ben descritti effetti cardioregolatori e cardioprotettivi della CgA e dei suoi peptidi, si è voluto studiare il potenziale contributo di questa proteina alla prevenzione della cardiotossicità indotta dalla Doxo e la sua eventuale interferenza con l'azione antitumorale di tale farmaco.

Materiali e Metodi

1. Sostanze utilizzate

- Doxo MilliporeSigma (Burlington, MA, USA).
- rhCgA₁₋₄₃₉ *full length* (CgA) è stata preparata tramite l'espressione del cDNA umano di CgA in cellule di *E.Coli* e purificata come precedentemente descritto da Crippa et al. (27).
- VS1 (CgA₁₋₇₆) è stata prodotta tramite tecnologia del DNA ricombinante in cellule di *E. Coli*.
- Cts (CgA₃₅₂₋₃₇₂) e Serp (CgA₄₁₁₋₄₃₆) sono state prodotte tramite sintesi chimica in accordo con le procedure standard.

2. Esperimenti *in vivo* su ratto

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in accordo con la Dichiarazione di Helsinki, legge Italiana (DL.26/2014), la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [U.S. National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA] e la Direttiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo sulla protezione degli animali usati per motivi scientifici. Il progetto è stato approvato dal Ministero Italiano per la Salute e dallo Ethics Review Board (autorizzazione n° 315/2016-PR).

Sono stati utilizzati ratti maschi del ceppo Wistar (~300g di peso corporeo; Laboratori Harlan, Indianapolis, IN, USA), suddivisi in 4 gruppi sperimentali e trattati giornalmente per una settimana (intraperitonealmente i.p.) come segue:

- gruppo I (controllo): 3mg/kg/d di soluzione salina (n=16);
- gruppo II (Doxo): 3mg/kg/d di Doxo [dose cumulativa, 21mg/kg (n=16)];
- gruppo III (Doxo + CgA): 3mg/kg/d di Doxo e 10.71 µg/kg/d di CgA (n=16);
- gruppo IV (CgA): 10.71 µg/kg/d di CgA (n=16).

La dose cumulativa cardiotossica di Doxo corrisponde a quella usata nei pazienti oncologici ma farmacologicamente adattata ai ratti (Childs et al., 2002; Yen et al., 1996; Dirks-Naylor et al., 2013; Curnis et al., 2013). Questa dose di CgA (~0.2 nmol/kg/d) genera livelli plasmatici di CgA fisiologicamente rilevanti (Curnis et al., 2016). Gli animali sono stati sottoposti ad

eutanasia dopo 7 giorni [i.e. quando si sa che la Doxo induce cardiotoxicità acuta (Zhu et al., 2009)] per valutare:

- 1) i livelli plasmatici di citochine infiammatorie, lattato deidrogenasi (LDH), specie reattive dell'ossigeno (ROS), cTnT, proteine plasmatiche e CgA;
- 2) performance cardiaca tramite cuore isolato e perfuso secondo metodica Langendorff;
- 3) signaling intracellulare cardiaco.

Per ciascun gruppo sperimentale, 3 cuori sono stati utilizzati per analisi di Western Blotting, mentre 10 cuori per gruppo sono stati sottoposti a tecnica di perfusione cardiaca secondo metodica Langendorff e a protocolli di I/R. In aggiunta, 3 cuori dal gruppo di controllo sono stati perfusi tramite buffer Krebs/Henseleit (KH) per 190 minuti (Sham). Infine, 3 cuori per ogni gruppo sperimentali sottoposti alla metodica Langendorff sono stati utilizzati per immunoistochimica e studi di signaling intracellulare. Dopo l'eutanasia, i campioni di sangue sono stati raccolti tramite siringhe eparinizzate. Il plasma è stato poi separato tramite centrifugazione a 3000g (15min, 4°C) e conservato a -80°C prima delle analisi. I campioni di effluente coronarico durante la ri-perfusione sono stati prelevati tramite un catetere inserito nel ventricolo destro tramite l'arteria polmonare.

3. Esperimenti *Ex vivo* sul cuore di ratto

3.1 Perfusione cardiaca

Alla fine dei trattamenti precedentemente descritti, i ratti sono stati anestetizzati tramite carbammato di etile (2g/kg di peso corporeo, i.p.) e sottoposti ad eutanasia con espianco del cuore. Il metodo di Langendorff prevede l'incannulazione dell'aorta che viene in collegata ad un serbatoio contenente il fluido di perfusione ossigenato. La perfusione è condotta in senso retrogrado, a flusso costante di 12 ml/min per grammo di cuore fresco (Legssyer et al., 1997), normalmente ad una pressione di perfusione pari a 60-100 mmHg. Le valvole aortiche vengono chiuse forzatamente ed il fluido di perfusione attraverso le coronarie perfonde l'intera massa cardiaca, e drena immediatamente il seno coronarico nell'atrio destro (Sutherland et al., 2000). La perfusione a flusso costante rappresenta un elemento di stabilità al preparato.

La temperatura ideale di perfusione è intorno a 37-37,5°C che si ottiene tramite un sistema di termostatazione che controlla tutti i serbatoi contenenti il perfusato, la camera di perfusione e i

vari tubi che compongono l'apparato (Sutherland et al., 2000). Il sistema più efficace prevede l'utilizzo di un bagno termostato a circolazione esterna con un accurato disegno del circuito per evitare eventuali alterazioni di temperatura lungo l'apparato (Sutherland et al., 2000).

3.2 Apparato di perfusione

L'apparato impiegato nella metodica Langendorff è costituito da un serbatoio contenente la soluzione di perfusione Krebs-Henseleit (KHs), una pompa peristaltica, una trappola per bolle, un bagno termoregolatore ed un sistema di acquisizione dati interfaccia PowerLab (Fig. 9).

La pompa peristaltica ha il compito di prelevare la soluzione dal serbatoio e di spingerla, attraverso una serie di tubi, dapprima nella trappola per bolle al fine di evitare la formazione di emboli che potrebbero danneggiare il cuore e falsare il risultato degli esperimenti e successivamente al cuore attraverso una cannula inserita direttamente nell'aorta. La temperatura di perfusione (37-37,5°C) viene mantenuta dal sistema di termoregolazione che controlla tutti i serbatoi contenenti la soluzione fisiologica, la camera che contiene il cuore ed i vari tubi che compongono l'apparato così da evitare alterazioni della temperatura lungo l'intero apparato (Cerra et al., 2006). L'apparato presenta due trasduttori (model BLPR, cod. 187000) che registrano rispettivamente la pressione del ventricolo sinistro e la frequenza cardiaca il primo, e la pressione coronarica il secondo. Entrambi i trasduttori sono collegati al sistema di acquisizione dati PowerLab, che a sua volta è collegato ad un computer (Pentium III, Hewlett Packard Brio).

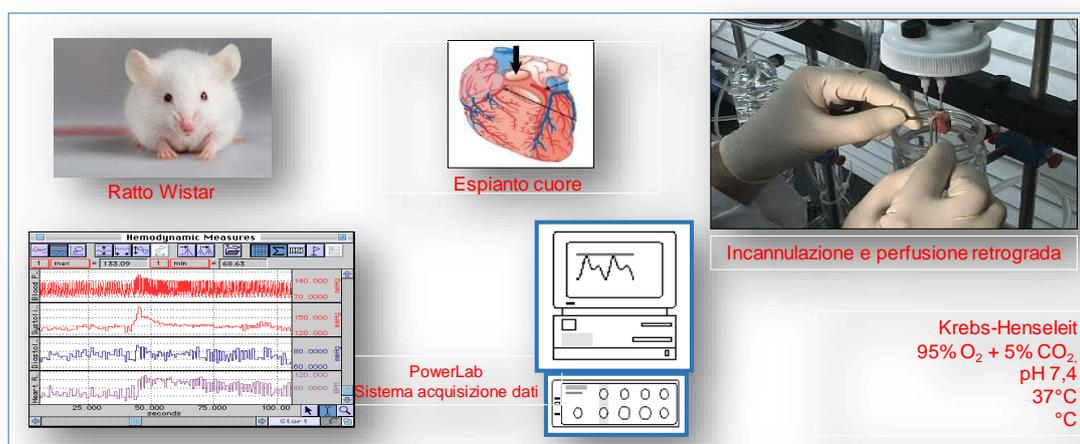


Fig. 9: Rappresentazione schematica dell'apparato di perfusione.

3.3 Composizione del Krebs Henseleit (KHs)

La maggioranza degli studi in letteratura prevedono l'uso come mezzo di perfusione del tampone bicarbonato secondo Krebs e Henseleit (KHs) (Sutherland et al., 2000) che ha la seguente composizione:

Sostanze	Concentrazione in nM
NaCl	113
KCl	4.7
MgSO ₄ *7H ₂ O	1.2
CaCl ₂ *2H ₂ O	1.8
NaHCO ₃	25
KH ₂ PO ₄	1.2
Sodio Piruvato	5
Glucosio	11
Mannitolo	1.1

Il KHs preparato quotidianamente, deve essere mantenuto ad un pH di 7.4 attraverso la continua ossigenazione con una miscela 95% e 5% CO₂.

Per evitare la precipitazione dei sali di calcio, che potrebbero occludere le arterie coronariche, è consigliabile aggiungere il componente calcio alla fine della preparazione della soluzione. Inoltre, il KHs dovrà essere opportunamente filtrato con membrane di nitrocellulosa (Millipore) da 0,8 µm al fine di rimuovere le impurità che possono essere presenti anche nei più puri prodotti chimici commerciali. Dal punto di vista metabolico, il cuore perfuso è in grado di utilizzare il glucosio come unico substrato energetico per sopperire alla mancanza degli acidi grassi che, sebbene *in vivo* siano la sorgente primaria d'energia, non possono essere utilizzati nel preparato perché risultano insolubili in soluzioni acquose e danno effetti schiumogeni se sottoposti all'azione di gas (Sutherland et al., 2000).

Le sostanze da testare possono essere aggiunte al KH alle concentrazioni desiderate, mentre nel caso di composti instabili questi possono essere infusi attraverso un braccio laterale della cannula aortica, regolandone opportunamente la concentrazione.

3.4 Sistema di acquisizione dei parametri cardiaci

L'acquisizione dei dati è stata effettuata attraverso un sistema McLab, collegato ad un computer che elabora i dati attraverso il software Chart 4.2. Tale sistema consente di registrare i dati sull'hard-disk e di visualizzarli graficamente in tempo reale sul monitor. L'interfaccia McLab utilizzata è un sistema a quattro vie, collegato a due trasduttori di pressione, ad una sonda di temperatura e ad un ossimetro. Il primo trasduttore, collegato al palloncino, permette di registrare la pressione del ventricolo sinistro, mentre il secondo misura la pressione coronarica; il terzo canale è connesso ad una termocoppia che consente di monitorare la temperatura durante tutto il corso dell'esperimento; il quarto canale potrebbe essere utilizzato per la misurazione del consumo d'ossigeno mediante un ossimetro i cui elettrodi vanno posizionati a livello della cannula aortica (via d'ingresso al cuore) e dell'arteria polmonare (via d'uscita del perfusato). I trasduttori di pressione vengono calibrati prima dell'inizio di ogni esperimento utilizzando un manometro a mercurio, che permette di impostare sul computer un range fisiologico di valori pressori in mmHg. Il sistema di acquisizione simula un registratore su carta che, secondo la velocità di scorrimento impostata, permette di visualizzare singoli momenti dell'esperimento o il percorso sperimentale per intero.

3.5 Parametri dell'attività cardiaca

Il sistema di acquisizione ed elaborazione è impostato in modo tale da calcolare in tempo reale i parametri emodinamici che vengono salvati su un foglio di supporto Data Pad. Alla fine della registrazione i dati immagazzinati sul Data Pad possono essere trasferiti su un file Microsoft Excel per l'elaborazione statistica.

I parametri emodinamici rilevanti nel corso di un esperimento sul cuore isolato e perfuso possono essere distinti in tre classi in relazione alla fase dell'attività cardiaca interessata (Fig. 10):

- Parametri relativi all'attività sistolica:
- **LVP** (*Left Ventricular Pressure*), espressa in mmHg, rappresenta un indice della pressione sviluppata dal ventricolo sinistro in condizioni di lavoro isovolumetrico;
- **(LVdP/dt)max**, espressa in mmHg per s^{-1} , indica la massima velocità di contrazione sistolica isovolumetrica;
- **TTP** (*Time To Peak*), espresso in msec, rappresenta il tempo necessario a raggiungere il picco di contrazione sistolica isovolumetrica;
- **HR** (*Heart Rate*), espressa in battiti/min, rappresenta la frequenza cardiaca;
- **RPP** (*Rate Pressure Product*), pari al prodotto tra LVP ed HR ed espresso in 10^{-4} mmHg/battiti/min, rappresenta un indice del lavoro cardiaco.

- Parametri relativi al recupero diastolico:
- **LVEDP** (*Left Ventricular End Diastolic Pressure*), espressa in mmHg per s^{-1} , è la pressione telediastolica sviluppata dal ventricolo sinistro;
- **(LVdP/dt)max**, espressa in mmHg per s^{-1} , indica la massima velocità di rilasciamento ventricolare;
- **HTR** (*Half Time Relaxation*), espresso in msec, indica la metà del tempo necessario al ventricolo sinistro per il completo recupero diastolico;
- **T/-t** è dato dal rapporto tra + (LVdP/dt) max e - (LVdP/dt) max.

- Parametri relativi alla funzionalità coronarica:
- **CP** (*Coronary Pressure*), espressa in mmHg, è la pressione di perfusione coronarica.

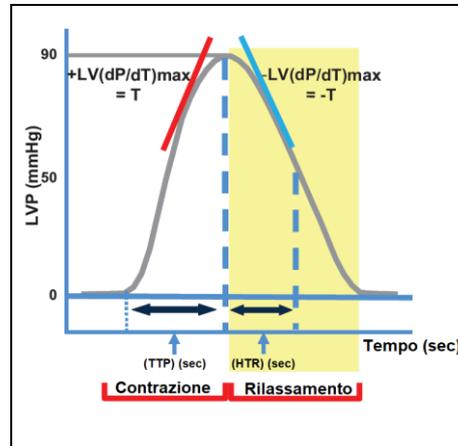


Fig. 10: Rappresentazione grafica dei parametri emodinamici valutabili mediante il sistema di acquisizione dati PowerLab nella metodica Langendorff.

3.6 Protocolli di Ischemia/Riperfusione

Dopo il trattamento, i cuori di ratto di ogni gruppo sperimentale sono stati rapidamente asportati e immediatamente messi in buffer di perfusione sotto ghiaccio, incannulati tramite l'aorta, e perfusi mediante l'ausilio dell'apparato Langendorff, sottoposti a 30 minuti di ischemia globale, seguiti da 120 minuti di riperfusione (I/R) usando un buffer KHs. Durante la perfusione un palloncino in lattice pieno di acqua è stato collegato ad un trasduttore di pressione (BLPR; WRI; Sarasota; FL, USA) inserito nel ventricolo sinistro tramite la valvola mitralica per registrare i parametri meccanici cardiaci. Un altro trasduttore è collocato sopra l'aorta per misurare la pressione coronarica (CP). La pressione ventricolare sinistra sviluppata (dLVP) e la pressione diastolica sinistra (LVEDP) sono state misurate per valutare l'inotropismo (Pasqua et al., 2013). La resistenza dei preparati è stata stabile per circa 190 minuti. La performance è stata registrata ogni 10 minuti usando il sistema di acquisizione dati PowerLab (AD Instruments, Sydney, NSW, Australia). I parametri cardiaci sono stati analizzati tramite la metodica Langendorff. La performance cardiaca prima e dopo l'ischemia è stata valutata tramite l'analisi del recupero

dLVP, un indice contrattilità cardiaca, e dall'LVEDP, un indice di contrattura, definita da un aumento nell'LVEDP sopra i 4mmHg rispetto i valori basali (Pasqua et al., 2015).



Fig. 11: Schema del protocollo di ischemia e riperfusione.

3.7 Area d'infarto

Per valutare l'area di infarto, i cuori sono stati rapidamente rimossi dall'apparato di perfusione alla fine dei protocolli di riperfusione. I ventricoli sinistri sono stati sezionati trasversalmente in fette da 2-3mm. Dopo 20 minuti di incubazione a 37°C in 0.1% di blu nitrotetrazolium in tampone fosfato (59.8 mM NaH₂PO₄, 484.9 mM Na₂HPO₄, pH 7.4), il colorante ha reagito con le Deidrogenasi ancora presenti nel tessuto non infartuato formando zone di colore rosso-blu, mentre le regioni infartuate del tessuto cardiaco sono rimaste bianche per la precedente rimozione delle Deidrogenasi durante la riperfusione (Vivaldi M.T. et al., 1985; Hausenloy D.J. et al., 2007). I tessuti necrotici non colorati sono stati separati attentamente da quelli vitali colorati e analizzati da un osservatore indipendente dall'esperimento. Sono stati determinati poi i pesi dei tessuti necrotici e non-necrotici. La massa necrotica è stata espressa in percentuale rispetto alla massa ventricolare sinistra, includendo il setto (Pasqua et al., 2015). Un diagramma che mostra il protocollo sperimentale per gli studi *in vivo* ed *ex vivo*, le dosi delle sostanze, e i tempi di somministrazione sono descritti dettagliatamente nella Fig. 12.

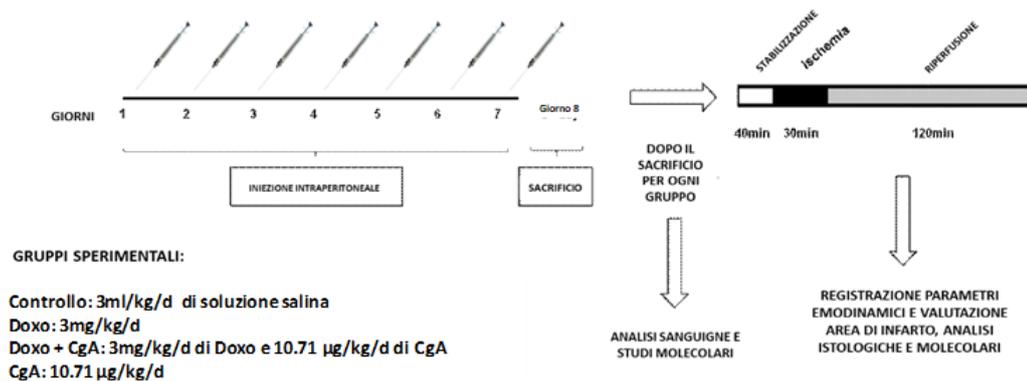


Fig. 12: Diagramma dei protocolli sperimentali e delle dosi.

4. ELISA

La deteazione di IL-1 β , TNF- α (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), ROS (Sunred Biological Technology, Shanghai, China), e cTnT (Elabscience Biotechnology, Houston, TX, USA) nei campioni di plasma di ratto è stata effettuata tramite ELISA utilizzando kit commerciali. La produzione cardiaca di ROS è stata valutata come segue: il ventricolo sinistro è stato omogenato utilizzando Ultra-Turrax® in una soluzione di tampone fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄; pH: 7,4) più una miscela di inibitori di proteasi (1 mmol / L aprotinina, 20 mmol / L fenilmetilsolfonil fluoruro e 200 mmol / L sodio ortoovanadato) e centrifugato a 15000 x g per 20 minuti (4° C). Il sovrantante è stato rimosso e utilizzato per la rilevazione dei ROS cardiaci tramite kit ELISA (Sunred Biological Technology, Shanghai, Cina). I livelli plasmatici di CgA sono stati rilevati utilizzando 2 kit ELISA sandwich basati sull'uso di mAb 5A8 (cross-reattivo con CgA di uomo, topo, e ratto) nello step di rilevamento e con antisiero di coniglio contro la CgA *full length* (assay-1) o la regione di CgA₄₁₀₋₄₃₉ (assay 2). I saggi sono stati effettuati come precedentemente descritto da Crippa et al. (27). Studi di validazione dei saggi mostrano che il saggio 2 può determinare la CgA mancante del frammento nella regione C-terminale, mentre il saggio 1 determina specificatamente la CgA intera. I risultati ottenuti nei 2 saggi sono un indice di frammentazione C-terminale a partire dalla CgA *full length*.

5. Determinazione del LDH

L'attività enzimatica della Lattato deidrogenasi (LDH) nel sangue e nell'efflusso coronarico dai cuori perfusi tramite metodica Langendorff è stata misurata spettrofotometricamente tramite il monitoraggio del consumo di NADH durante la riduzione del piruvato a lattato come descritto da Penna et al. (2006). I dati (unità per litro internazionale) sono stati espressi come valori cumulativi per l'intero periodo di riperfusione, la quantità di LDH rilasciata è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica a 340 nM, utilizzando una procedura classica.

6. Western Blotting

Dopo i trattamenti cronici e i successivi protocolli di I/R gli apici ventricolari (n = 3 per ciascun gruppo) sono stati omogenati in ghiaccio in presenza di un buffer di lisi, il RIPA buffer (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) contenente una miscela inibitori delle proteasi, (1 mmol/l aprotinina, 20 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride e 200 mmol/l sodiumorthovanadate) (Sigma-Aldrich). Gli omogenati sono stati poi centrifugati a 15000 x g per 20 minuti a 4°C per la rimozione dei detriti e successivamente è stato recuperato il sovratanante contenente la componente proteica. La concentrazione di proteine è stata determinata usando il metodo *Bradford* secondo le istruzioni del produttore (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Uguali quantità di proteine (30 µg) sono state caricate su gel di poliacrilammide, SDS-PAGE, all'8% [per inflammasoma (NLRP3), iNOS, cicloossigenasi-2 (Cox-2), xantina ossidasi (XO), e aldeide ossidasi-1 (AOX-1)], 10% [per il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), proteina chinasi fosforilata attivata da AMP (p-AMPK α), AMPK α , p-proteina chinasi B (p-Akt), Akt, p-Erk1/2, Erk1/2, p-glicogeno sintasi chinasi 3 α/β (pGSK-3 α/β), GSK-3 α/β , p-segnale di trasduzione e attivatore della trascrizione 3 (p-STAT3), e STAT3], e 12% [β -cell linfoma 2 (Bcl-2), proteina X associata a Bcl2 (Bax), e caspasi-3 attiva]. L'SDS-PAGE, è stato sottoposto ad elettroforesi e trasferito su membrane di polivinildenfluoruro (PVDF). Le membrane sono state fissate con una soluzione di latte in polvere al 5% (*milk non-fat*) disciolto in Tris-buffer contenente 0.1% Tween20 per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente le membrane sono state incubate overnight a 4°C con specifici anticorpi per gli antigeni sopra riportati diluiti 1:1000 in soluzione salina Tris-buffer contenente 0.1% Tween20 e latte in polvere 5% (*milk non-fat*). Gli anticorpi contro Akt, Erk1/2, AMPK α , GSK-3 α/β , gliceraldeide-3 fosfato deidrogenasi (GAPDH), o STAT3, sono stati usati come controlli di caricamento.

Anticorpi secondari anti-rabbit, anti-goat e anti-mouse legati a perossidasi (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) sono stati diluiti 1:2000 in soluzione salina Tris-buffer contenente 0.1% Tween20 e 5% latte in polvere (*milk non-fat*). L'immunorivelazione è stata effettuata utilizzando il kit ECL Plus. Le autoradiografie sono state ottenute tramite l'esposizione delle membrane a pellicole radiografiche (Hyperfilm ECL; GE Healthcare, Amersham, United Kingdom). I risultati dell'immunoblot sono state digitalizzati, le analisi densitometriche delle aree delle bande e l'intensità dei pixel sono state rappresentate in scala di grigi da 0 a 256 (0= bianco; 256= nero), ed è stato rimosso il background. Le analisi sono state condotte utilizzando ImageJ 1.6 (NIH). L'espressione di CgA è stata valutata tramite Western blotting usando un anticorpo monoclonale mAb (5A8) (Ratti et al., 2000) diretto contro la sequenza VS1 della CgA.

7. Analisi istologica e apoptosi

Le analisi immunoistochimiche dei cuori dopo I/R (n = 3 per ciascun gruppo) sono stati rimossi dalla cavità pericardica e lavati con PBS, pH 7,4. I cuori sono stati bloccati in diastole con un eccesso di KCl (0,5 g / L) e fissati con 2:2:1 v/v metanolo:acetone:acqua (fissativo MAW). I campioni sono stati disidratati con etanolo classificato, incorporato in paraplast (Sherwood, St. Louis, MO, USA) e sezionati in serie (spessore, 8 µm). Le sezioni sono state posizionate su vetrini Superfrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germania). Le sezioni di cuore, dopo deparaffinizzazione e reidratazione, sono state analizzate mediante immunoistochimica (kit di rilevamento HRP / DAB; Abcam, Cambridge, MA, USA). Le sezioni sono state pretrattate con H₂O₂, per rimuovere l'attività della perossidasi endogena, incubate per 1 ora con Protein Block e durante la notte con anticorpi policlonali di coniglio, p-Ab, con dominio di reclutamento per le caspasi (ARC) a 1:100 a 4 ° C. I vetrini sono stati lavati con PBS, quindi incubati successivamente con IgG goat anti-rabbit biotinilato (immunoglobulina G) e infine con complesso streptavidina-perossidasi. Il segnale è stato visualizzato usando 3,3'-diamminobenzidina (DAB) come cromogeno. Le sezioni sono state osservate utilizzando un microscopio AXIOSKOP ZEISS e le immagini sono state digitalizzate da AxioCam 105 color, ZEISS. La colorazione di Tunel (kit di rilevamento di morte cellulare in situ, POD di Roche Diagnostics-Germania), come precedentemente descritto (Amelio et al., 2013). In breve, le sezioni reidratate sono state incubate con proteinasi K (20 µg/mL; 37°C; 20 min), lavate e incubate con reagenti TUNEL (37 ° C, 60 min). La reazione è stata bloccata con BSA al 3% in

PBS a temperatura ambiente. L'anticorpo coniugato con perossidasi anti-fluoresceina (POD) è stato incubato a 37 ° C per 1 ora. La deossinucleotidil transferasi terminale (TdT) è stata omessa nei controlli negativi. In più, per rilevare i cardiomiociti, le sezioni sono state contro-colorate con anticorpo monoclonale anti-miosina (mAb). Lavate con PBS, e incubate con IgG anti-mouse (tetrametilrodamina coniugata). Le fibre di collagene sono state rilevate in sezioni in parallelo tramite la colorazione con rosso Picro-Sirius (38). Le sezioni sono state osservate utilizzando un microscopio Zeiss Axioskop, e le immagini sono state digitalizzate tramite AxioCam 105 Color (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

8. Studi *in vivo* in topi impiantati con tumori

Gli studi su modelli murini sono stati approvati dalla Commissione Etica dell'Istituto Scientifico San Raffaele ed effettuati seguendo le linee guida prescritte (autorizzazione n° 592-2019/PR). I topi femmina BALB/c e C57BL/6/N (6-7 settimane; Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) sono stati utilizzati per iniezioni subcutanee nel fianco sinistro di 2×10^5 cellule di B16-F1 melanoma (C57BL/6/N), cellule di linfoma RMA (C57BL/6/N), o 1.5×10^6 cellule di fibrosarcoma (BALB/c) o carcinoma polmonare di Lewis (LLC)(BALB/c). I topi sono stati trattati con o senza CgA in 0.9% di NaCl contenente 100 µg/ml di siero albumina umano senza endotossine con o senza Doxo. La crescita tumorale è stata monitorata giornalmente tramite la misurazione della grandezza del tumore con un calibro.

9. Statistica

Tutti i dati sono stati espressi come medie \pm errore standard (SEM). Il 1-way ANOVA e i nonparametric Newman-Keuls multiple comparison tests (post-ANOVA comparisons) sono stati usati per l'analisi di Western blot ed ELISA. Il Mann–Whitney U test è stato usato per l'attività antitumorale. Valori di $P \leq 0.05$ sono considerati statisticamente significativi. Il 2-way ANOVA e il nonparametric Bonferroni's multiple comparisons test (post-ANOVA comparisons) sono stati usati per l'analisi emodinamica dei time course. L'analisi statistica è stata eseguita con Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

Risultati

1. La CgA protegge contro la cardiotoxicità indotta da Doxo in un modello di ratto

1.1 La CgA esogena riduce l'infiammazione dipendente da Doxo

Per valutare l'effetto della CgA sull'infiammazione sistemica indotta da Doxo (Wang et al., 2016) e il danno cardiaco (Gianni et al., 2008; Aluise et al., 2009; Herman et al., 1999), sono stati analizzati i livelli di IL-1 β , TNF- α , specie reattive dell'ossigeno (ROS), cTnT, e LDH nei campioni di plasma di ratti appartenenti ad ogni gruppo sperimentale. I ratti trattati con Doxo mostrano un aumento dei livelli plasmatici di questi fattori infiammatori e marker di danno cardiaco rispetto al gruppo di ratti trattati con Doxo + CgA (Fig. 13 A-E), suggerendo che la CgA potrebbe ridurre l'infiammazione indotta dal trattamento con Doxo. Inoltre, nel gruppo di ratti trattati con Doxo si osserva anche una riduzione significativa nei livelli delle proteine plasmatiche totali rispetto al gruppo Doxo + CgA o solo CgA (Fig. 13 F).

1.2 La CgA esogena previene la fibrosi cardiaca dipendente da Doxo

Si è poi investigata l'espressione del CTGF, un marker pro-fibrotico, nel cuore degli stessi ratti tramite analisi di Western blotting. I cuori di ratto dal gruppo Doxo ma non quelli dal gruppo Doxo + CgA hanno mostrato aumentati livelli di espressione di CTGF rispetto al gruppo di controllo (Fig. 13 G). La colorazione Picro Sirius Red del collagene nella sezione di ventricolo sinistro ha mostrato un'aumentata deposizione di collagene nel gruppo Doxo (Fig. 13 H), mentre la colorazione risulta ridotta nel gruppo Doxo + CgA (Fig. 13 H), suggerendo che la CgA potrebbe prevenire la risposta fibrotica causata dalla Doxo nel cuore.

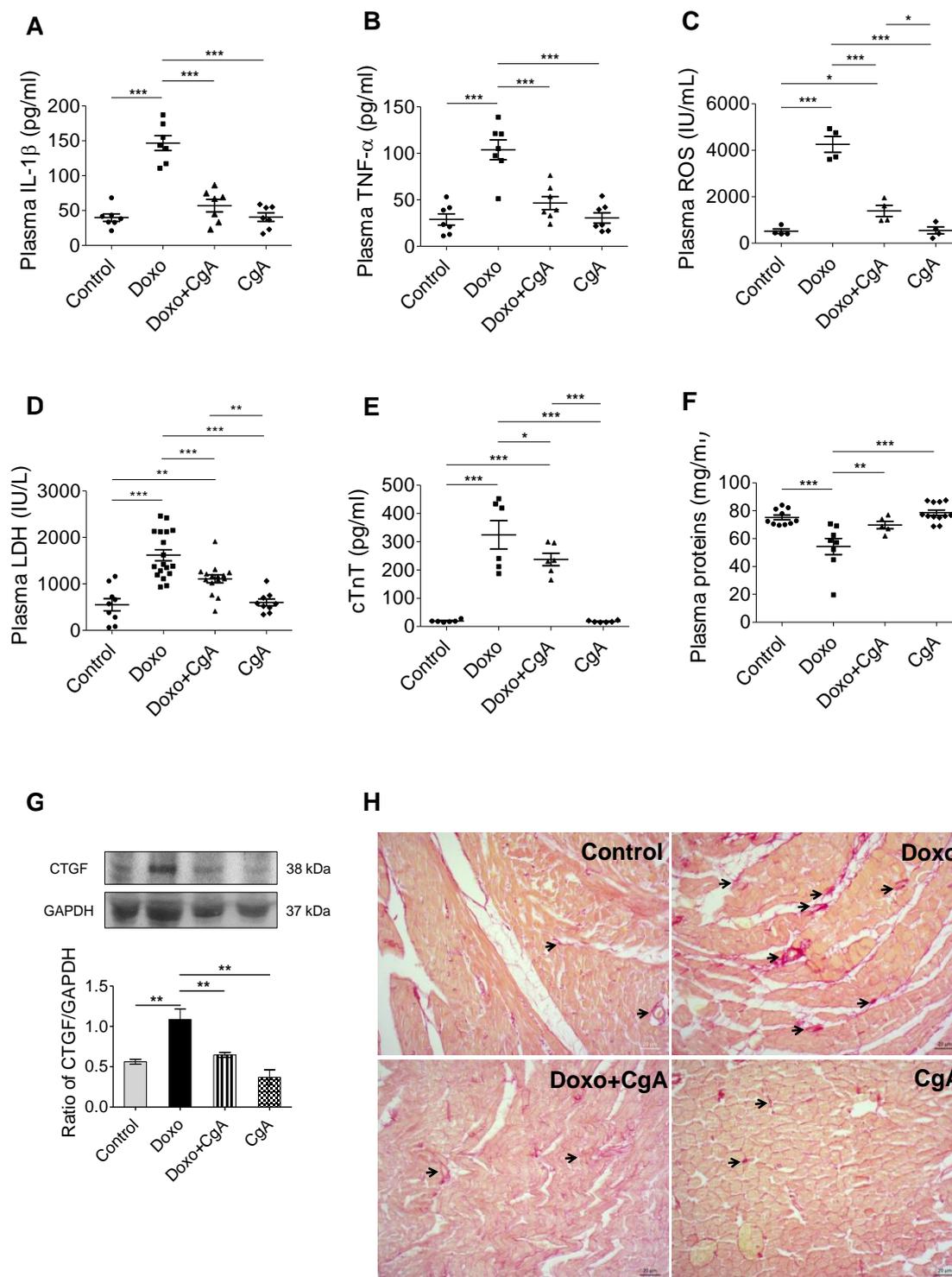


Fig. 13: Effetto della CgA sull'infiammazione sistemica e sulla fibrosi cardiaca indotta da Doxo. A – F) Livelli plasmatici di IL-1 β (n = 7 ratti / gruppo) (A), TNF- α (n = 7 ratti / gruppo) (B), ROS (n = 4 ratti / gruppo) (C), LDH (n = 3–6 ratti / gruppo) (D), cTnT (n = 6 ratti / gruppo) (E) e proteine plasmatiche totali (n = 5–12 ratti / gruppo) (F) nei gruppi di controllo, Doxo, Doxo + CgA e CgA. G) Western blot dei tessuti cardiaci NP (n = 3 cuori / gruppo) con pAb di capra contro CTGF e mAb di coniglio contro GAPDH. Gli istogrammi rappresentano il rapporto di analisi densitometrica delle proteine: loading control. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (one-way ANOVA e Newman-Keuls multiple comparison test). H) Colorazione Picro Sirius della deposizione di collagene (rosso). La fibrosi è indicata con frecce nere. Scale bars (20 μ m)

1.3 La CgA riduce il danno da I/R nel cuore di ratto

Gli effetti della Doxo e della CgA sul danno da I/R sono stati investigati utilizzando la metodica del cuore isolato e perfuso secondo Langendorff. I parametri cardiaci basali di tutti i gruppi, dopo 40 minuti di stabilizzazione, hanno mostrato che i cuori del gruppo Doxo hanno un aumento della CP e ridotta frequenza cardiaca rispetto ai controlli (Tabella 2). Per valutare l'effetto della Doxo e della CgA sulla funzione sistolica e diastolica nella fase post-ischemica, sono stati esaminati i valori di dLVP (i.e., l'attività inotropica) e di LVDEP (i.e.; lo stato di contrattura) prima e dopo l'evento ischemico. Nei gruppi di controllo e Doxo, la dLVP alla fine della riperfusione era significativamente più bassa rispetto a prima dell'ischemia (Fig. 14 A). Al contrario, nel gruppo Doxo + CgA e nel gruppo CgA, la dLVP è tornata al valore pre-ischemico nella fase di riperfusione. Inoltre, in entrambi i gruppi Doxo e di controllo, LVEDP è significativamente aumentata durante la riperfusione, mentre nei gruppi Doxo + CgA e CgA, è rimasta inalterata (Fig. 14 B). Questi risultati suggeriscono che la CgA possa indurre recupero sistolico dopo danno ischemico. Inoltre, sono stati investigati gli effetti della Doxo e della CgA sull'area di infarto (IS) a fine riperfusione (espressa come percentuale di massa dell'intero ventricolo sinistro LV). L' IS era simile nel gruppo di controllo e nel gruppo Doxo (73.6 ± 3 e $74.7 \pm 7\%$ di IS/LV, rispettivamente). In particolare, nei gruppi Doxo + CgA e CgA, l'IS era significativamente ridotta (45.6 ± 3 e $40.6 \pm 3\%$ di IS/LV, rispettivamente) (Fig. 14 C) Questi risultati indicano che la CgA potrebbe proteggere il cuore dal danno ischemico sia da sola che in combinazione con Doxo.

Group	dLVP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	HR (beats/min)	CP (mmHg)
Control	62 ± 6	7 ± 2	$244 \pm 32^*$	$71 \pm 7^\dagger$
Doxo	59 ± 10	7 ± 2	167 ± 17	113 ± 14
Doxo+CgA	66 ± 3	8 ± 3	214 ± 21	$85 \pm 4^\ddagger$
CgA	62 ± 8	8 ± 1	$253 \pm 8^*$	$61 \pm 2^\S$

Tabella 2. Parametri cardiaci dopo la stabilizzazione. **CP**, pressione coronarica; **HR**, frequenza cardiaca.

*P < 0.05, CgA vs. Doxo e Control vs. Doxo (1-way ANOVA e Newman-Keuls multiple comparison test)

†P < 0.01, Control vs. Doxo (1-way ANOVA e Newman-Keuls multiple comparison test).

‡P < 0.05, Doxo + CgA vs. Doxo (1-way ANOVA e Newman-Keuls multiple comparison test).

§P < 0.001, CgA vs. Doxo (1-way ANOVA e Newman-Keuls multiple comparison test).

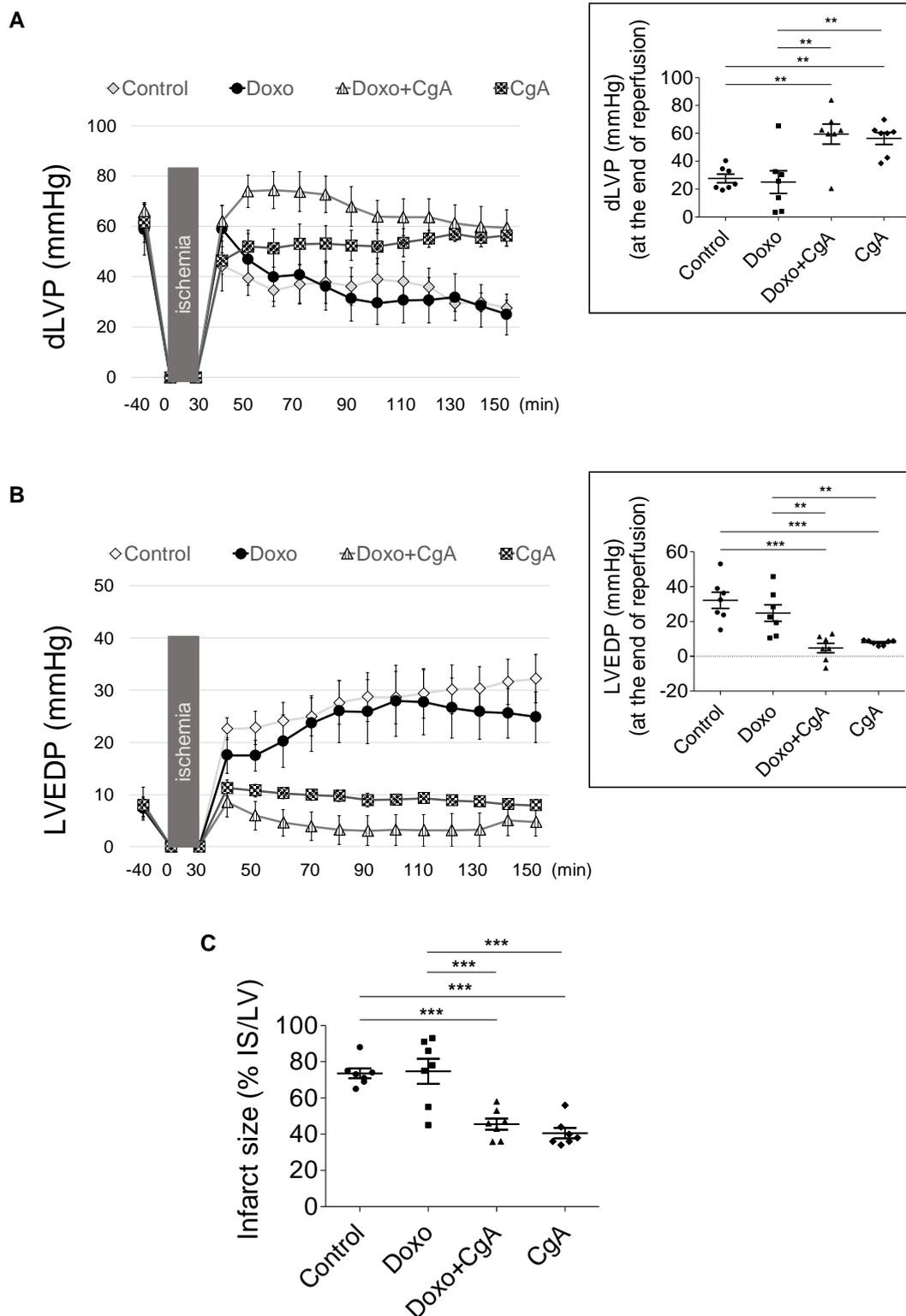


Fig. 14: Effetto di Doxo e CgA, da solo o in combinazione, sul danno da I/R. A, B) Variazioni dLVP (A) e LVEDP (B). In grigio le caselle indicano il periodo di ischemia (Bonferroni multiple comparison test). dLVP = 27,3% della variazione totale tra i gruppi ($P < 0.001$); LVEDP = 45,6% della variazione totale tra i gruppi ($P < 0.001$). Il grafico in alto a destra mostra i valori di dLVP e LVEDP a fine riperfusione. I dati sono espressi come le variazioni dei valori di dLVP e LVEDP (mmHg) dalla stabilizzazione fino alla fine dei 120 minuti di riperfusione rispetto ai valori basali dei gruppi controllo, Doxo, Doxo + CgA e CgA ($n = 7$ cuori / gruppo). ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (one-way ANOVA e Newman-Keuls comparative multiple test). C) IS ($n = 7$ cuori / gruppo). La quantità di tessuto necrotico misurata dopo un periodo di Ischemia globale di 30 minuti e 120 minuti di riperfusione è espresso come percentuale dell'intera massa di LV (% IS / LV). *** $P < 0,001$ (one-way ANOVA e Newman-Keuls comparative multiple test).

1.4 Effetto dei peptidi CgA derivati (Cts, VS1, Serp) sul danno da I/R

Sono stati valutati anche gli effetti della somministrazione di alcuni peptidi CgA derivati (nello specifico Cts, VS1 e Serp) in combinazione con Doxo sulla funzione sistolica nella fase post-ischemica e sull'IS. Nei gruppi di controllo e Doxo, il valore dLVP a fine ri-perfusione risultava più basso rispetto a prima dell'evento ischemico (Fig. 15 A). Al contrario, nei gruppi Doxo + Cts, Doxo + VS1 e Doxo + Serp, il valore di dLVP risultava più elevato, sebbene solo nel gruppo Doxo + Cts l'aumento era significativo rispetto al gruppo Doxo e controllo (Fig. 15 A). L'IS era simile nel gruppo di controllo ed in quello Doxo (Fig. 15 A). In particolare, nei gruppi l'IS risultava significativamente ridotta nei gruppi Doxo + Cts e Doxo + VS1 (50 ± 4 and $59 \pm 7\%$, rispettivamente), rispetto al gruppo Doxo ($78 \pm 3\%$) (Fig. 15 B.). Al contrario, il gruppo Doxo + Serp non ha subito una riduzione significativa dell'IS ($63 \pm 3\%$) (Fig. 15 B). Questi risultati suggeriscono che, rispetto agli altri peptidi, la Cts a 33 nmol/kg/d sia più efficiente nel proteggere il cuore dal danno ischemico indotto da Doxo.

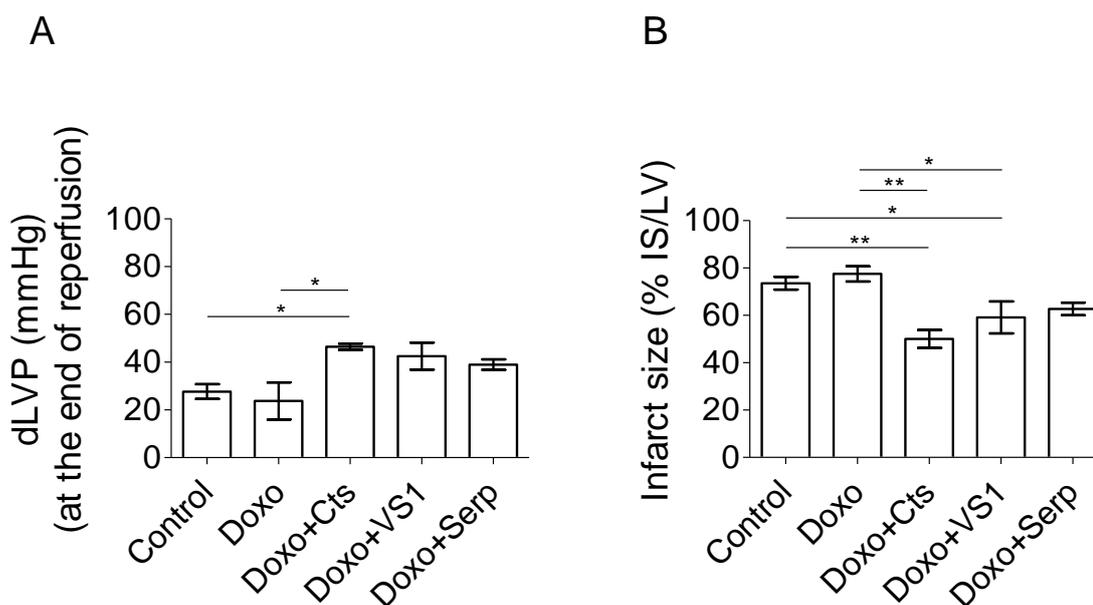


Fig. 15: Studi in vivo con peptidi CgA derivati (Cts, VS1 e Serp) in un modello di ratto. (A) variazioni dLVP. I dati sono espressi come valori dLVP (mmHg) alla fine dei 120 minuti di ri-perfusione per Doxo (n = 3), Doxo + Cts (n = 4), Doxo + VS1 (n = 4) e Doxo + Serp (n = 3). (B) IS. La quantità di tessuto necrotico misurata dopo ischemia globale di 30 minuti e 120 di ri-perfusione è espressa come percentuale della massa del ventricolo sinistro (LV) (% IS / LV). (D). Per confronto, è stato usato lo stesso gruppo di controllo. * p < 0.05, ** p < 0.01 One-way ANOVA/Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

1.5 La CgA attiva pathway intracellulari protettivi e disattiva l'up-regolazione dei componenti infiammatori nel tessuto cardiaco dopo I/R

Il meccanismo d'azione attraverso il quale la CgA induce cardioprotezione, è stato valutato investigando l'attivazione di pathway intracellulari di sopravvivenza, come RISK e SAFE, che mediano la cardioprotezione dopo I/R (Hausenloy et al., 2005). L'attivazione di questi pathway è stata valutata tramite analisi di Western blotting sui cuori di tutti i gruppi sperimentali dopo I/R. I cuori non trattati (solo perfusi per 190 minuti senza manovre ischemiche, gruppi Sham) e cuori del gruppo di controllo che hanno ricevuto manovre ischemiche (I/R) senza alcun tipo di trattamento farmacologico, sono stati usati come controllo. La fosforilazione di Akt ed Erk1/2, componenti chiave del RISK pathway, risultava minore nel gruppo Doxo rispetto a quello Sham. Mentre, il trattamento con CgA ha determinato un incremento significativo nell'espressione di queste chinasi rispetto al gruppo Doxo (Fig. 16 A,B) e ha indotto un incremento significativo nell'espressione di p-GSK-3 α/β un altro importante componente del RISK pathway (Fig. 16 C). Inoltre, nel gruppo CgA, l'espressione di questi componenti del RISK pathway era simile a quelli osservati nel gruppo Sham. La fosforilazione di STAT3, un componente specifico del SAFE pathway, ha mostrato un andamento simile alle chinasi attivate nel RISK pathway, risultando ridotto nei gruppi di controllo e Doxo e aumentato nel gruppo Doxo + CgA (Fig. 16 D). L'espressione di p-AMPK α , un biosensore dello stress energetico cellulare (Kim et al., 2016), risultava aumentato nei gruppi Doxo + CgA e CgA rispetto al gruppo Doxo (Fig. 16 E). In modo simile, l'espressione di iNOS e COX-2, marker specifici di infiammazione tissutale (Mukhopadhyay et al., 2009), mostravano un incremento nel gruppo Doxo ma non in quello Doxo + CgA o CgA (Fig. 16 F). In più, NLPR3, un componente intracellulare responsabile dell'attivazione di citochine pro-infiammatorie (Abderrazak et al., 2015), è stato up-regolato nel gruppo Doxo rispetto a quello di controllo ma non in quello Doxo + CgA e CgA (Fig. 16 G).

1.6 La CgA riduce la produzione di radicali liberi indotti da I/R nei cuori dei ratti trattati con Doxo

La produzione di radicali liberi nel trattamento con antracicline e dopo I/R nei cardiomiociti sono ben documentati (Octavia et al., 2012). Per valutare l'equilibrio redox nel cuore dei ratti, è stata analizzata l'espressione di marcatori specifici coinvolti nella produzione di radicali liberi, come XO (Yee et al., 1997) e AOX-1 (Kundu et al., 2012) e la produzione intracardiaca di ROS (Octavia et al., 2012). Analisi di western blot su tessuti cardiaci ha mostrato una riduzione significativa di AOX-1 e XO nel gruppo Doxo + CgA rispetto al gruppo Doxo (Fig. 16 H, I). Le concentrazioni di ROS intracardiache sono state valutate mediante saggio ELISA, i risultati mostrano un aumento significativo di ROS nel gruppo controllo e nel gruppo mentre, nel gruppo Doxo + CgA si è osservata una significativa riduzione dei ROS intracardiaci come anche nel gruppo solo CgA (Fig. 16 J).

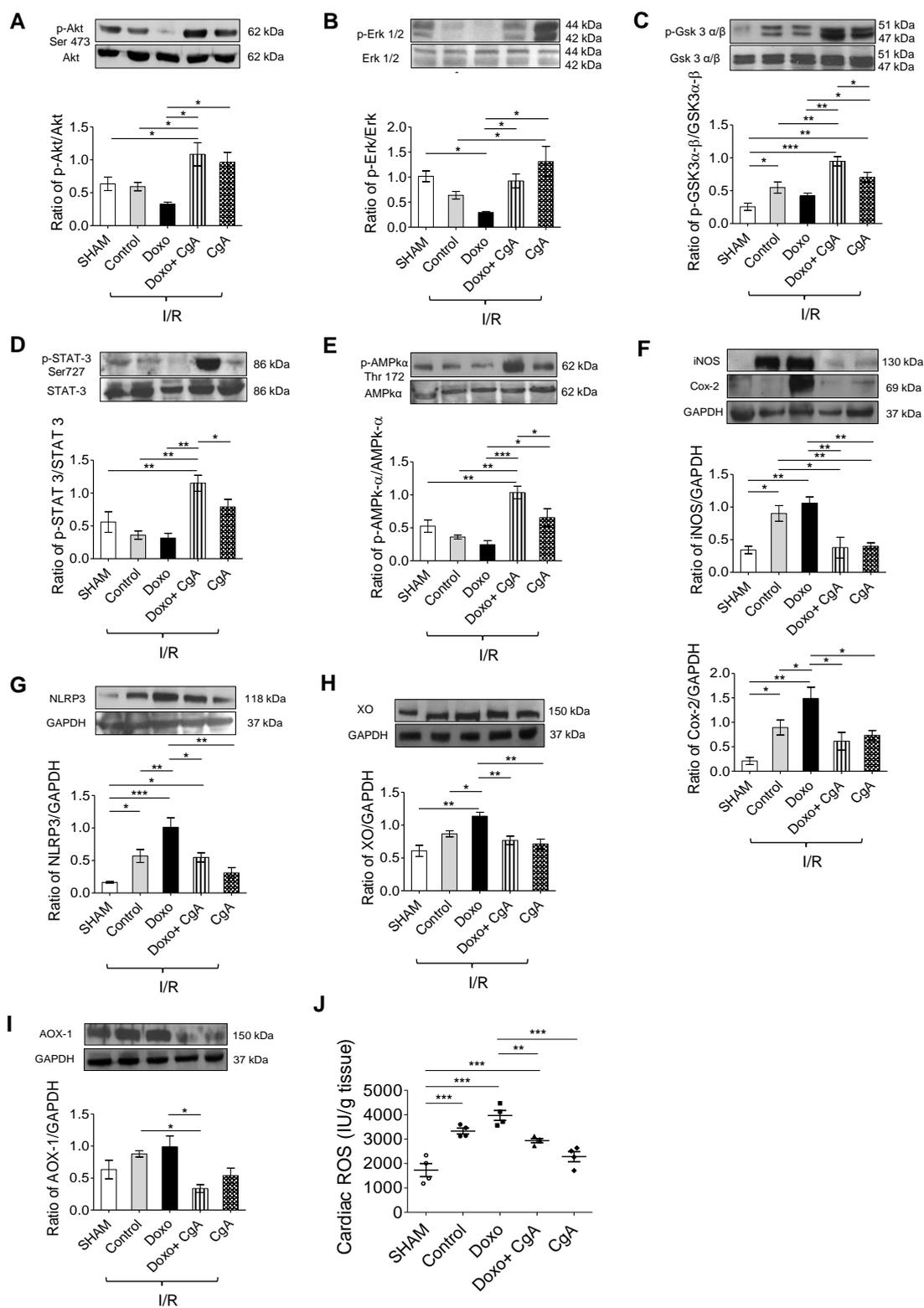


Fig. 16: Effetto di Doxo e CgA, da soli e in combinazione, sulle pathway di cardioprotezione e sui marker infiammatori. A – I) Analisi Western blot di Akt (A), Erk1/2 (B), GSK-3α/β(C), STAT3 (D), fosforilazione di AMPKα (E), iNOS e Cox-2 (F), NLRP3 (G), XO (H), AOX-1 (I), nei tessuti cardiaci dei gruppi Sham, control, Doxo, Doxo + CgA e CgA (n = 3 cuori / gruppo) dopo I/R. Gli istogrammi rappresentano il rapporto di analisi densitometrica delle proteine: loading control. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (1-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test). (J) Produzione intracardiaca di ROS (ELISA) nei tessuti cardiaci dei gruppi Sham, controllo, Doxo, Doxo + CgA e CgA (n = 3 cuori / gruppo). ** P < 0,01, *** P < 0,001 (1-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).

1.7 La CgA protegge il cuore dall'apoptosi

È stato anche valutato l'effetto della Doxo e della CgA sull'apoptosi a livello cardiaco. L'analisi immunohistochimica su tessuto cardiaco ha mostrato che ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain), una proteina capace di contrastare l'apoptosi delle cellule cardiache (Lu et al., 2013), è fortemente aumentata nei gruppi Doxo + CgA e CgA rispetto al gruppo Doxo e quello di controllo (Fig. 17 A). L'analisi tramite Western blot su tessuto cardiaco di Bcl-2 (una proteina antiapoptotica), Bax e caspasi 3 (marker proapoptotici) (Gustafsson et al., 2007), ha confermato l'effetto cardioprotettivo indotto dalla CgA; infatti, Bcl-2, Bax e caspasi-3 erano aumentati o diminuiti, rispettivamente, nei gruppi Doxo + CgA e CgA rispetto a quelli Sham, di controllo e Doxo (Fig. 17 B,D). Inoltre, mediante saggio TUNEL, i cuori dei gruppi Doxo + CgA e CgA hanno mostrato un minore numero di miociti apoptotici (identificato dai nuclei fluorescenti) rispetto al gruppo Doxo e di controllo (Fig. 17 E).

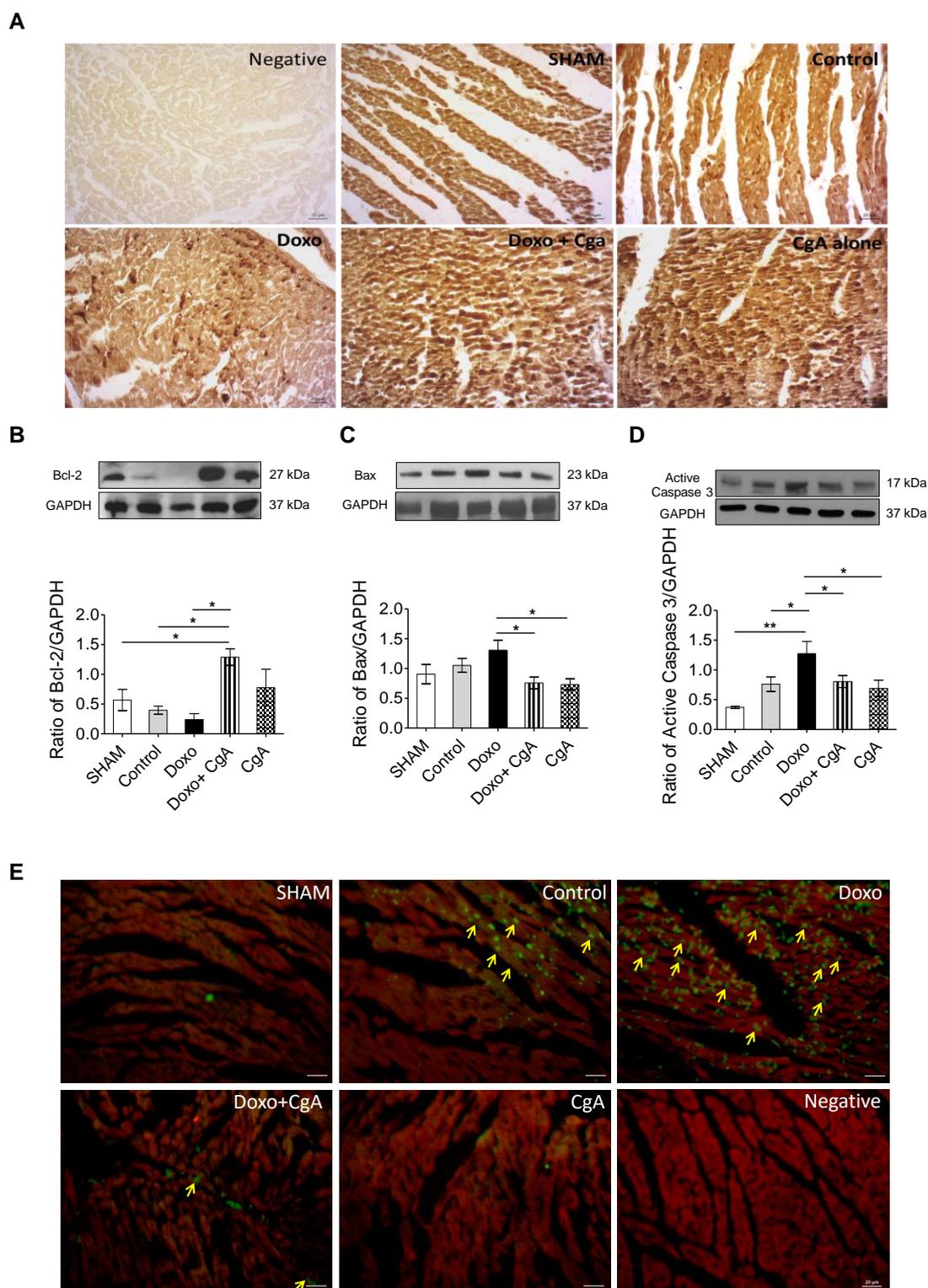


Fig. 17: Effetto di Doxo e CgA sull'apoptosi dei cardiomiociti. A) Localizzazione immunohistochemica di ARC su sezioni di ventricolo ($n = 3$ cuori/gruppo). Il controllo negativo è ottenuto omettendo l'anticorpo primario anti-ARC. 20 μm . B-D) Analisi Western blot dell'espressione di Bcl-2 (B), Bax (C) e caspasi-3 (D) nei tessuti cardiaci di Sham, controllo, Doxo, Gruppi Doxo + CgA e CgA ($n = 3$ cuori / gruppo). Gli istogrammi rappresentano il rapporto di analisi densitometrica delle proteine: loading control. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (1-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test). E) Analisi TUNEL. TUNEL positive i nuclei dei cardiomiociti sono indicati da frecce gialle. I cardiomiociti nelle sezioni colorate con TUNEL sono stati identificati utilizzando un anticorpo anti-miosina (rosso). Negativo (senza deossinucleotidil transferasi terminale). Scale bars 20 μm .

2. Il trattamento con Doxo riduce l'espressione intracardiaca della CgA

La CgA è prodotta dal cuore, e la stimolazione chimica o fisica ne promuovono il processo proteolitico intracardiaco (Pasqua et al., 2013; Glattard et al., 2006). Per valutare se la Doxo possa influenzare la produzione intracardiaca di CgA e la sua frammentazione, è stata effettuata un'analisi di Western blot sull'omogenato di cuori non-perfusi (NP) utilizzando un anticorpo monoclonale (mAb 5A8), specifico per la regione N-terminale della CgA umana e di ratto (Ratti et al., 2000). L'analisi Western blot degli estratti di tessuto cardiaco del gruppo di controllo ha mostrato una banda maggiore di ~60kDa e altre bande di massa minore (45 e 25 kDa), che probabilmente corrispondono alla CgA frammentata (Fig. 18 A). L'intensità di tutte queste bande diminuisce nel gruppo Doxo (Fig. 18 A), suggerendo che questo farmaco potrebbe ridurre l'espressione di CgA nei cuori di ratto o causare processo proteolitico con produzione di frammenti non riconosciuti dal nostro anticorpo. La somministrazione di CgA esogena non evita la riduzione dell'espressione della CgA endogena, suggerendo che il meccanismo protettivo della CgA esogena non è mediato da un'aumentata espressione di CgA endogena nel cuore. Inoltre, abbiamo osservato una riduzione nell'intensità della banda nel gruppo CgA, suggerendo che la CgA esogena potrebbe anche in qualche modo ridurre l'espressione intracardiaca di CgA o promuovere la sua degradazione.

3. Il trattamento con Doxo causa la riduzione endogena della CgA plasmatica

Gli effetti della Doxo sui livelli circolanti della CgA endogena sono stati valutati usando Kit-ELISA capaci di determinare la CgA *full length* e i frammenti mancanti nella regione C-terminale (assay-1) o con un saggio capace di determinare la CgA *full length* (assay-2). I livelli plasmatici di CgA nei ratti trattati con Doxo risultavano minori rispetto a quelli di controllo (Fig. 18 B, C), suggerendo come la Doxo possa ridurre i livelli circolanti di CgA endogena. La riduzione osservata non era probabilmente correlata alla degradazione della CgA *full length* perché il rapporto tra i risultati dell'assay 2 e dell'assay 1 non sono stati influenzati in modo significativo. In più, la CgA esogena in combinazione con Doxo sembrerebbe non determinare un recupero dei livelli circolanti di CgA endogena (Fig. 18 B, C). Inoltre, la riduzione della CgA circolante dopo trattamento con Doxo è stata confermata mediante analisi di Western blot su campioni di plasma; in questo caso è stata osservata una riduzione marcata della banda da 70-kDa nei ratti trattati con Doxo (Fig. 19 A, B). Questi risultati e quelli sopra riportati suggeriscono che la Doxo possa ridurre l'espressione della CgA nel cuore così come i suoi livelli circolanti. È stata anche studiata l'espressione della CgA negli estratti di ghiandola surrenale dove, però, non è stata osservata una sua riduzione significativa (Fig. 18 D), suggerendo che l'effetto della Doxo sui livelli circolanti di CgA non sia correlato ad una minore espressione della proteina in questa ghiandola.

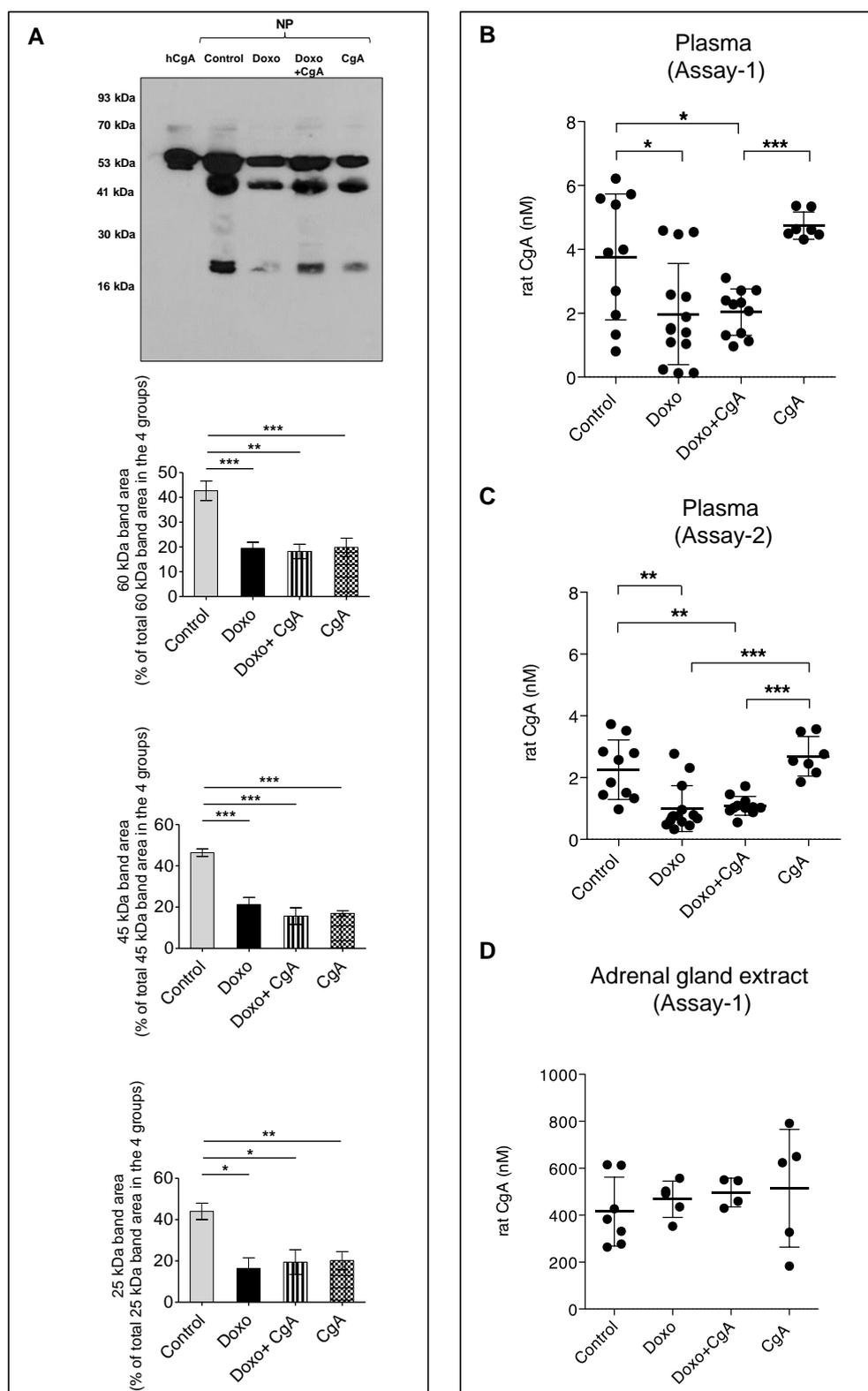


Fig. 18: Effetto di Doxo sull'espressione della CgA intracardiaca e sui livelli circolanti di CgA. A) Analisi Western blot su tessuto di cuore Non Perfuso dei gruppi controllo, Doxo, Doxo + CgA e CgA (n = 3 cuori/gruppo). Gli istogrammi rappresentano l'analisi densitometrica di bande di 60-, 45- e 25-kDa. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (1-way ANOVA e Newman-Keuls multiple comparison test). B, C) Livelli plasmatici di CgA nei gruppi di controllo, Doxo-, Doxo + CgA- e CgA (n = 4-13 per gruppo) sono stati rilevati da 2 Kit-ELISA. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001 (unpaired 2-tailed Student's t test). D) Livelli di CgA negli estratti di ghiandola surrenale.

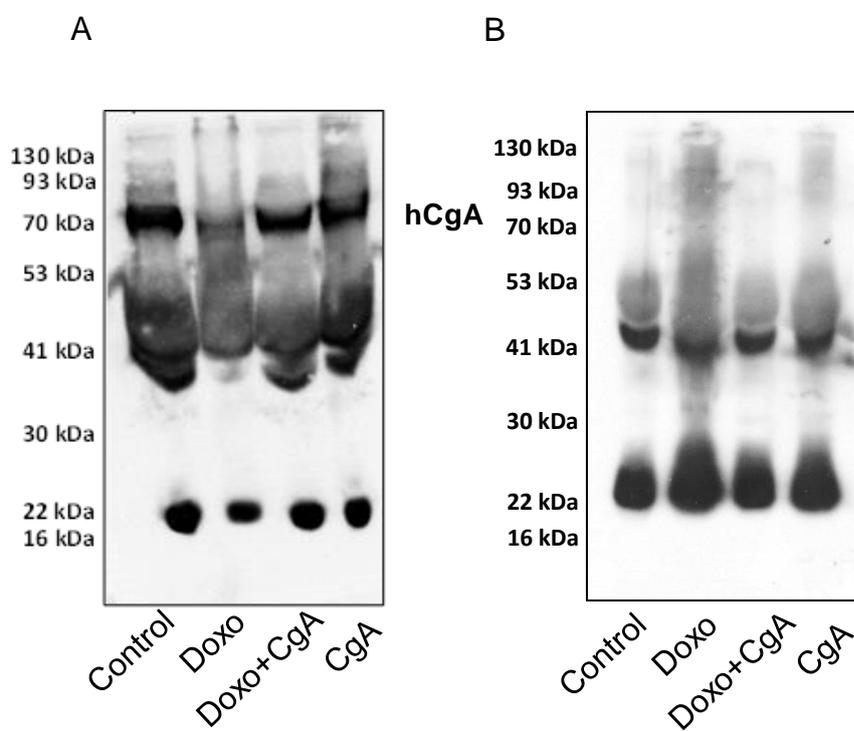
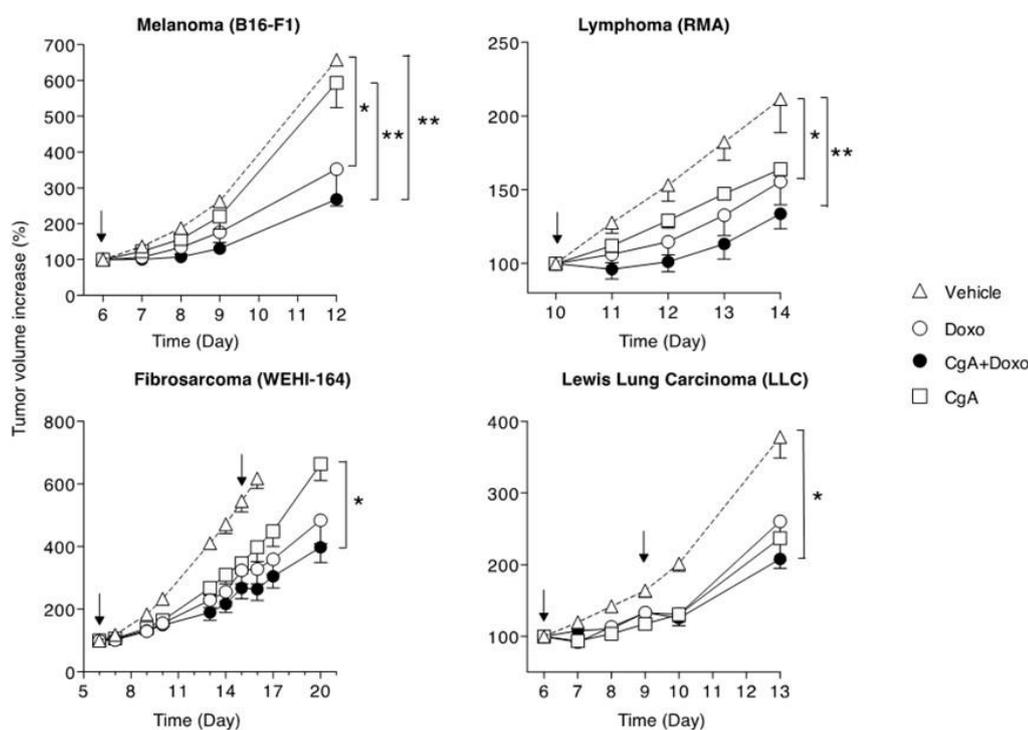


Fig. 19: (A) Immunoblot rappresentativi dei livelli di CgA (~ 70 kDa) in campioni di plasma dei gruppi Control, Doxo, Doxo + CgA e CgA (n = 3 campioni/gruppo di plasma), rilevati con mAb5A8. (B) Controllo negativo usando solo anticorpo secondario senza anticorpo primario (mAb 5A8), dimostrando che solo la banda ~ 70 kDa era specifica.

4. La CgA non influisce sull'attività antitumorale della Doxo in modelli murini

L'effetto della CgA sull'attività antitumorale della Doxo è stato investigato in diversi modelli murini che hanno subito l'impianto di cellule tumorali. A questo scopo, topi portatori di tumori sottocutanei, come melanoma (B16-F10), fibrosarcoma (WEHI-164), linfoma (RMA, o carcinoma polmonare di Lewis, sono stati trattati solo con Doxo o in combinazione con CgA. In tutti questi modelli, la Doxo ha significativamente ritardato la crescita tumorale sia quando iniettata da sola che in combinazione con CgA (Fig. 20 A, B), suggerendo che la CgA non inibisca l'attività antitumorale della Doxo. È importante notare come la CgA da sola potrebbe inoltre rallentare la crescita tumorale in alcuni modelli. Questo non è del tutto inaspettato poiché precedentemente è stato dimostrato come la CgA possa inibire la crescita tumorale inibendo l'angiogenesi (Curnis et al., 2016).

A



B

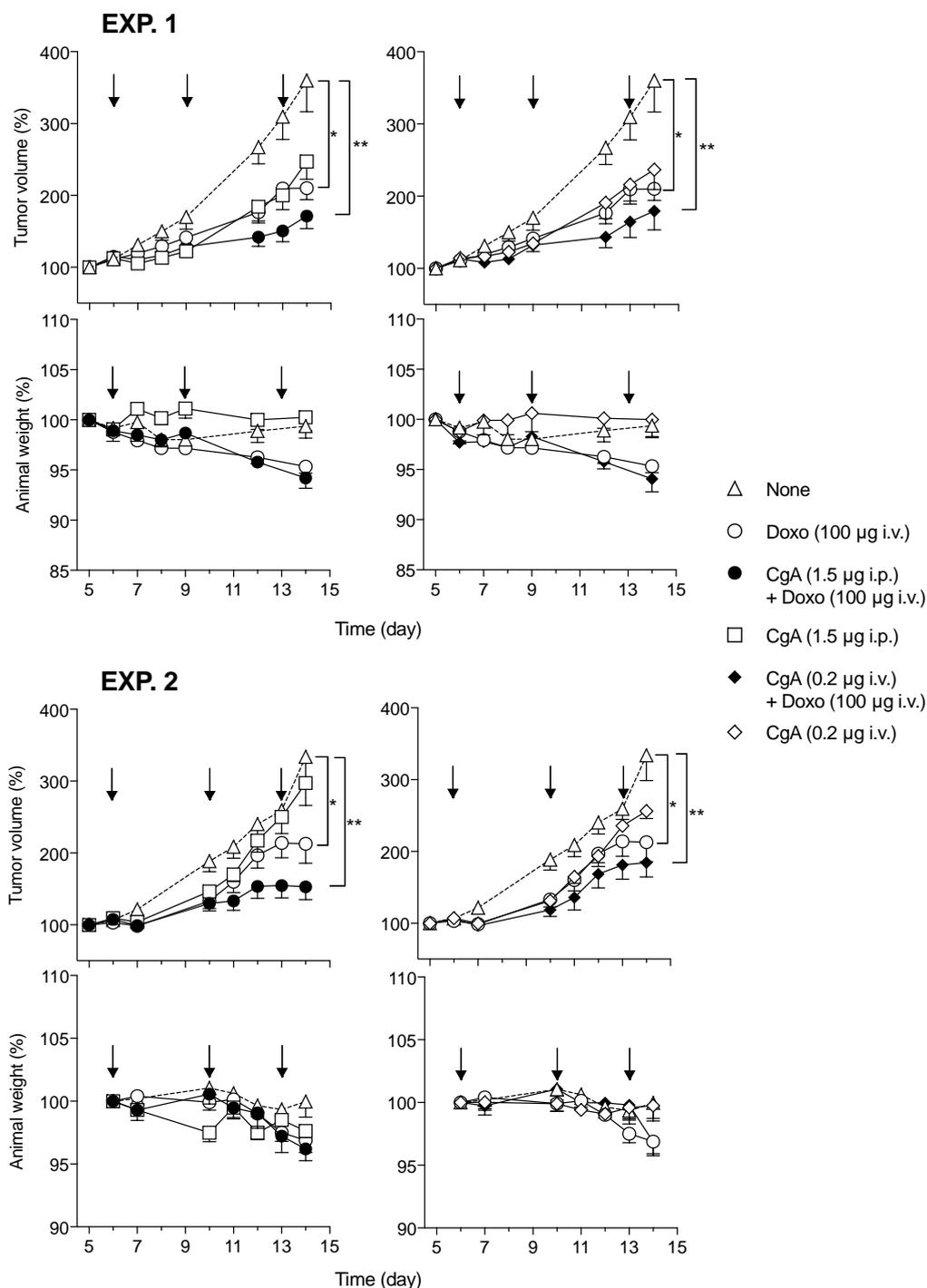


Fig. 20: (A)Attività antitumorale di Doxo da sola o in presenza di CgA. CgA: 1,5 µg, i.p. (tutti Modelli); Doxo: 220 µg, i.p. (Melanoma B16-F1), 130 µg, i.p. (Linfoma RMA), 150 µg, i.v. (d 6) e 200 µg, i.v. (d 15) (WEHI-164 fibrosarcoma) e 80 µg, i.p. (d 6) e 100 µg, i.p. (d 9) (LLC). Le frecce indicano il tempo di trattamento e l'aumento del volume del tumore (6 topi / gruppo); *P<0.05, **P<0.01 (B16F1 melanoma; 2-tailed Student's t test al d 12). Altri tumori: l'area sotto la curva per ogni topo è stata calcolata usando GraphPad Prism. Differenze tra le aree calcolate sono stati valutati dal 2-tailed Student's (6 animali / gruppo). *P<0.05, **P<0.01.

(B)Effetto della CgA sull'attività antitumorale della Doxo nel modello di fibrosarcoma WHEI-164. I topi sono stati trattati come indicati nei due esperimenti indipendenti (EXP.1 ed EXP.2). Sono mostrati cambiamenti nei volumi del tumore e nel peso degli animali (%). Le frecce indicano il tempo del trattamento. L'area sotto la curva per ogni topo è stata calcolata utilizzando il software GraphPad Prism. Le differenze tra le aree calcolate sono state valutate tramite 2-tailed Student's (6 animali / gruppo). *P<0.05, **P<0.01.

Discussione

La cardiotossicità indotta da Doxo presenta una vasta gamma di sintomi non specifici, tra cui dolore toracico (dovuto a miopericardite) e palpitazioni (secondaria a tachicardia sinusale, tachicardia sopra-ventricolare). La cardiomiopatia non solo è dose-dipendente, ma è anche influenzata da altri fattori, tra cui l'età del paziente, la storia di precedenti malattie cardiovascolari e la ridotta velocità della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) (Von Hoff et al., 1979).

La Doxo si accumula principalmente nel fegato, nei reni e nel cuore. Il cuore è altamente suscettibile alla tossicità da Doxo perché il rapporto mitocondri-cardiomiociti è elevato (Wang et al- 2012), rendendolo così più sensibile allo stress ossidativo. Inoltre, il cuore ha una bassa capacità rigenerativa, rispetto ad altri organi (Barry et al., 2007). I tessuti cardiaci mostrano diversi cambiamenti strutturali, tra cui perdita miofibrillare, fibre eosinofile, nuclei picnotici, congestione dei vasi sanguigni e diffusa infiltrazione di neutrofili (Abdel-Daim et al., 2017).

I risultati mostrano per la prima volta come la hCgA ricombinante esogena, somministrata a dosi fisiologiche, sia in grado di prevenire la cardiotossicità indotta da Doxo e la suscettibilità all'infarto del miocardio in un modello di ratto. L'azione cardioprotettiva della CgA è stata analizzata utilizzando il cuore di ratto isolato e perfuso secondo metodica Langendorff, che rappresenta uno strumento standardizzato e versatile per studiare la suscettibilità all'I/R e l'alterata funzione miocardica, come quella indotta dalla cardiotossicità Doxo-dipendente (Bell et al., 2011). Nei cuori di ratto isolati e perfusi la CgA ha prevenuto gli effetti negativi esercitati dalla Doxo sul recupero sistolico e sulla pressione diastolica, diminuendo l'area d'infarto. È stato anche osservato che il trattamento con Doxo ha ridotto significativamente i livelli plasmatici della CgA endogena indicando un nuovo meccanismo attraverso il quale la Doxo possa indurre cardiotossicità. La protezione sistemica contro il danno Doxo-dipendente è stata osservata con una riduzione significativa di TNF- α , IL-1 β , LDH, cTnT e livelli plasmatici e intracardiaci dei ROS. In linea con questi risultati, si sono valutati i pathway intracellulari di cardioprotezione mostrando un'azione protettiva della CgA attraverso l'inibizione dell'apoptosi e l'attivazione di chinasi di sopravvivenza, riducendo la produzione di radicali liberi e mediante una riduzione di markers di infiammazione tissutale. Il trattamento con Doxo ha anche indotto una riduzione di questo importante fattore protettivo a livello cardiaco come ulteriore meccanismo attraverso il quale questo farmaco può indurre cardiotossicità.

La CgA esogena previene l'infiammazione sistemica Doxo-dipendente e la fibrosi cardiaca

È noto che la Doxo può causare tossicità e infiammazione in diversi organi, incluso il cuore, il fegato e l'intestino (Wang et al., 2016; Wardill et al., 2016). In particolare, la Doxo può causare il rilascio di citochine proinfiammatorie nel sangue dei pazienti, come IL-1 β e TNF- α (Wang et al., 2016), e il rilascio di marker citotossici e cardiotossici come ROS, cTnT e LDH (Gianni et al., 2008; Aluise et al., 2009; Nagi et al., 2000; Herman et al., 1999). Nel cuore viene stimolata l'infiammazione, l'apoptosi e il danno tissutale indotti dal trattamento con Doxo; questo effetto comporta l'attivazione del pathway TNF dipendente, la generazione di ROS e l'alterazione dei livelli di citochine proinfiammatorie come IL-1 β e TNF- α (Wang et al., 2016; Su et al., 2010; Yuan et al., 2018), quindi il cuore stesso può essere una fonte importante di processi infiammatori e danno citotossico. Inoltre, la Doxo, alterando l'epitelio intestinale, può indurre un rilascio significativo di endotossine nella circolazione sanguigna, contribuendo così all'infiammazione sistemica e al danno multiorgano (Wang et al., 2016). Sorprendentemente, una bassa dose di CgA può prevenire il rilascio indotto dalla Doxo di tutti i marcatori infiammatori e citotossici nel sangue di ratti, indicando un effetto protettivo contro il danno sistemico indotto da Doxo. Le proprietà antinfiammatorie della CgA sono note grazie all'azione della Cts, peptide CgA-derivato, in caso di infiammazione intestinale (Rabbi et al., 2014). In modelli murini di infiammazione del colon, il trattamento *in vivo* con Cts riduce l'insorgenza della malattia, sopprimendo le risposte infiammatorie e diminuendo le citochine proinfiammatorie rilasciate da macrofagi peritoneali e derivanti del midollo osseo (Rabbi et al., 2014).

Inoltre, è interessante notare come la somministrazione di CgA possa attenuare la riduzione dei livelli di proteine plasmatiche dopo il trattamento con Doxo. Dato che la Doxo si lega alle proteine plasmatiche (Chassany et al., 1996) provocando un aumento di Doxo libera e della sua distribuzione tissutale (Saleem et al., 2016), questo effetto della CgA potrebbe rappresentare un ulteriore meccanismo di protezione.

La CgA riduce gli effetti cardiaci dannosi indotti da Doxo diminuendo l'espressione di CTGF, un fattore di crescita del tessuto connettivo, che aumenta l'insufficienza cardiaca e viene utilizzato come marker di fibrosi durante il trattamento con Doxo (Szabó et al., 2014) e riduzione della deposizione di collagene, suggerendo che la CgA potrebbe prevenire la fibrosi cardiaca. Questi risultati nel complesso supportano l'ipotesi che la CgA possa prevenire vari effetti di danni sistemici e locali causati da Doxo.

La CgA protegge dal danno da I/R

Funzionalmente, la tossicità da Doxo nell'uomo e nei modelli animali è associata a ridotta frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF), ridotta contrattilità, aumento del post-carico e aumento del tempo di rilassamento isovolumetrico, tutti elementi che riflettono disfunzione cardiaca, insufficienza cardiaca e aumento della suscettibilità all'infarto del miocardio (Lipshultz et al., 1991; Stoddard et al., 1992).

Nel presente lavoro, abbiamo valutato il ruolo cardioprotettivo della CgA *full length* dimostrando che la forma intera di questa proteina, a concentrazioni fisiologiche (dose cumulativa 75 µg/Kg), è in grado di indurre effetti cardioprotettivi su cuori di ratto sottoposti a protocolli di I/R secondo metodica Langendorff. La concentrazione di CgA utilizzata in questo lavoro, nella forma *full length*, è stato visto che modula direttamente le prestazioni cardiache e induce la dilatazione coronarica attraverso la via dell'NO (Pasqua et al., 2013). Gli effetti cardiaci della CgA scompaiono poi a concentrazioni più elevate (10 e 16 nM), generando una curva a campana (Pasqua et al., 2013), probabilmente a causa di meccanismi di controregolazione attivati ad alte concentrazioni e/o a cambiamenti strutturali della CgA, compresi cambiamenti nella struttura quaternaria. È noto inoltre, che a pH fisiologico, la CgA può esistere come monomero o dimero (Yoo e Lewis, 1996). Tali dati espandono il ruolo modulatore esercitato dalla CgA sulla performance cardiaca in condizioni fisiologiche e fisiopatologiche (Angelone et al., 2012; Tota et al., 2014).

A tal proposito, è interessante notare come la protezione indotta dalla CgA si abbia sia in termini di riduzione della fibrosi e dell'infiammazione cardiaca che in termini di riduzione dell'area di infarto.

È stato osservato che la CgA in combinazione con Doxo, somministrata cronicamente per una settimana, esercita una notevole protezione in Pre-C, con una significativa riduzione dell'area di infarto (IS~ 45%) rispetto ai cuori degli animali trattati con solo Doxo (IS ~ 75%); questo effetto è confermato anche dal miglioramento della performance cardiaca, in termini di recupero sistolico post-ischemico e dalla riduzione della contrattura. Lo stesso effetto protettivo si è verificato nei cuori di ratto trattati con la sola CgA. Nei cuori trattati con Doxo non abbiamo osservato un incremento significativo dell'IS, anche se già relativamente alta, rispetto ai cuori trattati con soluzione fisiologica come ci si poteva aspettare. Ciò non è in contraddizione con gli effetti tossici che caratterizzano il trattamento con Doxo perché tutti i marker relativi al danno cardiaco (LDH, cTNT, etc), infiammazione e apoptosi risultano significativamente aumentati confermando gli effetti avversi del chemioterapico pur senza essere tradotti in

un'area di infarto maggiore. È importante notare che la protezione indotta dalla CgA sia in presenza che in assenza di Doxo si ottiene a concentrazioni plasmatiche fisiologiche [10,71 µg/Kg per 7 giorni, la cui dose cumulativa di 75 µg/Kg corrispondente al normale livello plasmatico di CgA di ~ 1-5 nM (O'Connor et al., 1985; Ceconi et al., 2002; Stridsberg et al., 2004)]. La rilevanza di questo risultato è ulteriormente supportata dall'azione cardioprotettiva di diversi agenti farmacologici usati contro il danno ischemico e riportati in letteratura. Ad esempio, il 17 β-estradiolo (0,25 mg/kg per 28 giorni: Fraser et al., 1999), il testosterone (1,0 mg/kg per 21 giorni: Borst et al., 2010), ma anche la Cts, peptide CgA derivato (0,25 mg/kg per 28 giorni: Wang et al., 2016), somministrati cronicamente prima dell'ischemia, determinano cardioprotezione, ma a concentrazioni superiori rispetto ai normali livelli plasmatici fisiologici. Inoltre, dati di letteratura riportano gli effetti cardioprotettivi dei peptidi derivati dalla CgA, vale a dire VS1, Cts e Serp somministrati in Pre- o Post-C durante la perfusione cardiaca. Si è visto che la VS1 suscita effetti protettivi in Pre-C (75 nM) (Cappello et al., 2007), la Cts funge da agente protettivo in Post-C (75 nM) (Penna et al., 2010; Tota et al., 2014), e la Serp (75 nM) è attivo sia nel Pre che nel Post-C (Pasqua et al., 2015). Gli effetti protettivi di Cts e Serp si verificano anche in condizioni fisio-patologiche, nei cuori di ratto spontaneamente ipertesi sottoposti a protocolli di I/R (Penna et al., 2014; Pasqua et al., 2015).

È interessante notare come i peptidi CgA-derivati potrebbero esercitare anche effetti cardioprotettivi contro la cardiotoxicità indotta dal trattamento con Doxo. Tuttavia, in questo caso, la cardioprotezione è stata valutata somministrando cronicamente i peptidi (33 nmol/Kg/d al giorno per una settimana, la prima dose utile che *ex vivo* ha dato effetti sulla performance cardiaca) ad una dose molto più elevata di quella richiesta dalla CgA *full length*. Pertanto, la CgA intera è un agente cardioprotettivo più potente rispetto ai suoi frammenti.

La CgA modula l'attivazione della segnalazione intracellulare dopo danno ischemico

Un'analisi meccanicistica della cardioprotezione esercitata dalla CgA è stata ottenuta da studi molecolari su specifici pathway di cardioprotezione. Sebbene la riperfusione miocardica rimanga la strategia più efficace per limitare le dimensioni dell'area di infarto, è ormai ben noto che la riperfusione stessa può causare alterazione e danni cardiaci (Piper et al., 1998; Yellon et al., 2007). La cardioprotezione che si valuta dopo un protocollo di I/R coinvolge due vie principali:

- 1) il RISK pathway, mediante la valutazione dell'attivazione di chinasi di sopravvivenza tra cui PI3K/Akt, ERK1/2 e il downstream di GSK-3 β (Hausenloy et al., 2004 e 2011);
- 2) e il SAFE pathway, mediato dall'attivazione del TNF- α e STAT-3 (Hausenloy et al., 2004 e 2011).

Inizialmente il RISK e il SAFE pathway sono stati indicati come vie di segnalazione intracellulare attivate dal condizionamento ischemico locale (Tsang et al., 2004; Hausenloy et al., 2011). Studi successivi hanno però dimostrato come questi pathway si attivino anche in caso di Pre- e Post-C (Shi et al., 2012; Tamareille et al., 2011).

Negli omogenati cardiaci sono stati valutati quindi il RISK e SAFE pathway mediante analisi dell'espressione di Akt, ERK1/2, GSK3 β e STAT3 (Hausenloy et al., 2004 e 2011) in tutti i gruppi sperimentali. Queste chinasi convergono sul mPTP (poro di transizione mitocondriale che causa la fuoriuscita del citocromo C e di conseguenza apoptosi) bloccandone l'apertura e determinando cardioprotezione (Hausenloy et al., 2004 e 2011). È interessante notare come il co-trattamento Doxo + CgA mostri un aumento della fosforilazione di tutte queste chinasi, suggerendo quindi che la CgA possa mediare cardioprotezione attraverso l'attivazione di queste cascate trasduzionali.

Inoltre, è stata valutata l'espressione di AMPK, un regolatore critico del metabolismo cellulare che svolge un ruolo importante nel diabete, nel cancro e nelle malattie cardiovascolari. Nel cuore, l'attivazione di AMPK è essenziale nella risposta adattativa allo stress cardiomiocitico che si verifica durante l'ischemia miocardica (Qi et al., 2015). Durante la ri-perfusione ischemica, l'attivazione di AMPK modula il metabolismo del glucosio e degli acidi grassi, la funzione mitocondriale, lo stress del reticolo endoplasmatico (ER), l'autofagia e l'apoptosi (Qi et al., 2015). L'attivazione farmacologica di AMPK previene la necrosi miocardica e la disfunzione contrattile durante i protocolli di I/R e potenzialmente rappresenta una strategia cardioprotettiva per il trattamento dell'infarto miocardico (Qi et al., 2015).

Nel presente caso si è visto come il co-trattamento con Doxo e CgA induca un aumento nell'espressione di questo importante fattore cardioprotettivo suggerendo che la CgA possa cardioprotteggere contro il danno da Doxo anche attraverso questo meccanismo.

La CgA riduce l'infiammazione nel tessuto cardiaco dopo I/R

Il danno da I/R miocardico è associato all'attivazione di varie risposte infiammatorie che svolgono un ruolo fisio-patologico importante nella progressione della disfunzione cardiaca (Ha et al., 2010). I principali mediatori dell'infiammazione cardiaca sono iNOS e COX-2, entrambi coinvolti nella cardiotossicità indotta da Doxo (Kelleni et al., 2015). L'esatto meccanismo alla base della cardiotossicità non è ancora completamente chiaro, ma sembra che sia coinvolta l'infiammazione cardiaca. La Doxo provoca una significativa produzione di citochine proinfiammatorie (come TNF- α e IL-6), aumento di iNOS nel tessuto cardiaco e una concomitante riduzione di IL-10, una nota citochina antinfiammatoria (Abushouk et al., 2019). I presenti risultati mostrano che nel gruppo Doxo l'espressione di iNOS e COX-2 risulta aumentata mentre si osserva una riduzione nel gruppo Doxo + CgA, indice del potenziale effetto cardioprotettivo indotto da questa proteina.

Inoltre, è stata valutata anche l'espressione dell'inflammasoma (NLRP3), un complesso intracellulare responsabile dell'attivazione delle citochine pro-infiammatorie (Abderrazak et al., 2015), associato ad un'esacerbazione del danno da I/R (Mastrocola et al., 2016). Nel gruppo Doxo, così come nel gruppo controllo, l'espressione di NLRP3 risulta aumentata, mentre il co-trattamento con CgA induce una riduzione di questo importante componente intracellulare. Ciò suggerisce che la protezione miocardica indotta dalla CgA si verifica anche attraverso una riduzione di importanti bersagli infiammatori alterati dal trattamento con Doxo.

La CgA riduce lo stress ossidativo e inibisce l'apoptosi nei cuori ischemici dopo trattamento con Doxo

Durante un danno cardiaco da I/R, l'aumento della produzione di ROS è responsabile della morte dei cardiomiociti causando l'attivazione di pathway apoptotici durante la fase di riperfusione (Valdez et al. 2011). La distruzione dei miociti, inclusa quella Doxo-dipendente, deriva dalla generazione di ROS e da un aumento dello stress ossidativo intracellulare (Gianni et al., 2008; Simunek et al., 2009). Questi eventi, insieme all'inibizione di Bcl-2, importante fattore anti-apoptotico (Leung e Wang, 1999), mediano la morte cellulare dei cardiomiociti. Inoltre, la Doxo down-regola l'espressione di proteine specifiche mitocondriali del muscolo cardiaco, che sono essenziali per la funzione dei cardiomiociti (Ito et al., 1990), aumenta l'attività degli enzimi ossidativi extra-mitocondriali come XO (Pan e Bachur, 1980) e NADPH

ossidasi (Zhao et al., 2010) e dall'altra parte inibisce l'attività antiossidante di enzimi endogeni (Abdel-Daim et al., 2017; Abushouk et al., 2017).

I risultati del presente studio sono in accordo con questo scenario, come dimostrato dalla valutazione degli enzimi e dei fattori coinvolti nella produzione di ROS. In particolare, si è visto che la somministrazione di CgA esogena ha indotto una significativa riduzione dei ROS intracardiaci e l'espressione di XO e AOX-1, rispetto ai gruppi di controllo e Doxo. Questi enzimi sono importanti in condizioni ischemiche (Raghuvanshi et al., 2007; Li et al., 2009), infatti la XO è responsabile della generazione dei ROS contribuendo al danno ischemico (Yee et al., 1997), mentre AOX-1 catalizza l'ossidazione di un varietà di aldeidi con produzione di perossido di idrogeno (Neumeier et al., 2006). La riduzione dell'espressione di entrambi gli enzimi in presenza di CgA suggerisce che la proteina è in grado di proteggere il cuore contrastando lo stress ossidativo responsabile della morte cellulare durante I/R dopo trattamento con Doxo.

È generalmente riconosciuto che lo stress ossidativo generato dalla Doxo attiva la segnalazione apoptotica intracellulare che porta alla morte dei cardiomiociti (Nitobe et al., 2003). La Doxo è nota per influenzare l'apoptosi modificando il rapporto Bcl-2/Bax, determinando l'attivazione a valle di diverse caspasi con conseguente attivazione dell'apoptosi (Tacar et al., 2013). Si è quindi valutata anche l'attivazione di pathway apoptotici, dimostrando come la CgA induca cardioprotezione migliorando l'espressione di ARC (Lu et al., 2013) e Bcl-2, proteine anti-apoptotiche (Lu et al., 2013) e riducendo i livelli di espressione di Bax e Caspasi-3, proteine pro-apoptotiche (Shi et al., 2010; Lee et al., 2012). Questi risultati sono stati confermati mediante saggio TUNEL, in grado di riconoscere i nuclei apoptotici presenti nei cardiomiociti. I risultati ottenuti confermano l'attività cardioprotettiva indotta dalla CgA nel contrastare gli effetti deleteri indotti dal trattamento con Doxo.

Valutazione della CgA intracardiaca dopo trattamento con Doxo

Come riportato da Pasqua et al. (2013), la CgA intracardiaca viene processata proteoliticamente per generare brevi frammenti (tra cui VS1) dopo una condizione di stress, ad esempio stimolazione adrenergica e da ET-1 (Pasqua et al., 2013). Questo fenomeno è supportato dalla presenza nel cuore di ratto di PC1/3, PC2 e carbossipeptidasi H/E, che potrebbero essere coinvolti nel processamento della CgA (Pasqua et al., 2013 e riferimenti in esso). Nel presente studio, si sono ampliate le conoscenze riguardo al clivaggio della CgA intracardiaca

conseguente al danno dipendente da Doxo e allo stress indotto da I/R. Dopo il trattamento con Doxo, la banda corrispondente al peso molecolare della CgA intera (~ 60 kDa) si è ridotta significativamente rispetto al gruppo di controllo. Al contrario, nei gruppi Doxo + CgA e CgA da sola, non si è osservato un recupero nei livelli di espressione di questa proteina, suggerendo che il meccanismo protettivo della CgA esogena non è mediato da un ripristino nell'espressione di CgA endogena nel cuore. Nel loro insieme questi dati sono coerenti con l'idea che la condizione ischemica sia uno stimolo specifico in grado di indurre il processamento proteolitico di questo importante fattore protettivo che aumenta in presenza di Doxo.

La Doxo provoca una riduzione dei livelli plasmatici della CgA endogena

Un importante punto che merita di essere discusso è che l'attività protettiva della CgA si ottiene ad una dose esogena che genera livelli plasmatici nel range dei valori fisiologici, 2-4 nM [ad es. nei ratti non trattati osserviamo livelli fisiologici nell'intervallo tra 2-5 nM di CgA (Curnis et al., 2016)]. Questi risultati suggeriscono che la CgA esogena a concentrazioni simili a quelle fisiologiche abbia un ruolo significativo nella cardioprotezione.

I livelli di CgA circolante endogena sono considerati un utile marker di tumori neuroendocrini e malattie cardio-renali (Angelone et al., 2012). I livelli plasmatici di CgA sono anche indice dell'attività neuroendocrina simpatico-surrenale (SAN), risultante sia dal surrene che dal sistema nervoso autonomo periferico (Dev et al., 2010). Inoltre, le concentrazioni plasmatiche di CgA sono aumentate fino a 10-20 nM (500-1000 ng/mL) nei pazienti con insufficienza cardiaca cronica, e queste aumentano significativamente in base alla gravità della disfunzione cardiaca, rappresentando quindi un predittore indipendente di mortalità (Ceconi et al., 2002; Pieroni et al., 2007). Il presente studio ha dimostrato che i livelli plasmatici di CgA sono significativamente ridotti dopo il trattamento con Doxo. Questa riduzione è presente anche nel gruppo trattato con Doxo + CgA, suggerendo che la produzione della proteina endogena è influenzata dalla Doxo, indipendentemente dalla somministrazione di quella esogena. I dati prodotti suggeriscono che la protezione contro il danno indotto da Doxo è correlato alla somministrazione di CgA esogena.

Si è, inoltre, rilevato anche i livelli plasmatici di CgA C-terminale (410-439), che contiene la Serp cardioattiva, sono ridotti dopo il trattamento con Doxo (mostrato in Fig. 18, Assay 2). La Serp è un frammento cardioattivo in grado di stimolare la contrattilità e indurre protezione contro il danno da I/R sia in condizioni normali che patologiche (ratti spontaneamente ipertesi, SHR) (Tota et al., 2012, Pasqua et al., 2015). Presumibilmente, la riduzione della CgA C-

terminale (410-439) osservata negli animali sottoposti al trattamento con Doxo contribuisce all'insorgenza della cardiotoxicità. Questa riduzione si manifesta anche nel gruppo Doxo + CgA, mentre nel gruppo CgA e in quello controllo i livelli sono simili. Ciò supporta ulteriormente la possibilità che la cardioprotezione osservata dopo il trattamento con CgA sia dovuta alla somministrazione esogena della CgA piuttosto che alla CgA endogena. Al contrario, i livelli totali di CgA C-terminale non sono cambiati significativamente tra i gruppi, suggerendo che il dominio CgA, che induce protezione contro il danno indotto dal trattamento con Doxo, non si trova nella regione C-terminale. Probabilmente, la protezione dipendente dalla CgA può essere dovuta all'elaborazione proteolitica che genera frammenti cardioattivi situati nella regione N-terminale, come VS1 e Cts.

Infine, sulla base delle determinazioni plasmatiche effettuate, è ipotizzabile che la somministrazione di CgA esogena non modifichi la produzione di CgA endogena, escludendo così la possibilità di un feedback tra CgA esogena ed endogena. I livelli plasmatici di CgA endogena nel gruppo controllo e nel gruppo CgA rimangono nel range fisiologico supportando fortemente la conclusione secondo la quale la cardioprotezione indotta dalla CgA contro il danno da Doxo è di per sé dovuta solo alla somministrazione della proteina esogena.

Se questo succede anche nei pazienti che sono sottoposti al trattamento con Doxo, il monitoraggio dei livelli di CgA circolante e dei suoi frammenti potrebbero rappresentare dei marker importanti da controllare per valutare il rischio di insorgenza della cardiotoxicità indotta da Doxo. Pertanto, gli studi mirano ad analizzare i livelli plasmatici della CgA nei pazienti prima, durante e dopo la chemioterapia per valutarne l'associazione con l'insorgenza e la progressione della cardiotoxicità.

CgA e tumori

Infine, i risultati degli studi condotti su modelli murini hanno dimostrato che l'attività antitumorale della Doxo non viene inibita dalla CgA, suggerendo che l'attività antitumorale e gli effetti cardiotossici della Doxo sono eventi indipendenti e che solo questi ultimi sono contrastati dalla CgA. Pertanto, la somministrazione della CgA esogena ai pazienti con livelli di CgA relativamente bassi potrebbe rappresentare un nuovo approccio per prevenire eventi avversi di cardiotoxicità indotta da Doxo senza alterare i suoi effetti antitumorali, per esempio in pazienti con carcinoma mammario, sarcoma di Kaposi, o linfoma.

Alla luce di questi dati, devono essere eseguiti ulteriori studi sull'appropriata farmacocinetica e farmacodinamica della proteina al fine di definire l'ottimale dose e la giusta modalità di somministrazione della CgA. I risultati ottenuti in questo studio indicano un nuovo ruolo cardioprotettivo di questa proteina nei confronti della cardiotossicità indotta dal trattamento con Doxo. Il monitoraggio dei livelli plasmatici di CgA e dei suoi frammenti prima e dopo la chemioterapia nei pazienti con cancro potrebbe fornire quindi importanti informazioni prognostiche relative alla cardiotossicità del farmaco. Inoltre, la somministrazione esogena della CgA nei i pazienti potrebbe rappresentare una nuova strategia farmacologica per limitare il danno cardiaco tipicamente associato alla terapia con antracicline, in particolare nei pazienti con ridotti livelli plasmatici di CgA.

Conclusione

Un numero crescente di prove sperimentali descrive i molteplici ruoli clinici e le implicazioni fisiopatologiche della CgA. Dai risultati ottenuti si evince come la CgA sia in grado di esercitare effetti cardioprotettivi nel trattamento con Doxo, un potente agente chemioterapico usato per il trattamento di una vasta varietà di tumori. La Doxo è un agente chemioterapico che tratta in modo efficace una malattia mortale, ma i suoi numerosi effetti collaterali, primo fra tutti la cardiotossicità, fanno pensare a delle soluzioni efficaci da utilizzare per contrastare e ridurre questo problema.

In questo studio, è stato dimostrato per la prima volta che la CgA *full length* è in grado di esercitare un rilevante effetto cardioprotettivo in caso di compromissione cardiaca, sia quella indotta dal danno ischemico (mediante riduzione dell'area d'infarto e recupero dei parametri cardiaci dopo protocolli di I/R) che quella indotta dal trattamento con Doxo.

La protezione cardiaca della CgA sembra essere mediata da una down-regolazione dei processi infiammatori sia sistemici che a livello cardiaco, dalla riduzione dei ROS plasmatici e intracardiaci, mediante l'attivazione di chinasi di sopravvivenza di pathway cardioprotettivi, quali RISK e SAFE, e mediante la riduzione dell'apoptosi.

Inoltre, si è dimostrato come la Doxo sia in grado di ridurre i livelli circolanti della CgA endogena nel sangue dei ratti (cioè di un potenziale fattore protettivo) e che il ripristino dei valori di CgA mediante somministrazione esogena del peptide sia in grado di prevenire la cardiotossicità indotta da Doxo.

Questi dati, insieme all'osservazione che la CgA esogena non compromette l'attività antitumorale della Doxo in vari modelli murini di tumore, rappresentano un punto di partenza per ulteriori indagini in pazienti oncologici mirati a valutare i livelli circolanti della CgA prima, durante e dopo la terapia con Doxo. La somministrazione della CgA esogena potrebbe rappresentare un importante biomarker da monitorare per prevedere l'insorgenza della cardiotossicità in pazienti che presentano un'alterazione dei livelli circolanti della proteina, ed inoltre potrebbe essere utilizzata come terapia di supporto per limitare o prevenire la cardiotossicità Doxo-dipendente.

Questi risultati offrono la concreta possibilità di poter utilizzare la CgA come biomarker fisiologico per monitorare la cardiotossicità dipendente dal trattamento con Doxo. Inoltre, la CgA potrebbe supportare la terapia con Doxo prolungando il tempo di trattamento e proteggendo il cuore dagli effetti collaterali indotti dalla Doxo.

Bibliografia

- Aardal S, Helle KB. The vasoinhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. *Regul Pept.*, 1992, 41,9-18
- Abdel-Daim MM, Moustafa YM, Umezawa M, Ramana KV, Azzini E. Applications of Antioxidants in Ameliorating Drugs and Xenobiotics Toxicity: Mechanistic Approach. *Oxid Med Cell Longev.* 2017, 2017, 4565127
- Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, Rouis M. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 2015, 4, 296–307
- Abushouk AI, Ismail A, Salem AMA, Afifi AM, Abdel-Daim MM. Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2017, 90, 935-946
- Abushouk AI, Salem AMA, Saad A, Afifi AM, Afify AY, Afify H, Salem HSE, Ghanem E, Abdel-Daim MM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: Potential Mechanisms, Governing Factors, and Implications of the Heart Stem Cell Debate. *Front Pharmacol.* 2019, 14, 10:635
- Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin Oncol.* 1992,19: 529–42
- Angelone T, Quintieri AM, Brar BK, Limchaiyawat PT, Tota B, Mahata SK, Cerra MC. The antihypertensive chromogranin a peptide catestatin acts as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac inotropism and lusitropism. *Endocrinology.* 2008, 149, 4780–4793
- Angelone T, Mazza R, Cerra MC. Chromogranin-A: a multifaceted cardiovascular role in health and disease. *Curr. Med. Chem.* 2012, 19, 4042–4050
- Armstrong GT, Chen Y, Yasui Y, Leisenring W, Gibson TM, Mertens AC, Stovall M, Oeffinger KC, Bhatia S, Krull KR, Nathan PC, Neglia JP, Green DM, Hudson MM, Robison LL. Reduction in late mortality among 5-year survivors of childhood cancer. *N Engl J Med.* 2016, 374, 833–42
- Aslam R, Marban C, Corazzol C, Jehl F, Delalande F, Van Dorsselaer A, Pre´vost G, Hai´kel Y, Taddei C, Schneider F, Metz-Boutigue MH. Cateslytin, a chromogranin A derived peptide is active against *Staphylococcus aureus* and resistant to degradation by its proteases. *PLoS ONE.* 2013, 8, e68993
- Aung G, Niyonsaba F, Ushio H, Kajiwara N, Saito H, Ikeda S, Ogawa H, Okumura K. Catestatin, a neuroendocrine antimicrobial peptide, induces human mast cell migration, degranulation and production of cytokines and chemokines. *Immunology.* 2011, 132, 527–539.
- Banks P, Helle K. The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem. J.* 1965, 97, 40C-41C
- Barry E, Alvarez JA, Scully RE, Miller TL, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert Opin Pharmacother.* 2007, 8(8), 1039-58
- Bartolomucci A, Pasinetti GM, Salton SR. Granins as diseasebiomarkers: translational potential for psychiatric and neurological disorders. *Neuroscience.* 2010, 170, 289–297
- Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SR. The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr. Rev.* 2011, 32, 755–797

- Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, Van der Vijgh WJ. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol.* 2007, 7, 154–159
- Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011, 50(6), 940-50
- Belli SH, Oneto A, Aranda C, O'Connor JM, Domenichini E, Roca E, Me'ndez G, Bestani MC, Parma P, Giacomi N, Marmissolle F. Chromogranin A as a biochemical marker for the management of neuroendocrine tumors: a multicenter study developed in Argentina. *Acta Gastr.* 2009, 39, 184–189
- Belloni D, Scabini S, Foglieni C, Veschini L, Giazzon A, Colombo B, Fulgenzi A, Helle KB, Ferrero ME, Corti A et al. The vasostatin-I fragment of chromogranin A inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *FASEB Journal.* 2007, 21, 3052–3062
- Biancianiello T, Meyer RA, Wong KY, Sager C, Kaplan S. Doxorubicin cardiotoxicity in children. *J Pediatr.* 1980, 97, 45–50
- Bien S, Riad A, Ritter CA, Gratz M, Olshausen F, Westermann D, Grube M, Krieg T, Ciecholewski S, Felix SB, Staudt A, Schultheiss HP, Ewert R, Volker U, Tschöpe C, Kroemer HK. The endothelin receptor blocker bosentan inhibits doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cancer Res.* 2007, 67, 10428–10435
- Billingham M, Bristow M. Evaluation of anthracycline cardiotoxicity: predictive ability and functional correlation of endomyocardial biopsy. *Cancer Treat Symp.* 1984, 71–6
- Biswas N, Curello E, O'Connor DT, Mahata SK. Chromogranin/secretogranin proteins in murine heart: myocardial production of chromogranin A fragment catestatin (Chga(364-384)). *Cell. Tissue Res.* 2010, 342, 353-61
- Biswas N, Gayen J, Mahata M, Su Y, Mahata SK, O'Connor DT. Novel peptide isomer strategy for stable inhibition of catecholamine release: application to hypertension. *Hypertension.* 2012, 60, 1552–1559
- Bolli R, Stein AB, Guo Y, Wang OL, Rokosh G, Dawn B, Molkentin JD, Sanganalmath SK, Zhu Y, Xuan YT. A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 2011, 50, 589–597
- Bonz A, Laser M, Kullmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, Ertl G, Wagner JA. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003, 41, 657–664
- Borst SE, Quindry JC, Yarrow JF, Conover CF, Powers SK. Testosterone administration induces protection against global myocardial ischemia. *Horm Metab Res.* 2010, 42(2), 122-9
- Bruynzeel AM, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Hoeven JJ, Berkhof J, Bast A, van der Vijgh WJ, van Groenigen CJ. The effect of monohydroxyethylrutoside on doxorubicin-induced cardiotoxicity in patients treated for metastatic cancer in a phase II study. *Br J Cancer.* 2007, 97, 1084–1089
- Bugger H, Guzman C, Zechner C, Palmeri M, Russell KS, Russell RR 3rd. Uncoupling protein downregulation in doxorubicin-induced heart failure improves mitochondrial coupling but increases reactive oxygen species generation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011, 67, 1381–8

- Cappello S, Angelone T, Tota B, Pagliaro P, Penna C, Rastaldo R, Corti A, Losano G, Cerra MC. Human recombinant chromogranin A-derived vasostatin-1 mimics preconditioning via an adenosine/nitric oxide signaling mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007, 293, H719-727
- Capranico G, Tinelli S, Austin CA, Fisher ML, Zunino F. Different patterns of gene expression of topoisomerase II isoforms in differentiated tissues during murine development. *Biochim Biophys Acta.* 1992, 1132, 43–8
- Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G, Civelli M, Peccatori F, Martinelli G, Fiorentini C, Cipolla CM. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation.* 2004, 109, 2749–54
- Ceconi C, Ferrari R, Bachetti T, Opasich C, Volterrani M, Colombo B, Parrinello G, Corti A. Chromogranin A in heart failure. A novel neurohumoral factor and a predictor of mortality. *Eur. Heart J.* 2002, 23, 967-974
- Cerra MC, De Iuri L, Angelone T, Corti A, Tota B. Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 2006, 101, 43–52
- Cerra MC, Gallo MP, Angelone T, Quintieri AM, Pulerà E, Filice E, Guérolde B, Shooshtarizadeh P, Levi R, Ramella R, Brero A, Boero O, Metz-Boutigue MH, Tota B, Alloatti G. The homologous rat chromogranin A1-64 (rCGA1-64) modulates myocardial and coronary function in rat heart to counteract adrenergic stimulation indirectly via endothelium-derived nitric oxide. *FASEB J.* 2008, 22, 3992-4004
- Chassany O, Urien S, Claudepierre P, Bastian G, Tillement JP. Comparative serum protein binding of anthracycline derivatives. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996, 38, 571–573
- Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology.* 2010, 115, 155–162
- Chen Y, Rao F, Wen G, Gayen JR, Zhang K, Vaingankar SM, Biswas N, Mahata M, Friese RS, Fung MM, Salem RM, Nievergelt C, Bhatnagar V, Hook VY, Ziegler MG, Mahata SK, Hamilton BA, O'Connor DT. Naturally occurring genetic variants in human chromogranin A (CHGA) associated with hypertension as well as hypertensive renal disease. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 2010, 30, 1395–1400
- Chihara D, Westin JR, Oki Y, Ahmed MA, Do B, Fayad LE, Hagemester FB, Romaguera JE, Fanale MA, Lee HJ, Turturro F, Samaniego F, Neelapu SS, Rodriguez MA, Fowler NH, Wang M, Davis RE, Nastoupil LJ. Management strategies and outcomes for very elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer.* 2016, 122(20), 3145-3151
- Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Cancer Res.* 2002, 62, 4592–4598
- Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Zwiller J, Revel MO, Aunis D, Bader MF. Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. *Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276, 13113–13120

- Conlon JM. Granin-derived peptides as diagnostic and prognostic markers for endocrine tumors. *Regulatory Peptides*. 2010, 165, 5–11
- Corti A, Mannarino C, Mazza R, Angelone T, Longhi R, Tota B. Chromogranin A N-terminal fragments vasostatin-1 and the synthetic CGA 7-57 peptide act as cardiostatins on the isolated working frog heart. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004, 136, 217-224
- Corti A, Marcucci F, Bachetti T. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch.* 2018, 470, 199–210
- Curnis F, Dallatomasina A, Bianco M, Gasparri A, Sacchi A, Colombo B, Fiocchi M, Perani L, Venturini M, Tacchetti C, Sen S, Borges R, Dondossola E, Esposito A, Mahata SK, Corti A. Regulation of tumor growth by circulating full-length chromogranin A. *Oncotarget*. 2016, 7, 72716–72732
- Curnis F, Gasparri AM, Longhi R, Colombo B, D'Alessio S, Pastorino F, Ponzoni M, Corti A. Chromogranin A binds to $\alpha\beta6$ -integrin and promotes wound healing in mice. *Cell Mol Life Sci.* 2012, 69(16), 2791–2801
- D'amico MA, Ghinassi B, Izzicupo P, Manzoli L, Di Baldassarre A. Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides. *Endocr Connect.* 2014, 3(2), R45-54
- Das A, Durrant D, Salloum FN, Xi L, Kukreja RC. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer. *Pharmacol Ther.* 2015, 147, 12–21
- Davies KJ, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1986, 261, 3060–3067
- Dev NB, Gayen JR, O'Connor DT, Mahata SK. Chromogranin a and the autonomic system: decomposition of heart rate variability and rescue by its catestatin fragment. *Endocrinology.* 2010, 151(6), 2760-8
- Di Comite G, Marinosci A, Di Matteo P, Manfredi A, Rovere-Querini P, Baldissera E, Aiello P, Corti A & Sabbadini MG. Neuroendocrine modulation induced by selective blockade of TNF- α in rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006, 1069, 428–437
- Di'az Pe'rez JA, Curra's Freixes M. Chromogranin A and neuroendocrine tumors. *Endocrin Nutr.* 2013, 60, 386–395
- Dirks-Naylor AJ, Tran NT, Yang S, Mabololo R, Kouzi SA. The effects of acute doxorubicin treatment on proteome lysine acetylationstatus and apical caspases inskeletal muscle of fasted animals. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2013, 4, 239–243
- Doroshov JH, Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem.* 1986, 261, 3068–3074
- Doroshov JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res.* 1983, 43, 460–72
- Drake FH, Zimmerman JP, McCabe FL, Bartus HF, Per SR, Sullivan DM, Ross WE, Mattern MR, Johnson RK, Crooke ST, Mirabelli CK. Purification of topoisomerase II from amsacrineresistant P388 leukemia cells. Evidence for two forms of the enzyme. *J Biol Chem.* 1987, 262, 16739–47

- Dresdale AR, Barr LH, Bonow RO, Mathisen DJ, Myers CE, Schwartz DE, D'Angelo T, Rosenberg SA. Prospective randomized study of the role of N-acetyl cysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Clin Oncol.* 1982, 5, 657–63
- Duque M, Modlin IM, Gupta A, Saif MW. Biomarkers in neuroendocrine tumors. *Journal of Pancreas.* 2013, 14, 372–376
- Egger M, Beer AG, Theurl M, Schgoer W, Hotter B, Tatarczyk T, Vasiljevic D, Frauscher S, Marksteiner J, Patsch JR, Schratzberger P, Djanani AM, Mahata SK, Kirchmair R. Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin. *European Journal of Pharmacology.* 2008, 598, 104–111
- Eiden LE. Is chromogranin a prohormone? *Nature.* 1987, 325, 301
- Engert A, Josting A, Haverkamp H, Villalobos M, Lohri A, Sökler M, Zijlstra J, Sturm I, Topp MS, Rank A, Zenz T, Vogelhuber M, Nogova L, Borchmann P, Fuchs M, Flechtner HH, Diehl V. Epoetin alfa in patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: results of the randomized placebo-controlled GHSG HD15EPO trial. *J Clin Oncol.* 2010, 28, 2239–45
- Estensen ME, Hognestad A, Syversen U, Squire I, Ng L, Kjekshus J, Dickstein K, Omland T. Prognostic value of plasma chromogranin A levels in patients with complicated myocardial infarction. *Am Heart J.* 2006, 152(5), 927.e1-6
- Ewer MS, Ali MK, Mackay B, Wallace S, Valdivieso M, Legha SS, Benjamin RS, Haynie TP. A comparison of cardiac biopsy grades and ejection fraction estimations in patients receiving adriamycin. *J Clin Oncol.* 1984, 2, 112–7
- Ferrero E, Magni E, Curnis F, Villa A, Ferrero ME, Corti A. Regulation of endothelial cell shape and barrier function by chromogranin A. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 971, 355-8
- Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol.* 2005, 23, 7685–7696
- Fraser H, Davidge ST, Clanachan AS. Enhancement of post-ischemic myocardial function by chronic 17 beta -estradiol treatment: role of alterations in glucose metabolism. *J Mol Cell Cardiol.* 1999, 31(8),1539-49
- Friese RS, Gayen JR, Mahapatra NR, Schmid-Schoñbein GW, O'Connor DT & Mahata SK. Global metabolic consequences of the chromogranin A-null model of hypertension: transcriptomic detection, pathway identification, and experimental verification. *Physiological Genomics.* 2010, 40, 195–207
- Ganz PA, Hussey MA, Moinpour CM, Unger JM, Hutchins LF, Dakhil SR, Giguere JK, Goodwin JW, Martino S, Albain KS. Late cardiac effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer survivors treated on Southwest Oncology Group protocol s8897. *J Clin Oncol.* 2008, 26, 1223–1230
- Ganz WI, Sridhar KS, Ganz SS, Gonzalez R, Chakko S, Serafini A. Review of tests for monitoring doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Oncology.* 1996, 53, 461–470
- Gayen JR, Gu Y, O'Connor DT, Mahata SK. Global disturbances in autonomic function yield cardiovascular instability and hypertension in the chromogranin a null mouse. *Endocrinology.* 2009, 150, 5027-5035
- Geenen MM, Cardous-Ubbink MC, Kremer LC, van den Bos C, van der Pal HJ, Heinen RC, Jaspers MW, Koning CC, Oldenburger F, Langeveld NE, Hart AA, Bakker PJ,

- Caron HN, van Leeuwen FE. Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA*. 2007, 297, 2705–2715
- Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 3777–3784
 - Giordano SH, Lin YL, Kuo YF, Hortobagyi GN, Goodwin JS. Decline in the use of anthracyclines for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012, 30, 2232–9
 - Giovinazzo F, Schimmack S, Svejda B, Alaimo D, Pfragner R, Modlin I, Kidd M. Chromogranin a and its fragments as regulators of small intestinal neuroendocrine neoplasm proliferation. *PLoS ONE*. 2013, 8, e81111
 - Glattard E, Angelone T, Strub JM, Corti A, Aunis D, Tota B, Metz-Boutigue MH, Goumon Y. Characterization of natural vasostatin-containing peptides in rat heart. *FEBS Journal*. 2006, 273, 3311–3321
 - Godoy LY, Fukushige J, Igarashi H, Matsuzaki A, Ueda K. Anthracycline-induced cardiotoxicity in children with malignancies. *Acta Paediatr Jpn.* 1997, 39, 188–93
 - Goetze JP, Alehagen U, Flyvbjerg A, Rehfeld JF. Chromogranin A as a biomarker in cardiovascular disease. *Biomarkers Med.* 2014, 8, 133–140
 - Guo X, Zhou C, Sun N. The neuropeptide catestatin promotes vascular smooth muscle cell proliferation through the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II–NFAT signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, 407, 807–812
 - Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2007, 292, C45–C51
 - Ha T, Lu C, Liu L, Hua F, Hu Y, Kelley J, Singh K, Kao RL, Kalbfleisch J, Williams DL, Gao X, Li C. TLR2 ligands attenuate cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis via a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010, 298(3), H984-91
 - Hasinoff BB, Patel D, Wu X. The oral iron chelator ICL670A (deferasirox) does not protect myocytes against doxorubicin. *Free Radic Biol Med.* 2003, 35, 1469–79
 - Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc Med.* 2005, 15, 69–75
 - Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 2004, 61, 448–460
 - Helle KB, Aunis D. A physiological role for the granins as prohormones for homeostatically important regulatory peptides? A working hypothesis for future research *Advanced Experimental Medical Biology*. 2000, 482, 389–397
 - Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH, Tota B. The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life Sci.* 2007, 65(22), 2863–2886
 - Herman EH, Zhang J, Lipshultz SE, Rifai N, Chadwick D, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ. Correlation between serum levels of cardiac troponin-T and the severity of the chronic cardiomyopathy induced by doxorubicin. *J. Clin. Oncol.* 1999, 17, 2237–2243

- Hershman DL, McBride RB, Eisenberger A, Tsai WY, Grann VR, Jacobson JS. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008, 26, 3159–65
- Heusch G. Cardioprotection: chances and challenges of its translation to the clinic. *Lancet*. 2013, 381,166–175
- Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res*. 2015, 116(4), 674-99
- Heusch G. Postconditioning: old wine in a new bottle? *J Am Coll Cardiol*. 2004, 44, 1111–1112
- Hudson MM, Ness KK, Gurney JG, Mulrooney DA, Chemaitilly W, Krull KR, Green DM, Armstrong GT, Nottage KA, Jones KE, Sklar CA, Srivastava DK, Robison LL. Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. *JAMA*. 2013, 309,2371–2381
- Huffman LC, Koch SE, Butler KL. Coronary effluent from a preconditioned heart activates the JAK-STAT pathway and induces cardioprotection in a donor heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008, 294, H257–H262
- Ichikawa Y, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, Mutharasan RK, Naik TJ, Ardehali H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J. Clin. Invest*. 2014, 124, 617–630
- Imbrogno S, Angelone T, Corti A, Adamo C, Helle KB, Tota B. Influence of vasostatsins, the chromogranin A-derived peptides, on the working heart of the eel (*Anguilla anguilla*): negative inotropy and mechanism of action. *General and Comparative Endocrinology*. 2004, 139, 20–28
- Ito N, Matsuda T, Kakehi Y, Takeuchi E, Takahashi T, Yoshida O. Bladder cancer producing granulocyte colony-stimulating factor. *N Engl J Med*. 1990, 323(24),1709-10
- Ivanova M, Dovinova I, Okruhlicova L, Tribulova N, Simoncikova P, Bartekova M, Vlkovicova J, Barancik M. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2012, 33, 459–469
- Jaenke RS. An anthracycline antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits. *Lab Investig*. 1974, 30, 292–304
- Jain D. Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *J Nucl Cardiol*. 2000, 7, 53–62
- Jansson AM, Røsjø H, Omland T, Karlsson T, Hartford M, Flyvbjerg A, Caidahl K. Prognostic value of circulating chromogranin A levels in acute coronary syndromes. *European Heart Journal*. 2009, 30, 25–32
- Jensen BV. Cardiotoxic consequences of anthracycline-containing therapy in patients with breast cancer. *Semin Oncol*. 2006, 33, S15–S21
- Joerger M, Huitema AD, Meenhorst PL, Schellens JH, Beijnen JH. Pharmacokinetics of low-dose doxorubicin and metabolites in patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005, 55,488–496
- Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates

- convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 2004, 113,1535–1549
- Kamboh MI. Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Annals of Human Genetics.* 2004, 68, 381–404
 - Kelleni MT, Amin EF, Abdelrahman AM. Effect of Metformin and Sitagliptin on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats: Impact of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *J Toxicol.* 2015, 424813
 - Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp. Mol. Med.* 2016, 48, e224
 - Koshimizu H, Cawley NX, Kim T, Yergey AL, Loh YP. Serpinin: a novel chromogranin a-derived, secreted Peptide up-regulates protease nexin-1 expression and granule biogenesis in endocrine cells. *Mol. Endocrinol.*, 2011, 25,732-744
 - Kouvaraki MA, Ajani JA, Hoff P, Wolff R, Evans DB, Lozano R, Yao JC. Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with advanced and metastatic pancreatic neuroendocrine carcinomas. *Journal of Clinical Oncology.* 2004, 22, 4762–4771
 - Kukreja RC. Sildenafil and cardioprotection. *Curr Pharm Des.* 2013, 19, 6842–6847
 - Kumar D, Kirshenbaum LA, Li T, Danelisen I, Singal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. *Antioxid Redox Signal.* 2001, 3, 135–145
 - Kundu TK, Velayutham M, Zweier JL. Aldehyde oxidase functions as a superoxide generating NADH oxidase: an important redox regulated pathway of cellular oxygen radical formation. *Biochemistry.* 2012, 51, 2930–2939
 - Lande'n M, Davidsson P, Gottfries CG, Grenfeldt B, Stridsberg M, Blennow K. Reduction of the small synaptic vesicle protein synaptophysin but not the large dense core chromogranins in the left thalamus of subjects with schizophrenia. *Biological Psychiatry.* 1999 ,46, 1698–1702
 - Lanzarini L, Bossi G, Laudisa ML, Klersy C, Arico M. Lack of clinically significant cardiac dysfunction during intermediate dobutamine doses in long-term childhood cancer survivors exposed to anthracyclines. *Am Heart J.* 2000, 140, 315–23
 - Lebrecht D, Geist A, Ketelsen UP, Haberstroh J, Setzer B, Walker UA. Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats. *Br J Pharmacol.* 2007, 151, 771–778
 - Lechner T, Adlassnig C, Humpel C, Kaufmann WA, Maier H, Reinstadler-Kramer K, Hinterholz J, Mahata SK, Jellinger KA, Marksteiner J. Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology.* 2004, 39, 101–113
 - Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer.* 1973, 32, 302–14
 - Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, Rasmussen SL, Blumenschein GR, Freireich EJ. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann. Intern. Med.* 1982, 96, 133–139
 - Legssyer AK, Hove-Madsen L, Hoerter J, Fischmeister R. Sympathetic modulation of the effect of nifedipine on myocardial contraction and Ca current in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1997, 29(2), 579-91

- Leung LK, Wang TT. Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1999, Volume 55, Issue 1, pp 73–83
- Link G, Tirosh R, Pinson A, et al. Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *J Lab Clin Med*. 1996,127, 272–8
- Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AR, Sallan SE, Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 1991, 324, 808–815
- Lipshultz SE, Giantris AL, Lipsitz SR, Kimball Dalton V, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Gelber RD, Sallan SE, Colan SD. Doxorubicin administration by continuous infusion is not cardioprotective: the Dana-Farber 91-01 Acute Lymphoblastic Leukemia protocol. *J Clin Oncol*. 2002, 20, 1677–1682
- Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, Orav EJ, Gelber RD, Colan SD. Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med*. 1995, 332,1738–43
- Lipshultz SE, Miller TL, Lipsitz SR, Neuberg DS, Dahlberg SE, Colan SD, Silverman LB, Henkel JM, Franco VI, Cushman LL, Asselin BL, Clavell LA, Athale U, Michon B, Laverdiere C, Schorin MA, Larsen E, Usmani N, Sallan SE. Continuous versus bolus infusion of doxorubicin in children with ALL: long-term cardiac outcomes. *Pediatrics*. 2012, 130, 1003–1011
- Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84, 7024–7
- Loh YP, Cheng Y, Mahata SK, Corti A, Tota B. Chromogranin A and derived peptides in health and disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2012, 48, 347–356
- Lu D, Liu J, Jiao J, Long B, Li Q, Tan W, Li P. Transcription factor Foxo3a prevents apoptosis by regulating calcium through the apoptosis repressor with caspase recruitment domain. *J. Biol. Chem*. 2013, 288, 8491–8504
- Machado V, Cabral A, Monteiro P, Goncalves L, Providencia LA. Carvedilol as a protector against the cardiotoxicity induced by anthracyclines (doxorubicin). *Rev Port Cardiol*. 2008; 27, 1277–1296
- Mancuso L, Mancuso A, Scordato F, Pieri M, Valerio MC. Malignancy and radiation-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2011, 11(2), 102-8
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*. 1993, 88, 1264–1272
- Massironi S, Conte D, Sciola V, Spampatti MP, Ciafardini C, Valenti L, Rossi RE & Peracchi M. Plasma chromograninA response to octreotide test: prognostic value for clinical outcome in endocrine digestive tumors. *American Journal of Gastroenterology*. 2010, 105, 2072–2078
- Mastrocola R, Penna C, Tullio F, Femminò S, Nigro D, Chiazza F, Serpe L, Collotta D, Alloatti G, Cocco M, Bertinaria M, Pagliaro P, Aragno M, Collino M. Pharmacological Inhibition of NLRP3 Inflammasome Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion

- Injury by Activation of RISK and Mitochondrial Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, 2016, 527-1251
- Mazza R, Imbrogno S, Tota B. The interplay between chromogranin A-derived peptides and cardiac natriuretic peptides in cardioprotection against catecholamine-evoked stress. *Regulatory Peptides.* 2010, 165, 86–94
 - McGowan JV, Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017, 31(1):63-75
 - Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R, Aunis D. Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 1993, 217, 247-257
 - Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 2004, 56, 185–229
 - Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2016, 10, 17–24
 - Mukhopadhyay P, Batkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Hasko G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol.* 2007, 50, 528–536
 - Mukhopadhyay P, Batkai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Hasko G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol.* 2007, 50, 528–536
 - Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., B'atkai, S., Kashiwaya, Y., Hask'ó, G., Liaudet, L., Szab'ó,C., and Pacher,P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2009, 296, H1466–H1483
 - Nabhan C, Byrtek M, Rai A, Dawson K, Zhou X, Link BK, Friedberg JW, Zelenetz AD, Maurer MJ, Cerhan JR, Flowers CR. Disease characteristics, treatment patterns, prognosis, outcomes and lymphoma-related mortality in elderly follicular lymphoma in the United States. *Br J Haematol.* 2015, 170, 85–95
 - Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol. Res.* 2000, 41, 283–289
 - Nastainczyk W, Grabsch H, Schneider T. Immunodetection of alpha1E voltage-gated Ca(2+) channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 2000, 48, 807-819
 - Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Weiss TS, Schmidl C, Büttner R, Bollheimer C, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, 350(3), 731-5
 - Nicolay K, Fok JJ, Voorhout W, Post JA, de Kruijff B. Cytofluorescence detection of adriamycin-mitochondria interactions in isolated, perfused rat heart. *Biochim Biophys Acta.* 1986, 887, 35–41

- Nishimura Y, Kondo C, Morikawa Y, Tonomura Y, Torii M, Yamate J, Uehara T. Plasma miR-208 as a useful biomarker for drug-induced cardiotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 2012, 35, 173–180
- Nitobe J, Yamaguchi S, Okuyama M, Nozaki N, Sata M, Miyamoto T, et al. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2003, 57, 119–28
- Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Hoekstra R, De Herder WW, Bouillon R, Lamberts SW. A comparison between the diagnostic value of the measurement of gonadotropins, α -subunits and chromogranin A and their response to TRH in clinically non-functioning, α -subunit secreting and gonadotroph pituitary adenoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1993, 77, 784–789
- O'Connor DT, Cadman PE, Smiley C, Salem RM, Rao F, Smith J, Funk SD, Mahata SK, Mahata M, Wen G et al. Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism *in vivo*, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2005, 90, 5414–5425
- O'Connor DT, Kailasam MT, Kennedy BP, Ziegler MG, Yanaihara N, Parmer RJ. Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *Journal of Hypertension.* 2002, 20, 1335–1345
- O'Connor DT, Pandlan MR, Carlton E, Cervenka JH, Hslao RJ. Rapid radioimmunoassay of circulating chromogranin a: *in vitro* stability, exploration of the neuroendocrine character of neoplasia, and assessment of the effects of organ failure. *Clinical Chemistry.* 1989, 35, 1631–1637
- O'Toole D, Grossman A, Gross D, Delle-Fave G, Barkmanova J, O'Connor J, Pape UF, Plockinger U. ENETS consensus guidelines for the standards of care in neuroendocrine tumors: biochemical markers. *Neuroendocrinology.* 2009, 90, 194–202
- O'Connor DT. Chromogranin A: implications for hypertension. *J. Hypertens.,* 1984, 2, S147-150
- O'Connor DT. Plasma chromogranin A. Initial studies in human hypertension. *Hypertension.* 1985, 7,1776-1799
- Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 2012, 52, 1213–1225
- Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R. Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 2010, 87, 406–423
- Pan SS, Bachur NR. Xanthine Oxidase Catalyzed Reductive Cleavage of Anthracycline Antibiotics and Free Radical Formation. *Molecular Pharmacology.* 1980, 17 (1), 95-99
- Panjrath GS, Jain D. Monitoring chemotherapy-induced cardiotoxicity: role of cardiac nuclear imaging. *J Nucl Cardiol.* 2006, 13, 415–426

- Panjrath GS, Patel V, Valdiviezo CI, Narula N, Narula J, Jain D. Potentiation of doxorubicin cardiotoxicity by iron loading in a rodent model. *J Am Coll Cardiol.* 2007, 49, 2457–2464.
- Papewalis C, Kouatchoua C, Ehlers M, Jacobs B, Porwol D, Schinner S, Willenberg HS, Anlauf M, Raffel A, Eisenhofer G, Neumann HP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Schott M. Chromogranin A as potential target for immunotherapy of malignant pheochromocytoma. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011, 335, 69-77
- Pasqua T, Corti A, Gentile S, Pochini L, Bianco M, Metz-Boutigues MH, Cerra MC, Tota B, Angelone T. Full-length human chromogranin-A cardioactivity: myocardial, coronary, and stimulus-induced processing evidence in normotensive and hypertensive male rat hearts. *Endocrinology.* 2013, 154(9), 3353-65
- Pasqua T, Tota B, Penna C, Corti A, Cerra MC, Loh YP, Angelone T. pGlu-serpinin protects the normotensive and hypertensive heart from ischemic injury. *J. Endocrinol.* 2015, 227, 167–178
- Patnaik JL, Byers T, Di Guiseppi C, Dabelea D, Denberg TD. Cardiovascular disease competes with breast cancer as the leading cause of death for older females diagnosed with breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res.* 2011, 13, R64
- Penna C, Alloatti G, Gallo MP, Cerra MC, Levi R, Tullio F, Bassino E, Dolgetta S, Mahata SK, Tota B, Pagliaro P. Catestatin improves post-ischemic left ventricular function and decreases ischemia/reperfusion injury in heart. *Cell Mol Neurobiol.* 2010, 30(8), 1171-9
- Penna C, Pasqua T, Amelio D, Perrelli MG, Angotti C, Tullio F, Mahata SK, Tota B, Pagliaro P, Cerra MC, Angelone T. Catestatin increases the expression of anti-apoptotic and pro-angiogenic factors in the post-ischemic hypertrophied heart of SHR. *PLoS One.* 2014, 9(8), e102536
- Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res. Cardiol.* 2006, 101, 180–189
- Penna C, Tullio F, Perrelli MG, Mancardi D, Pagliaro P. Cardioprotection against ischemia/reperfusion injury and chromogranin A-derived peptides. *Curr Med Chem.* 2012, 19(24), 4074-85
- Peracchi M, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C, Massironi S, Conte D. Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *European Journal of Endocrinology.* 2005, 152, 443–448
- Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Sledge GW, Kaufman PA, Hudis CA, Martino S, Gralow JR, Dakhil SR, Ingle JN, Winer EP, Gelmon KA, Gersh BJ, Jaffe AS, Rodeheffer RJ. Cardiac safety analysis of doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 adjuvant breast cancer trial. *J Clin Oncol.* 2008, 26, 1231–8
- Perrelli MG, Tullio F, Angotti C, Cerra MC, Angelone T, Tota B, Alloatti G, Penna C, Pagliaro P. Catestatin reduces myocardial ischaemia/reperfusion injury: involvement of PI3K/Akt, PKCs, mitochondrial KATP channels and ROS signalling. *Pflugers Arch.* 2013, 465(7), 1031-40

- Pieroni M, Corti A, Tota B, Curnis F, Angelone T, Colombo B, Cerra MC, Bellocchi F, Crea F, Maseri A. Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function. *Eur. Heart J.* 2007, 28,1117-1127
- Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1998, 38(2),291-300
- Qi D, Young LH. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart.2015, *Trends Endocrinol Metab.* 2015, 26(8), 422-9
- Rabbi MF, Labis B, Metz-Boutigue MH, Bernstein CN, Ghia JE. Catestatin decreases macrophage function in two mouse models of experimental colitis. *Biochem Pharmacol.* 2014, 89(3), 386-98
- Raghuvanshi R, Kaul A, Bhakuni P, Mishra A, Misra MK. Xanthine oxidase as a marker of myocardial infarction. *Indian J Clin Biochem.* 2007, 22(2), 90-2
- Ramond A, Sartorius E, Mousseau M, Ribuot C, Joyeux-Faure M. Erythropoietin pretreatment protects against acute chemotherapy toxicity in isolated rat hearts. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008, 233, 76–83.
- Rangan CM, Haik S, Faucheux BA, Metz-Boutigue MH, Fierville F, Fuchs JP, Hauw JJ & Aunis D. Different chromogranin immunoreactivity between prion and a-b amyloid plaque. *Neuroreport.* 2003, 14, 755–758.
- Rao F, Wen G, Gayen JR, Das M, Vaingankar SM, Rana BK, Mahata M, Kennedy BP, Salem RM, Stridsberg M, Abel K, Smith DW, Eskin E, Schork NJ, Hamilton BA, Ziegler MG, Mahata SK, O'Connor DT. Catecholamine release inhibitory peptide catestatin (chromograninA352–372): naturally occurring amino acid variant Gly364Ser causes profound changes in human autonomic activity and alters risk for hypertension. *Circulation.* 2007, 115, 2271–2281
- Ratti S, Curnis F, Longhi R, Colombo B, Gasparri A, Magni F, Manera E, Metz-Boutigue MH, Corti A. Structureactivity relationships of chromogranin A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smoothmuscle cells. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 29257–29263
- Reichardt P, Tabone MD, Mora J, Morland B, Jones RL. Risk-benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling. *Future Oncol.* 2018, 14, 2663–2676
- Rimal H, Lee SW, Lee JH, Oh TJ. Understanding of real alternative redox partner of *Streptomyces peucetius* DoxA: prediction and validation using in silico and in vitro analyses. *Arch Biochem Biophys.* 2015, 585, 64–74
- Ryu RJ, Eyal S, Kaplan HG, Akbarzadeh A, Hays K, Puhl K, Easterling TR, Berg SL, Scorsone KA, Feldman EM, Umans JG, Miodovnik M, Hebert MF. Pharmacokinetics of doxorubicin in pregnant women. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014, 73, 789–797
- Saleem Z, Ahmad M, Hashmi FK, Saeed H, Aziz MT. Impairment of liver synthetic function and the production of plasma proteins in primary breast cancer patients on doxorubicincyclophosphamide (AC) protocol. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2016, 29, 1555–1563
- Schrott-Fischer A, Bitsche M, Humpel C, Walcher C, Maier H, Jellinger K, Rabl W, Glueckert R, Marksteiner J. Chromogranin peptides in amyotrophic lateral sclerosis. *Regulatory Peptides.* 2009, 152, 13–21

- Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002, 283, H1481–H1488
- Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med*. 1996, 125, 47–58
- Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z. Mir- 21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res*. 2010, 1352, 255-264
- Silber JH, Jakacki RI, Larsen RL, Goldwein JW, Barber G. Increased risk of cardiac dysfunction after anthracyclines in girls. *Med Pediatr Oncol*. 1993, 21, 477–9
- Simonsen AH, McGuire J, Podust VN, Hagnelius NO, Nilsson TK, Kapaki E, Vassilopoulos D, Waldemar G. A novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the differential diagnosis of Alzheimer’s disease versus normal aging and frontotemporal dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2007, 24, 434–440
- Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep*. 2009, 61(1), 154–171
- Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998, 339, 900–5
- Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol. Cell. Biochem*. 2000, 207, 77–86
- Singal PK, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Thomas TP, Li T. Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 1995, 27, 1055–1063
- Sivaraman V, Mudalagiri NR, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Yap J, Keogh B, Hausenloy DJ, Yellon DM. Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway. *Basic Res Cardiol*. 2007, 102, 453–459
- Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*. 2010, 10, 337
- Sparano JA, Brown DL, Wolff AC. Predicting cancer therapy-induced cardiotoxicity: the role of troponins and other markers. *Drug Saf*. 2002, 25, 301–311
- Steinberg JS, Cohen AJ, Wasserman AG, Cohen P, Ross AM. Acute arrhythmogenicity of doxorubicin administration. *Cancer*. 1987, 60, 1213–1218
- Steiner HJ, Weiler R, Ludescher C, Schmid KW, Winkler H. Chromogranins A and B are co-localized with atrial natriuretic peptides in secretory granules of rat heart. *J. Histochem. Cytochem*. 1990, 38, 845–850
- Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan C. Cardiac failure and dysrhythmias 6–19 years after anthracycline therapy: a series of 15 patients. *Med Pediatr Oncol*. 1995, 24, 352–361
- Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, Heller G, Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA*. 1991, 266, 1672–1677
- Stoddard MF, Seeger J, Liddell NE, Hadley TJ, Sullivan DM, Kupersmith J. Prolongation of isovolumetric relaxation time as assessed by Doppler echocardiography predicts doxorubicin-induced systolic dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1992, 20(1), 62-9

- Stoop MP, Dekker LJ, Titulaer MK, Burgers PC, Sillevs Smitt PA, Luijckx TM, Hintzen RQ. Multiple sclerosis-related proteins identified in cerebrospinal fluid by advanced mass spectrometry. *Proteomics*. 2008, 8, 1576–1585
- Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *J. Endocrinol.* 2003, 177, 337-341
- Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A panel of 11 region-specific radioimmunoassays for measurements of human chromogranin A. *Regul Pept.* 2004, 117(3), 219-27
- Stridsberg M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. *Adv Exp Med Biol.* 2000, 482, 319-27
- Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res.* 2000, 41(6), 613-27
- Swain SM, Vici P. The current and future role of dexrazoxane as a cardioprotectant in anthracycline treatment: expert panel review. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2004, 130, 1–7
- Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003, 97, 2869–79
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Ewer MS, Bianchini JR, Gams RA. Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy. *J Clin Oncol.* 1997, 15, 1333–1340 a
- Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M, Spicer D, Jones SE, Wadler S, Desai A, Vogel C, Speyer J, Mittelman A, Reddy S, Pendergrass K, Velez-Garcia E, Ewer MS, Bianchini JR, Gams RA. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 1997, 15:1318–1332 b
- Swerdlow AJ, Higgins CD, Smith P, Cunningham D, Hancock BW, Horwich A, Hoskin PJ, Lister A, Radford JA, Rohatiner AZ, Linch DC. Myocardial infarction mortality risk after treatment for Hodgkin disease: a collaborative British cohort study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007, 99, 206–214
- Syversen U, Ramstad H, Gamme K, Qvigstad G, Falkmer S & Waldum HL. Clinical significance of elevated serum chromogranin A levels. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2004, 10, 969–973
- Szabó Z, Magga J, Alakoski T, Ulvila J, Piihola J, Vainio L, Kivirikko KI, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Lipson KE, Signore P, Kerkelä R. Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertension.* 2014, 63(6), 1235-40
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 2013, 65(2), 157-70
- Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Maemo N, Aoyama N, Ji X, Miura H, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N, Inada T. Association between chromograninA gene polymorphism and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophrenia Research.* 2006, 83, 179–183

- Tallaj JA, Franco V, Rayburn BK, Pinderski L, Benza RL, Pamboukian S, et al. Response of doxorubicin-induced cardiomyopathy to the current management strategy of heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2005, 24, 2196–201
- Tamareille S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F. RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2011, 106(6),1329-39
- Tan C, Tasaka H, Yu KP, et al. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*. 1967, 20, 333–53
- Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, Geyer CE Jr, Ewer M, Keefe D, Shannon RP, Swain SM, Brown A, Fehrenbacher L, Vogel VG, Seay TE, Rastogi P, Mamounas EP, Wolmark N, Bryant J. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol*. 2005, 23, 7811–9
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The Chromogranin Secretogranin Family. *N. Engl. J. Med*. 2003, 348,1134-1149
- Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA, Constine LS, Mendenhall NP, Spoto R, Chauvenet A, Schwartz CL. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 2007, 25, 493–500
- Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD, Liu LF. Adriamycin induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 1984, 226, 466–8
- Tissier R, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovasc Res*. 2012, 94, 217–225
- Tota B, Angelone T, Cerra MC. The surging role of Chromogranin A in cardiovascular homeostasis. *Front Chem*. 2014, 2, 64 17
- Tota B, Angelone T, Mazza R, Cerra MC. The chromogranin A-derived vasostatin: new players in the endocrine heart. *Current Medicinal Chemistry*. 2008, 15, 1444–1451
- Tota B, Cerra MC, Gattuso A. Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin A: evolution and physiopathology of a 'whip-brake' system of the endocrine heart. *Journal of Experimental Biology*. 2010, 213, 3081–3103
- Tota B, Gentile S, Pasqua T, Bassino E, Koshimizu H, Cawley NX, Cerra MC, Loh YP, Angelone T. The novel chromogranin A-derived serpinin and pyroglutaminated serpinin peptides are positive cardiac b-adrenergic-like inotropes. *FASEB J*. 2012, 26, 2888–2898
- Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*. 2004, 95(3), 230-2
- Vacchi-Suzzi C, Bauer Y, Berridge BR, Bongiovanni S, Gerrish K, Hamadeh HK, Letzkus M, Lyon J, Moggs J, Paules RS, Pognan F, Staedtler F, Vidgeon-Hart MP, Grenet O, Couttet P. Perturbation of microRNAs in rat heart during chronic doxorubicin treatment. *PLoS One*. 2012, 7, e40395

- Valdez LB, Zaobornyj T, Bombicino S, Iglesias DE, Boveris A, Donato M, D'Annunzio V, Buchholz B, Gelpi RJ. Complex I syndrome in myocardial stunning and the effect of adenosine. *Free Radic Biol Med.* 2011, 51(6), 1203-12
- Vedanthan R, Seligman B, Fuster V. Global perspective on acute coronary syndrome: a burden on the young and poor. *Circ Res.* 2014, 114, 1959– 1975
- Vejpongsa P, Yeh ET. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities *J Am Coll Cardiol.* 2014, 64(9), 938-45
- Villani F, Monti E, Piccinini F, Favalli L, Lanza E, Rozza Dionigi A, Poggi P. Relationship between doxorubicin-induced ECG changes and myocardial alterations in rats. *Tumors.* 1986, 72, 323–329
- Viner RM, Hsia Y, Tomsic T, Wong IC. Efficacy and safety of anti-obesity drugs in children and adolescents: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2010, 11, 593–602
- 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, 91, 710–7
- Wand GS, Takiyuddin M, O'Connor DT, Levine MA. A proposed role for chromogranin A as a glucocorticoid-responsive autocrine inhibitor of proopiomelanocortin secretion. *Endocrinology.* 1991, 128, 1345–1351
- Wang L, Chen Q, Qi H, Wang C, Wang C, Zhang J, Dong L. Doxorubicin-induced systemic inflammation is driven by upregulation of toll-like receptor TLR4 and endotoxin leakage. *Cancer Res.* 2016, 76, 6631–6642
- Wardill HR, Mander KA, Van Sebille YZ, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Sonis ST. Cytokine-mediated blood brain barrier disruption as a conduit for cancer/chemotherapy associated neurotoxicity and cognitive dysfunction. *Int. J. Cancer* 2016, 139, 2635–2645
- Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szelag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JI, Fawcett P, Lesnfsky EJ, Larner AC. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science.* 2009, 323, 793–797
- Weiergräbe M, Pereverzev A, Vajna R, Henry M, Schramm M, Nastainczyk W, Grabsch H, Schneider T. Immunodetection of alpha1E voltage-gated Ca(2+) channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney. *J. Histochem. Cytochem.* 2000, 48, 807–819
- Winkler H, Fischer-Colbrie R. The chromogranin A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience.* 1992, 49(3), 497– 528
- Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlöter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeböller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, Nürnberg P, Pfreundschuh M, Trümper L, Brockmöller J, Hasenfuss G. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin induced cardiotoxicity. *Circulation.* 2005, 112, 3754–3762
- Yao JC, Lombard-Bohas C, Baudin E, Kvols LK, Rougier P, Ruzniewski P, Hoosen S, St Peter J, Haas T, Lebwohl D, Van Cutsem E, Kulke MH, Hobday TJ, O'Dorisio TM,

- Shah MH, Cadiot G, Luppi G, Posey JA, Wiedenmann B. Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010, 28, 69–76
- Yee SB, Pritsos CA. Comparison of oxygen radical generation from the reductive activation of doxorubicin, streptonigrin, and menadione by xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997, 347, 235–241
 - Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *J Am Coll Cardiol*. 2009, 53, 2231–47
 - Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007, 357, 1121–1135
 - Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 1996, 98, 1253–1260
 - Yoo SH, Lewis MS. Effects of pH and Ca²⁺ on heterodimer and heterotetramer formation by chromogranin A and chromogranin B. *J Biol Chem*. 1996, 271(29), 17041-6
 - Yuan YP, Ma ZG, Zhang X, Xu SC, Zeng XF, Yang Z, Deng W, Tang QZ. CTRP3 protected against doxorubicin-induced cardiac dysfunction, inflammation and cell death via activation of Sirt1. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2018, 114, 38–47
 - Zhang D, Lavaux T, Sapin R, Lavigne T, Castelain V, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F. Serum concentration of chromogranin A at admission: an early biomarker of severity in critically ill patients. *Annals of Medicine*. 2009, 41, 38–44
 - Zhang J, Cui X, Yan Y, Li M, Yang Y, Wang J, Zhang J. Research progress of cardioprotective agents for prevention of anthracycline cardiotoxicity. *Am. J. Transl. Res.* 2016, 8, 2862–2875
 - 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, 18, 1639–1642
 - Zhao Y, McLaughlin D, Robinson E, Harvey AP, Hookham MB, Shah AM, McDermott BJ, Grieve DJ. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with Doxorubicin chemotherapy. *Cancer Res.* 2010, 70(22), 9287-97
 - Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer Res.* 2001, 61, 771–777
 - Zhu W, Soonpaa MH, Chen H, Shen W, Payne RM, Liechty EA, Caldwell RL, Shou W, Field LJ. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway. *Circulation*. 2009, 119, 99–106