



**SAPIENZA**  
UNIVERSITA' DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA  
SPERIMENTALE  
XXXV CICLO**

**Attivatori naturali dell'autofagia per il  
trattamento della cardiomiopatia indotta da  
chemioterapia**

**DOTTORANDO**

**Daniele Vecchio**

**DOCENTE GUIDA**

**Prof. Sebastiano Sciarretta**

**COORDINATORE DEL DOTTORATO  
Prof. Maurizio Sorice**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

# Indice

<i>Indice</i> .....	<b>2</b>
<b>1</b> <i>Introduzione</i> .....	<b>4</b>
<i>Cardiotossicità indotta da chemioterapici</i> .....	<b>5</b>
<b>1.1</b> <b>Epidemiologia</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2</b> <b>Fisiopatologia</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.1</b> <b>Visione meccanicistica tradizionale dello stress ossidativo antracicli-</b> <b>dipendente</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2.2</b> <b>Nuovi meccanismi molecolari coinvolti nella cardiotossicità indotta da</b> <b>doxorubicina</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2.3</b> <b>Ruolo delle Topoisomerasi</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2.4</b> <b>Percorso di sopravvivenza gp120</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2.5</b> <b>Recettori Toll-like come biosensori dell'infiammazione indotta dalla</b> <b>doxorubicina</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2.6</b> <b>Inibizione AMPK</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b> <i>Autofagia</i> .....	<b>11</b>
<b>2.1</b> <b>Biologia dell'autofagia</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1.1</b> <b>Meccanismi di segnalazione dell'autofagia</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b> <b>Autofagia e danno mitocondriale</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3</b> <b>Autofagia durante cardiomiopatia indotta da doxorubicina</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4</b> <b>Ruolo dei mimetici della restrizione calorica nelle CVD</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5</b> <b>Ruolo del trealosio</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6</b> <b>Il ruolo della spermidina</b> .....	<b>29</b>
<b>3</b> <i>Obiettivi</i> .....	<b>30</b>
<b>4</b> <i>Risultati</i> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b> <b>Gli attivatori naturali dell'autofagia proteggono i topi dalla</b> <b>cardiomiopatia indotta da DOX.</b> .....	<b>31</b>

4.2	Il Trealosio e la spermidina recuperano il flusso autofagico del miocardio nei topi trattati con DOX.....	35
4.3	La somministrazione di trealosio induce la mitofagia a eliminare i mitocondri danneggiati. ....	39
5	<i>Discussione</i> .....	46
5.1	Autofagia e mitofagia nella cardiotoxicità delle antracicline .....	48
6	<i>Conclusioni</i> .....	52
7	<i>Materiali e Metodi</i> .....	53
7.1	Animali.....	53
7.2	Anticorpi.....	53
8.3	Colorazione tricromica di Masson.....	54
8.4	Studi gravimetrici.....	54
8.5	Studi <i>in vivo</i> , ecocardiografia e prelievo di tessuto .....	55
8.6	Valutazione del flusso autofagico .....	56
8.7	Valutazione della biogenesi mitocondriale .....	57
8.8	Valutazione della massa mitocondriale .....	58
8.9	Western Blot.....	59
8	<i>Bibliografia</i> .....	61

# 1 Introduzione

La doxorubicina (DOX) è un farmaco antineoplastico altamente efficace appartenente alla classe delle antracicline. La DOX è usata principalmente per trattare diverse tipologie di carcinoma, nonostante i suoi gravi effetti collaterali. Tra questi, lo sviluppo di cardiomiopatia è relativamente comune, interessando quasi il 30% dei pazienti entro cinque anni dalla chemioterapia in maniera dose-dipendente[1]. Sebbene negli ultimi decenni siano stati proposti diversi modelli molecolari meccanicistici per spiegare la tossicità miocardica, la nostra comprensione di questo fenomeno rimane insufficiente per sviluppare una strategia protettiva fino ad oggi [2].

Negli ultimi anni, i progressi nelle terapie antitumorali hanno portato a un miglioramento dell'aspettativa di vita di diversi tipi di cancro ma hanno anche aumentato la morbilità e la mortalità a causa degli effetti collaterali. Tra questi, le malattie cardiovascolari (CVD) sono tra i più frequenti [3].

Tra gli agenti più cardiotossici vi sono le antracicline come la doxorubicina, l'epirubicina e la daunorubicina, che costituiscono i farmaci chemioterapici più prescritti per il trattamento di una varietà di tumori tra cui quelli solidi e le neoplasie ematologiche [4].

# Cardiotossicità indotta da chemioterapici

## 1.1 Epidemiologia

Più di 32 milioni di persone nel mondo si ammalano di cancro ogni anno.

A seconda della diagnosi di cancro e del tipo di trattamento antitumorale, i tassi di cardiotossicità possono variare dallo 0% al 48% dei pazienti, con l'insufficienza cardiaca come presentazione predominante.

Nei pazienti trattati con dosi di antracicline e di età >65 anni, il tasso di scompenso cardiaco associato può raggiungere il 10%. In particolare, la doxorubicina (antraciclina più prescritta) è associata a un'incidenza del 5% di scompenso cardiaco congestizio quando viene raggiunta una dose cumulativa nel corso della vita minore di 400 mg/m<sup>2</sup>. Dosi più elevate portano a un aumento esponenziale del rischio, fino al 48% a 700 mg/m<sup>2</sup> [5].

## **1.2 Fisiopatologia**

### **1.2.1 Visione meccanicistica tradizionale dello stress ossidativo antraciclino-dipendente**

Il meccanismo fisiopatologico più comunemente proposto per spiegare la cardiotossicità indotta da antracicline è un incremento dello stress ossidativo in seguito a generazione di specie reattive dell'ossigeno, che portano a perossidazione lipidica della membrana cellulare e a disregolazione del calcio, danneggiando i cardiomiociti [3].

L'ingente accumulo mitocondriale di DOX principalmente, a causa della sua capacità di legarsi con elevata affinità alla cardiolipina, spiega la tossicità cardio-selettiva del farmaco, essendo i cardiomiociti dotati di un imponente quantitativo di mitocondri [6].

La struttura chimica della doxorubicina è particolarmente incline alla generazione di radicali liberi poiché la doxorubicina può essere ridotta in modo reversibile a un semichinone, un metabolita instabile il cui ciclo all'interno dei mitocondri rilascia ROS [7].

Un altro meccanismo alla base dello stress ossidativo DOX-dipendente è legato alla capacità del farmaco di interferire direttamente con l'attività della NADPH ossidasi e dell'ossido nitrico sintasi (NOS) causando la formazione di semichinone doxorubicina [7].

Lo stress ossidativo antraciclino-dipendente è stato a lungo associato alla capacità di questi farmaci di chelare il ferro libero, formando così complessi

ferro-doxorubicina che, a loro volta, reagiscono con l'ossigeno e innescano la produzione di ROS [7].

### 1.2.2 Nuovi meccanismi molecolari coinvolti nella cardiotoxicità indotta da doxorubicina

Le alterazioni del metabolismo del ferro e la produzione di ROS spiegano solo in parte la cardiotoxicità iatrogena della doxorubicina, e ciò ha reso necessario l'approfondimento di nuovi meccanismi molecolari alla base degli effetti collaterali cardiaci della chemioterapia (Fig.1)

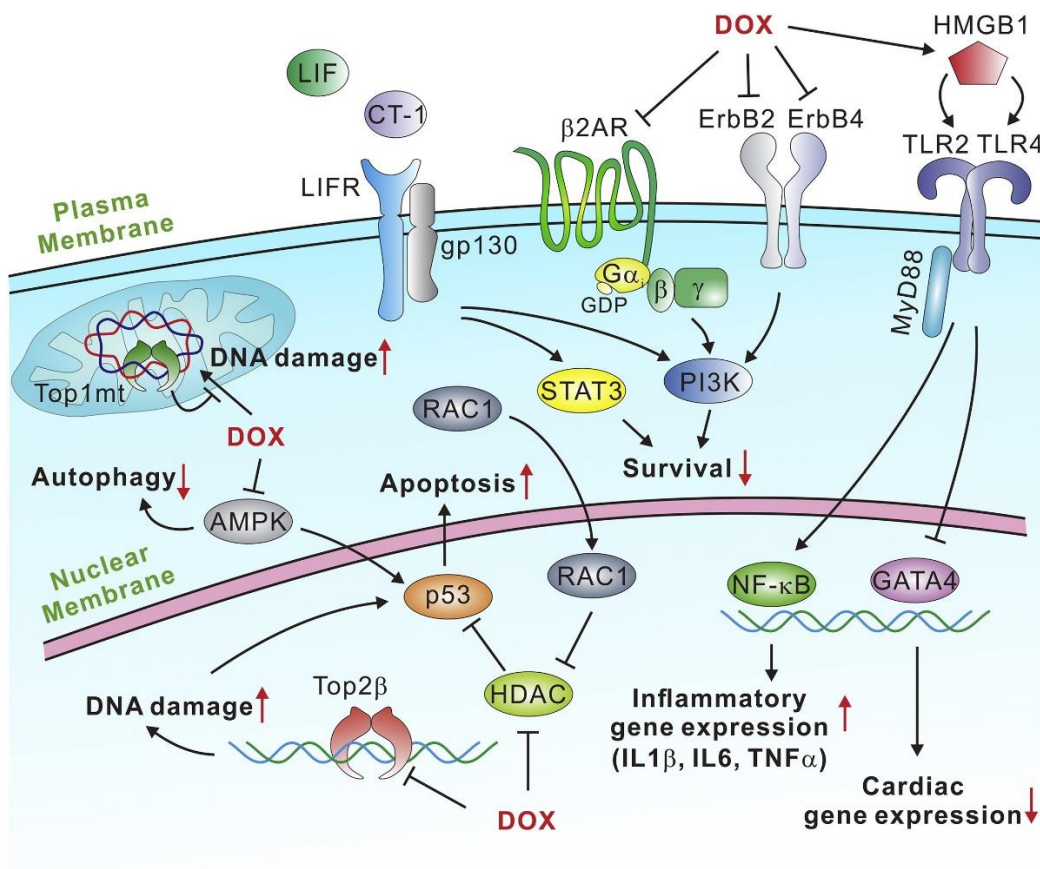


Figura 1. Nuovi meccanismi molecolari coinvolti nella tossicità indotta da DOX [4]

### **1.2.3 Ruolo delle Topoisomerasi**

La prima indicazione che la cardiotossicità indotta dalla doxorubicina non fosse dovuta esclusivamente al ciclo redox della doxorubicina deriva dal lavoro pionieristico di Zhang et al. che identifica un enzima legante il DNA, la topoisomerasi 2 (Top2), come il driver molecolare essenziale degli effetti collaterali iatrogeni delle antracicline. Legandosi a Top2 $\beta$ , isoforma altamente espressa nel miocardio, la DOX provoca la rottura continua del DNA e impedisce la richiusura della doppia elica del DNA. Al contrario, l'isoforma della topoisomerasi mitocondriale, Top1mt, inibisce il danno al DNA mitocondriale indotto dalla DOX. Il danno al DNA DOX-dipendente attiva la via di p53, determinando così l'apoptosi dei cardiomiociti.

### **1.2.4 Percorso di sopravvivenza gp120**

Nell'ultimo decennio, è stato dimostrato che la via di gp130 promuove la resistenza al danno cardiotossico delle antracicline.

L'attivazione di gp130 da parte di LIF (fattore inibitorio della leucemia) ripristina la funzione di PI3K/Akt e previene l'apoptosi indotta dalla doxorubicina nei cardiomiociti neonatali di ratto.

Il fosfoinositide-3-chinasi (PI3Ky) è emerso come un regolatore cruciale sia della funzione cardiaca che della tumorigenesi. Nel cuore, la subunità catalitica è più espressa in condizioni di stress e innesca un rimodellamento cardiaco sfavorevole e, infine, l'insufficienza cardiaca.



L'inibizione farmacologica di PI3K si è quindi rivelato un mezzo per prevenire la cardiotoxicità da doxorubicina, aumentando la sua efficacia antitumorale.

Gli effetti benefici dell'inibizione di PI3K sono legati a un maggiore smaltimento autofagico dei mitocondri danneggiati da DOX.

Gli inibitori di PI3K sono agenti terapeutici a doppia azione, in quanto mostrano anche importanti proprietà antineoplastiche prevedendo contemporaneamente la tossicità delle antracicline e riducendo la crescita del tumore [7].

#### **1.2.5 Recettori Toll-like come biosensori dell'infiammazione indotta dalla doxorubicina**

La morte cellulare dipendente dalla DOX induce il rilascio della proteina del gruppo ad alta mobilità B1 (HMGB1) che bersaglia i recettori Toll-like 2 e 4 (TLR2 e 4). Questi recettori di membrana, a loro volta, promuovono le risposte immunitarie attivando l'espressione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B. Inoltre, l'inibizione mediata dalla DOX del TLR4 reprime il fattore di trascrizione GATA4, portando all'inibizione dell'espressione genica cardiaca.

#### **1.2.6 Inibizione AMPK**

La doxorubicina può influenzare direttamente i principali effettori intracellulari di risposta allo stress, come la proteina chinasi attivata

dall'AMP (AMPK), che rappresenta un sensore e regolatore centrale della segnalazione di energia e nutrienti all'interno della cellula.

La DOX promuove l'attivazione di p53 inibendo l'attività di AMPK ed esacerba lo stress energetico DOX-dipendente. Inoltre, l'inibizione dell'AMPK da parte della DOX può portare al blocco dell'autofagia.

Nonostante molte vie siano state associate al danno cardiomiocitico indotto dalla DOX, ad oggi l'inibizione di questi meccanismi non è riuscita ad avere un importante impatto traslazionale.

## 2 Autofagia

L'autofagia è un meccanismo citoplasmatico evolutivamente conservato di degradazione e turnover di proteine e organelli osservato negli eucarioti. In breve, questo processo omeostatico consiste nel sequestro e nella digestione lisosomiale di porzioni di citoplasma inglobate in vescicole a doppio strato chiamate "autofagosomi" [8]. Si tratta di un meccanismo di degradazione lisosomiale degli elementi citoplasmatici e svolge un ruolo di controllo delle proteine e degli organelli, essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, la sopravvivenza e l'adattamento allo stress.

L'autofagia viene rapidamente attivata da stress, come lo stress ossidativo, metabolico e genotossico, nonché lo stress nel reticolo endoplasmatico (*fig.2*). Nella maggior parte dei casi, l'autofagia è adattiva e limita gli squilibri e la morte. Tuttavia, in alcune condizioni, facilita la morte cellulare, inclusa l'apoptosi e la necrosi.

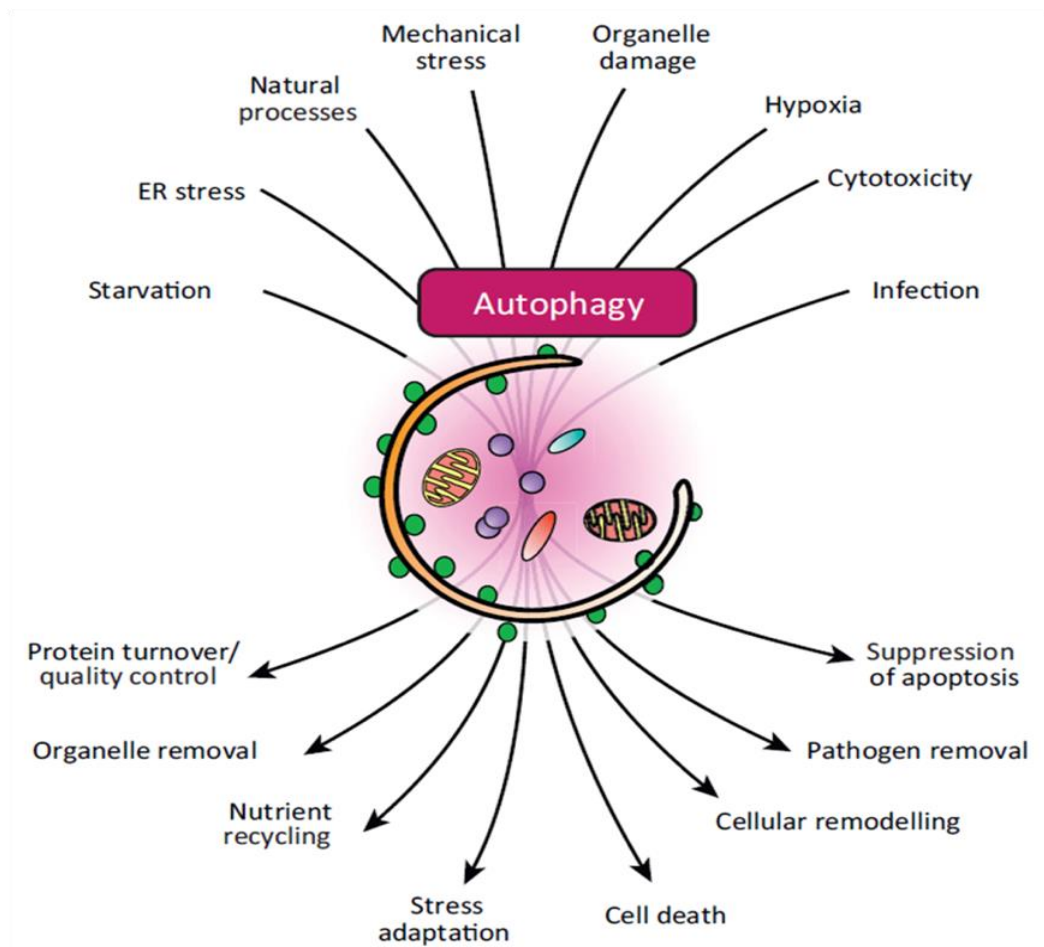


Figura 2. Stress che inducono l'autofagia [9].

L'autofagia è regolata da specifici geni correlati (Atg), che codificano per proteine che regolano l'inizio e la maturazione degli autofagosomi e la fusione degli stessi con i lisosomi per formare autolisosomi.

Negli ultimi decenni, l'autofagia è emersa anche come uno dei principali regolatori della funzione cardiaca, che preserva tramite il *turnover* omeostatico delle proteine e degli organelli [10].

Alterazioni dell'autofagia sono state associate a diversi modelli di patologia cardiovascolare [11]. L'autofagia cardiaca viene soppressa al di sotto dei livelli fisiologici nei cuori sotto stress, contribuendo alla progressione dell'insufficienza cardiaca (HF) e durante l'invecchiamento.

Gli attivatori naturali dell'autofagia esercitano notevoli effetti benefici sulla patologia umana, in particolare nelle malattie neurologiche e cardiovascolari (CVD) [12]. Il trealosio, un disaccaride naturale, e la spermidina, una poliammina derivata dalla putrescina inizialmente isolata dallo sperma, sono stati descritti come potenti attivatori del processo autofagico. In un modello murino di CVD, ad esempio, l'inibizione dell'autofagia è stata recentemente identificata come uno dei meccanismi che mediano la cardiomiopatia indotta dalla DOX [7]. La somministrazione di questi attivatori naturali dell'autofagia, già approvati per uso umano dalla FDA, può rappresentare un prezioso strumento traslazionale per migliorare la salute cardiovascolare nei pazienti oncologici.

## 2.1 Biologia dell'autofagia

Esistono tre tipi principali di autofagia (*Fig.3*):

- Macroautofagia : principale meccanismo catabolico regolato che le cellule eucariotiche utilizzano per degradare le proteine e gli organelli a vita lunga [13]. Questa forma di autofagia prevede la formazione degli autofagosomi (vescicole a doppia membrana) che sequestrano i componenti cellulari e li consegnano ai lisosomi per la degradazione.
- Microautofagia: processo attraverso il quale i lisosomi inglobano direttamente i componenti cellulari.
- Autofagia mediata da chaperone (CMA) : la proteina chaperone Hsc70 trasporta i componenti bersaglio ai lisosomi per la degradazione [10].

La CMA è necessaria per il mantenimento dell'equilibrio energetico cellulare attraverso la degradazione regolata finemente degli enzimi coinvolti nelle principali vie metaboliche e attraverso la tempestiva rimozione delle proteine strutturali dalla superficie delle goccioline lipidiche (LD) [14].

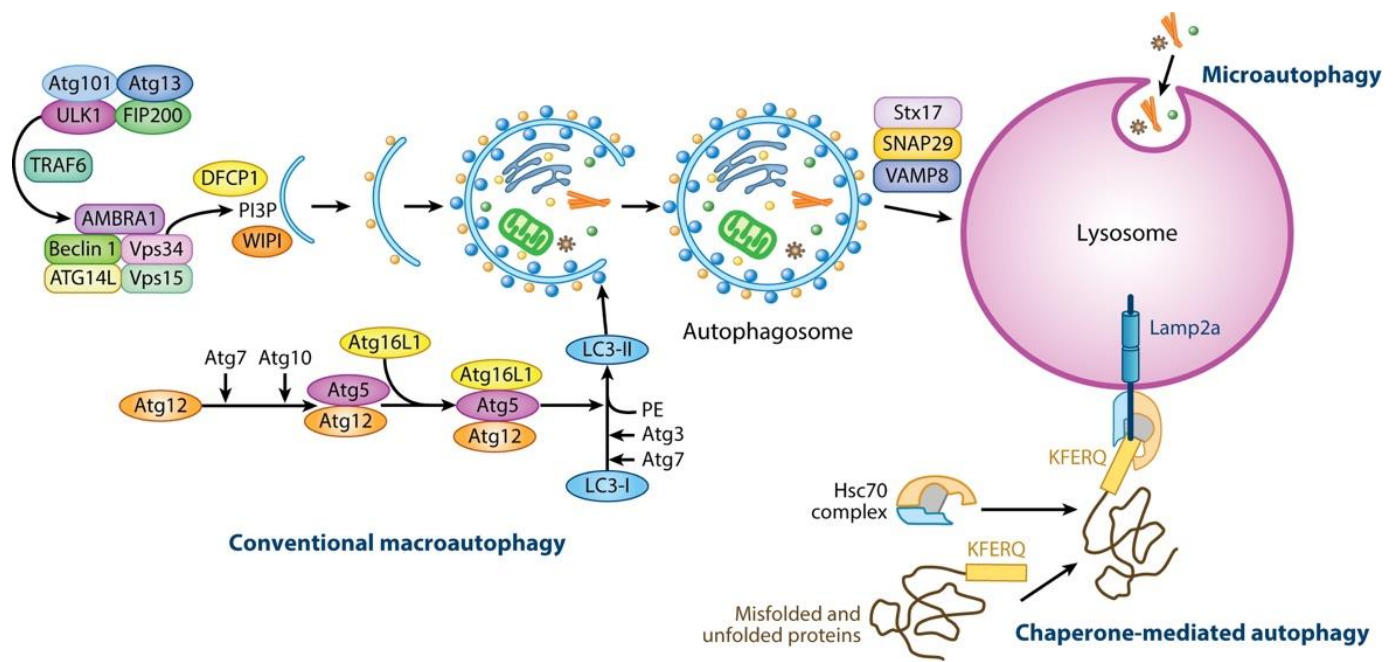


Figura 3. Principali vie di degradazione del processo autofagico [10].

### 2.1.1 Meccanismi di segnalazione dell'autofagia

Diversi meccanismi regolano l'autofagia nel sistema cardiovascolare (Fig.4):

- mTORC1 - regola negativamente l'autofagia sia fosforilando ULK1, sia reprimendo la trascrizione dei geni Atg;
- AMPK - attiva sia TSC1/2 che ULK1 facilitando l'avvio del macchinario autofagico. L'AMPK è necessario per l'attivazione dell'autofagia durante l'ischemia nei cardiomiociti;
- GSK-3 - sopprime l'attività inibitoria di mTORC1 nei confronti dell'autofagia. E' un fattore che viene attivato dall'ischemia miocardica, mentre è inibito durante la riperfusione;
- Mst1 - inibisce l'autofagia attraverso la fosforilazione di Beclin 1;
- TFEB - promuove sia la biogenesi del lisosoma che l'attivazione dell'autofagia;
- FoxO - promuove l'autofagia e stimola il flusso autofagico attraverso la sovraregolazione dei geni Rab7 e Atg;



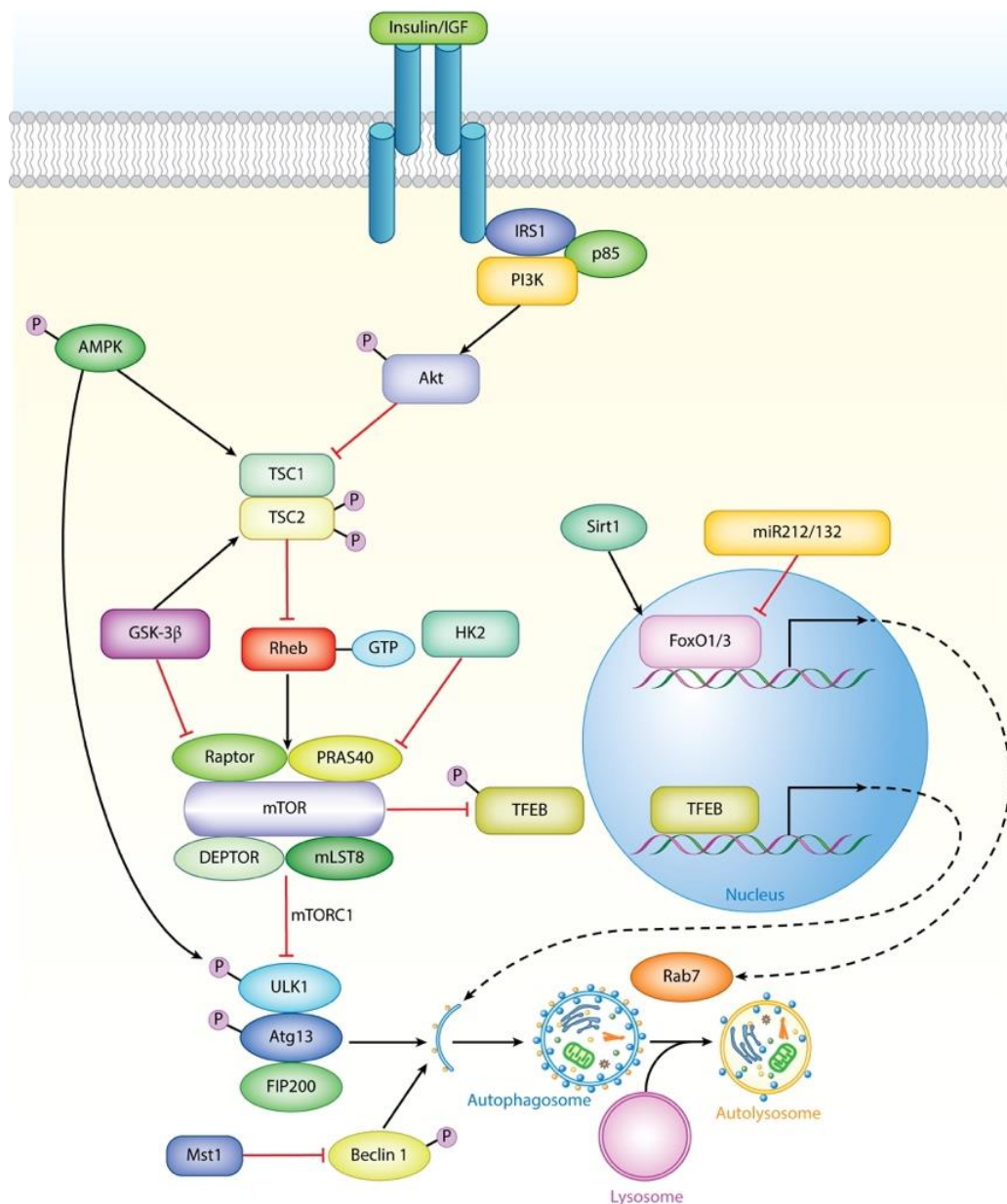


Figura 4. Meccanismi di segnalazione intracellulare [10].

L'identificazione dei segnali che regolano l'autofagia e dei geni che eseguono l'autofagia ha facilitato il rilevamento e la manipolazione del flusso autofagico. La coniugazione con fosfatidiletanolamina (PE) di lievito Atg8, o LC3 di mammifero, durante l'autofagia si traduce in una

forma non solubile di Atg8 (Atg8-PE) o LC3 (LC3-II), che si associa stabilmente con la membrana autofagosomica. Di conseguenza, l'autofagia può essere rilevata biochimicamente (valutando la generazione di Atg8-PE o LC3-II) o microscopicamente (osservando il pattern di localizzazione di Atg8 o LC3 marcati in modo fluorescente) [13].

## **2.2 Autofagia e danno mitocondriale**

I segni distintivi del danno mitocondriale come la perdita del potenziale di membrana, la produzione di ROS e i bassi livelli di ATP attivano la mitofagia.

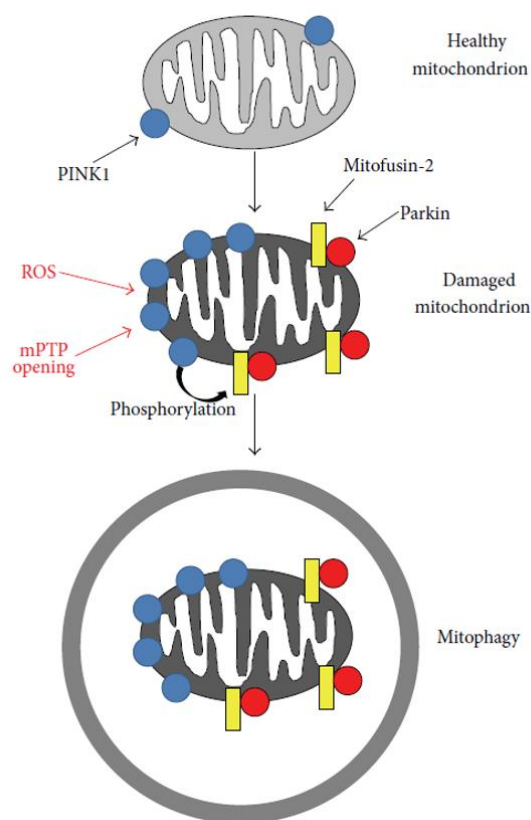
La mitofagia è la forma meglio caratterizzata di macroautofagia selettiva ed è responsabile della degradazione dei mitocondri ridondanti o danneggiati attraverso il loro sequestro negli autofagosomi.

La degradazione dei mitocondri degenerati o danneggiati può essere mediata, dal punto di vista molecolare, dall'attivazione di una via cellulare dipendente o indipendente dalla chinasi 1 (PINK1)-Parkin indotta da PTEN (*fig.5*) [14].

Parkin è una proteina citosolica che trasloca specificamente nei mitocondri disfunzionali durante lo stress, ubiquitina diversi substrati mitocondriali e successivamente media l'associazione del carico ubiquitinato a LC3, che consente il sequestro mitocondriale negli autofagosomi [11].

Gli studi suggeriscono che la via PINK1/Parkin-dipendente funziona principalmente come meccanismo inducibile di risposta allo stress nel cuore adulto [14].

Sebbene la mitofagia mediata da Parkin sia la forma meglio caratterizzata, esistono diversi meccanismi indipendenti da Parkin mediante i quali i recettori mitofagici reclutano i fagosomi nei mitocondri danneggiati [10]. Processi aggiuntivi e possibilmente sovrapposti coinvolti nel controllo della qualità mitocondriale includono l'eliminazione mediata da ubiquitina/proteasoma delle proteine mitocondriali e l'eliminazione dei contenuti mitocondriali tossici attraverso la formazione di vescicole derivate dai mitocondri. È stato riportato che quest'ultima si verifichi più frequentemente della mitofagia in condizioni di base e rappresenta una risposta rapida allo stress ossidativo indotto da DOX, che precede la mitofagia [15].



*Figura 5. Mitofagia [62]*

## **2.3 Autofagia durante cardiomiopatia indotta da doxorubicina**

La letteratura risulta essere discordante per quanto riguarda il ruolo dell'autofagia durante il trattamento chemioterapico con doxorubicina.

Secondo alcuni studi la DOX aumenta in modo dose-dipendente la morte dei cardiomiociti attraverso la riduzione dei livelli di espressione del fattore trascrizionale GATA4 e l'attivazione di risposte autofagiche (incluse quelle mitofagiche) [16].

Una modesta attivazione dell'autofagia eliminerebbe i mitocondri disfunzionali che sono responsabili dell'aumento della produzione di ROS, rimuoverebbe eventuali aggregati tossici e in generale migliorerebbe la salute cellulare prima dell'insulto della DOX [15].

Al contrario, un'altra analisi ha mostrato che la DOX inibisce il flusso autofagico nei cardiomiociti coltivati e nel cuore indipendentemente dall'attivazione di mTOR ma inibendo l'acidificazione dei lisosomi.

Topi carenti della proteina Beclin1 mostrano una maggior funzionalità cardiaca e un aumento dei marker autofagici in seguito al trattamento con DOX, al contrario in topi transgenici con una over-espressione di Beclin 1 si osserva una diminuzione della funzionalità cardiaca indotta dal trattamento farmacologico con DOX [17].

Un altro studio ha dimostrato che la DOX promuove la morte dei cardiomiociti attraverso l'inibizione del Fattore di trascrizione EB (TFEB) e la compromissione del flusso autofagico.

Risulta evidente, quindi, che l'inibizione del flusso autofagico contribuirebbe alla cardiotossicità indotta dalla DOX [10].

Un altro meccanismo mediante il quale la DOX blocca la mitofagia è attraverso l'inibizione p53-dipendente del flusso. In breve, p53 citosolica inibisce la traslocazione mitocondriale di Parkin, importante mediatore della mitofagia, e promuove la disfunzione mitocondriale nel cuore del topo.

Si potrebbe quindi supporre che i cambiamenti cronici indotti da DOX includano, come nell'invecchiamento, anche una ridotta capacità di autofagia. Questo è stato dimostrato da Hoshino et al., che ha riportato una diminuzione dell'eliminazione autofagica dei mitocondri danneggiati (mitofagia) in modelli di invecchiamento e durante la cardiotoxicità indotta dalla DOX *in vitro* e *in vivo* [18].

Nel cuore sottoposto a sovraccarico di pressione, sembra essere necessaria una modesta attivazione dell'autofagia per aumentare la clearance delle proteine mal ripiegate e mantenere la funzione cardiaca. L'inibizione completa dell'autofagia in questo contesto provoca rapidamente insufficienza cardiaca [11].

## 2.4 Ruolo dei mimetici della restrizione calorica nelle CVD

La restrizione calorica (CR) è definita come la riduzione dell'apporto calorico (30-40% della riduzione) senza malnutrizione che deriverebbe da un ridotto apporto di nutrienti essenziali.

La CR riduce lo stress ossidativo, l'infiammazione, l'apoptosi, l'accorciamento dei telomeri e la disfunzione mitocondriale, che rappresentano caratteristiche comuni coinvolte nella patogenesi delle malattie cardiovascolari.

Diversi composti, denominati mimetici della restrizione calorica (CRM) imitano le proprietà biochimiche e funzionali della CR. Includono integratori alimentari e agenti farmaceutici e non richiedono al paziente di ridurre l'assunzione di cibo *tabella 1*.

I CRM possono essere classificati in:

- Inibitori diretti delle proteine acetil-transferasi
- Inibitori della biosintesi di AcCoA
- Attivatori delle proteine de-acetilasi

Il risultato di queste azioni porta all'esaurimento dei nutrienti, che invece innesca l'autofagia. (*Fig. 6*)

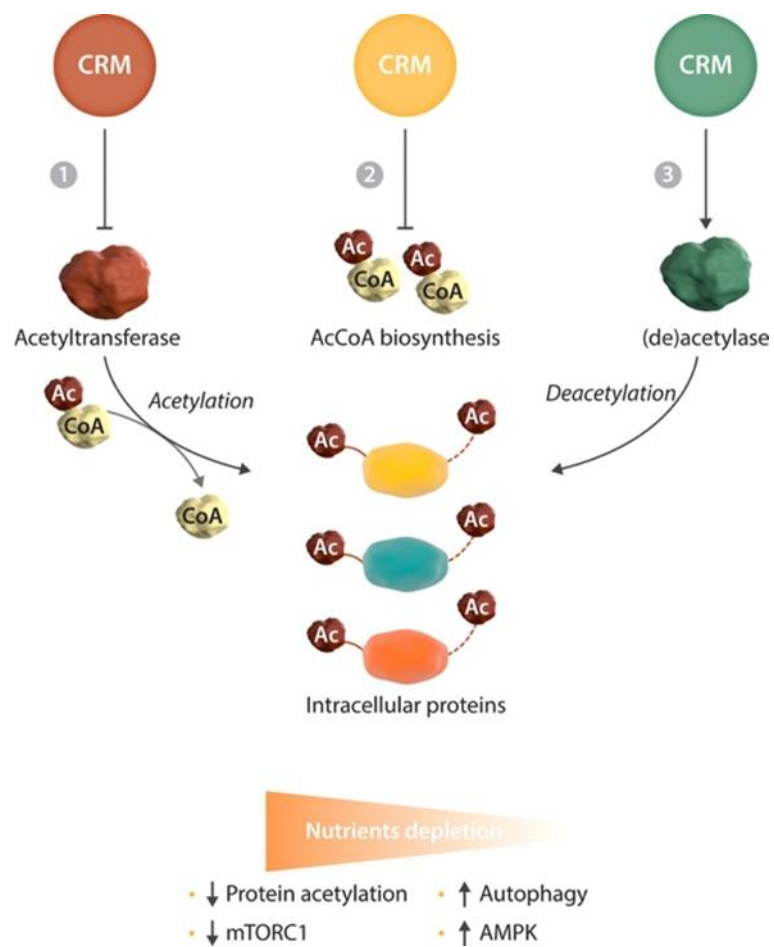


Figura 6. Effetti intracellulari dei CRM [19].

Gli effetti benefici della CR sul sistema cardiovascolare sono prevalentemente mediati dall'attivazione dell'autofagia.

Recenti studi indicano che la CR può essere in grado di ridurre il danno cardiaco in risposta allo stress [19].

Nella fattispecie il ruolo dei CR si esplica su:

### **1. Invecchiamento cardiaco**

Diversi studi preclinici hanno rivelato che i CRM riducono la disfunzione cardiaca correlata all'invecchiamento. Eisenberg et al. hanno fornito prove che dimostrano che la somministrazione di spermidina *in vivo* ai topi potrebbe prolungare la loro durata di vita e ridurre le anomalie cardiache associate all'invecchiamento. Gli autori hanno scoperto che il trattamento con spermidina promuove l'autofagia cardiaca e la mitofagia, migliora la funzione mitocondriale e riduce l'infiammazione [20].

### **2. Ipertrofia e rimodellamento**

Studi preclinici hanno rivelato che i CRM svolgono anche effetti benefici contro l'ipertrofia cardiaca disadattiva e il rimodellamento. E' stato dimostrato che la curcumina previene l'ipertrofia cardiaca nei ratti ipertesi andando a ridurre l'acetilazione di GATA4 [21].

### **3. Ischemia/ Danno da riperfusione**

Il flavonoide 4,4'-dimetossicalcone (DMC) ha dimostrato di ridurre le dimensioni dell'infarto in un modello murino di ischemia in modo autofagico-dipendente.<sup>23</sup>Allo stesso modo, nei cuori perfusi isolati, la curcumina ha migliorato



la funzione cardiaca post-ischemica e ha attenuato il danno ossidativo mitocondriale e l'infiammazione [22].

#### **4. Cardiopatie genetiche**

E' stato valutato l'effetto protettivo di CR e rapamicina nella riattivazione dell'autofagia in un modello murino di cardiomiopatia genetica causata da mutazioni nel gene MYBPC3, che codifica per la proteina C che lega la miosina alla proteina sarcomerica [23].

#### **5. Disturbi metabolici**

È stato dimostrato che la curcumina migliora la funzione cardiaca, aumentando l'autofagia, nei topi diabetici e negli esseri umani con cardiomiopatia diabetica [24].

CRM	Modello	Condizione cardiaca	Esiti cardiaci
<b>SPERMIDINA</b>	Topi 23 mesi	Invecchiamento cardiaco	↑ Funzione diastolica ↓ Ipertrofia cardiaca
<b>SRT 120</b>	Cardiomiociti isolati da topi anziani	Invecchiamento cardiaco	Disfunzione contrattile
<b>RESVERATROLO</b>	-Topi sottoposti a legatura dell'arteria coronaria sinistra -Ratti sottoposti a ischemia riperfusione	Infarto miocardico Ischemia/danno da riperfusione	↓ Dilatazione ventricolo sinistro ↓ Rimodellamento avverso ↑ Funzione cardiaca ↓ Apoptosi cardiomiociti
<b>TREALOSIO</b>	Topi sottoposti a legatura permanente dell'arteria discendente anteriore sinistra	Rimodellamento ischemico cronico	↓ Dilatazione ventricolo sinistro ↓ Rimodellamento avverso ↓ Fibrosi cardiaca ↓ Apoptosi cardiaca
<b>4,5DIMETOSSICAL CONE</b>	Topi sottoposti a legatura dell'arteria discendente anteriore sinistra	Ischemia miocardica	↓ Dimensione infarto

<b>RAPAMICINA</b>	Topi alimentati con dieta ricca di grassi soggetti a ischemia	Sindrome Metabolica	↓ Dimensione infarto
-------------------	---	---------------------	----------------------

*Tabella 1. Effetti benefici dei CRM nelle patologie cv*

## 2.5 Ruolo del trealosio

Tra i CRM, è stato molto approfondito l'effetto del trealosio (TRE). TRE è un disaccaride naturale non riducente sintetizzato da batteri, funghi piante e animali invertebrati, apparentemente senza effetti collaterali nei soggetti umani.

Negli organismi inferiori i livelli intracellulari di trealosio aumentano durante la disidratazione e lo stress, promuovendo così la sopravvivenza cellulare. Nei mammiferi, invece, la somministrazione di trealosio promuove l'autofagia attraverso la quale riduce gli aggregati proteici, lo stress ossidativo ed energetico.

In uno studio di Sciarretta et al. è emerso il ruolo del trealosio nel migliorare il rimodellamento e la funzione cardiaca in un modello murino di infarto miocardico cronico (Fig.7). Si è così dimostrato come il TRE riduca la dilatazione del ventricolo sinistro (LV) e aumenti la funzione ventricolare nei topi con legatura dell'arteria discendente sinistra (LAD) rispetto al placebo.

Per valutare se il trealosio eserciti effetti benefici attraverso l'attivazione dell'autofagia è stato somministrato a topi *beclin 1*<sup>+/-</sup>. Nello studio hanno

ipotizzato che questi topi, mancanti di uno dei geni chiave del processo autofagico, non avrebbero avuto una ripresa nella funzionalità cardiaca dopo il trattamento con il TRE.

Da questo è emerso che il miglioramento della funzione ventricolare sinistra, la congestione polmonare, il rimodellamento cardiaco, l'apoptosi in seguito al trattamento con TRE, osservato nei topi *wild-type*, era significativamente attenuato nei topi Beclin 1 <sup>+/-</sup>.

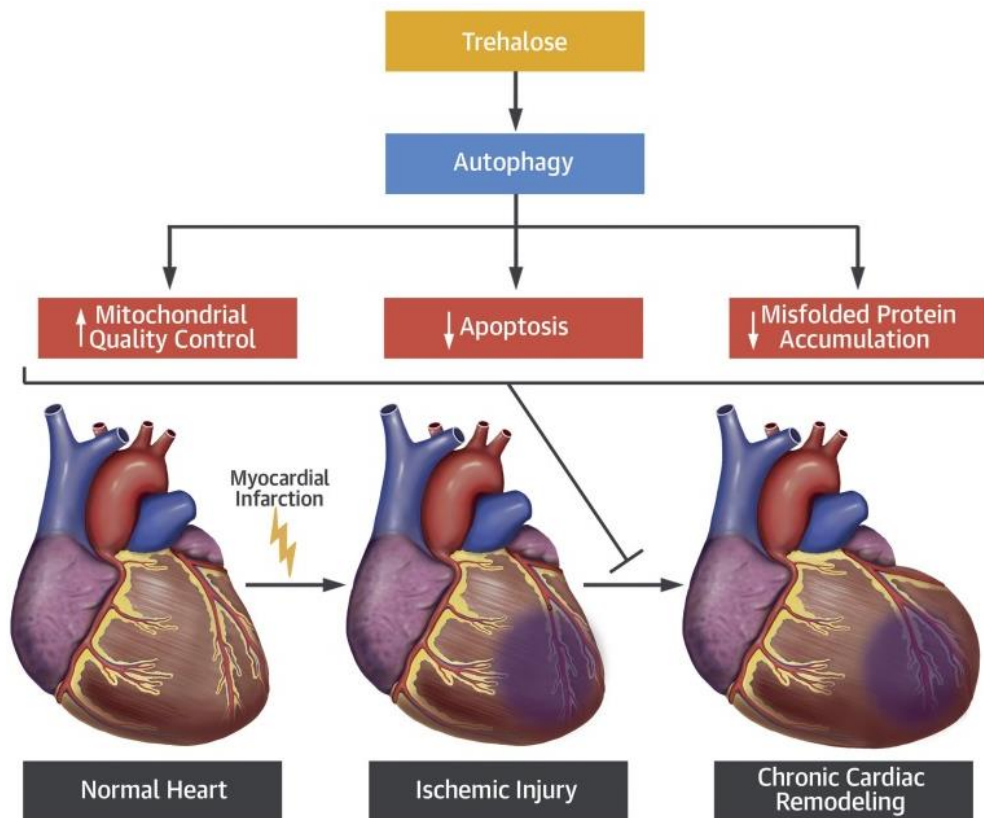


Figura 7. Effetti benefici della somministrazione di trealosio sul cuore [39].

## 2.6 Il ruolo della spermidina

La spermidina, una poliammina naturale, ben noto inibitore dell'acetiltransferasi, agisce per competizione con l'AcCoA per il legame al sito catalitico di EP300, inibendo la sua attività acetiltransferasica [25]. Lo studio di Eisenberg et al. Ha fornito prove convincenti che dimostrano come la somministrazione di spermidina *in vivo* a topi possa prolungare l'aspettativa di vita e ridurre le anomalie cardiache associate all'invecchiamento. Inoltre, lo studio mostra come il trattamento con spermidina promuova l'autofagia nel cuore, la mitofagia, incrementi la funzione mitocondriale e riduca l'infiammazione. È importante notare come gli effetti protettivi della spermidina siano aboliti nei topi knockout per ATG5 cardio-specifica, suggerendo come il ruolo protettivo stesso sia mediato dall'attivazione autofagica.

### **3 Obiettivi**

Sebbene siano stati proposti diversi modelli volti a spiegare il fenomeno di tossicità cardiaca determinata dall'uso di doxorubicina, ad oggi non è stato ancora possibile individuare il meccanismo molecolare specifico per la messa a punto di una strategia farmacologica protettiva. Tuttavia, da recenti studi, è emerso come la disregolazione dell'autofagia sia una delle cause del danno indotto da doxorubicina e come la sua modulazione possa fornire un fenotipo protettivo nei confronti di questa cardiomiopatia [7].

In questo studio, esploriamo per la prima volta l'effetto della somministrazione di trealosio e spermidina a basso dosaggio in un modello murino clinicamente rilevante di cardiomiopatia indotta da DOX.

## 4 Risultati

### 4.1 Gli attivatori naturali dell'autofagia proteggono i topi dalla cardiomiopatia indotta da DOX.

Abbiamo studiato gli effetti della somministrazione di trealosio o spermidina utilizzando un modello murino preclinico pertinente e convalidato di cardiotossicità indotta da DOX. Abbiamo osservato per la prima volta il fenotipo cardiaco di topi C57BL/6J alimentati con trealosio, saccarosio o spermidina in acqua potabile e che avevano ricevuto 15 mg/kg di DOX iniettata per via intraperitoneale (i.p.), divise in 1 iniezione a settimana da 5 mg/kg l'una, per 3 settimane. Abbiamo osservato una significativa riduzione della funzione sistolica nei topi alimentati con acqua e saccarosio, dopo sei settimane dall'iniezione iniziale di DOX. Al contrario, i topi che hanno ricevuto trealosio non hanno mostrato una compromissione della funzione sistolica in risposta al trattamento con DOX (Fig. 8). Allo stesso modo, i topi alimentati con spermidina hanno mostrato una funzione cardiaca protetta rispetto ai topi che hanno ricevuto DOX (Fig. 8). Inoltre, i topi alimentati con trealosio che hanno ricevuto DOX non hanno mostrato una riduzione della massa cardiaca come osservato nei topi alimentati con acqua (Fig. 8). Inoltre, i topi alimentati con acqua e saccarosio hanno mostrato segni di fibrosi interstiziale, mentre quelli alimentati con trealosio non hanno mostrato tracce di alterazioni parenchimali e deposizione di collagene (Fig. 9). Questi dati dimostrano che

l'alimentazione dei topi con attivatori naturali dell'autofagia annulla le anomalie cardiache indotte dalla DOX.

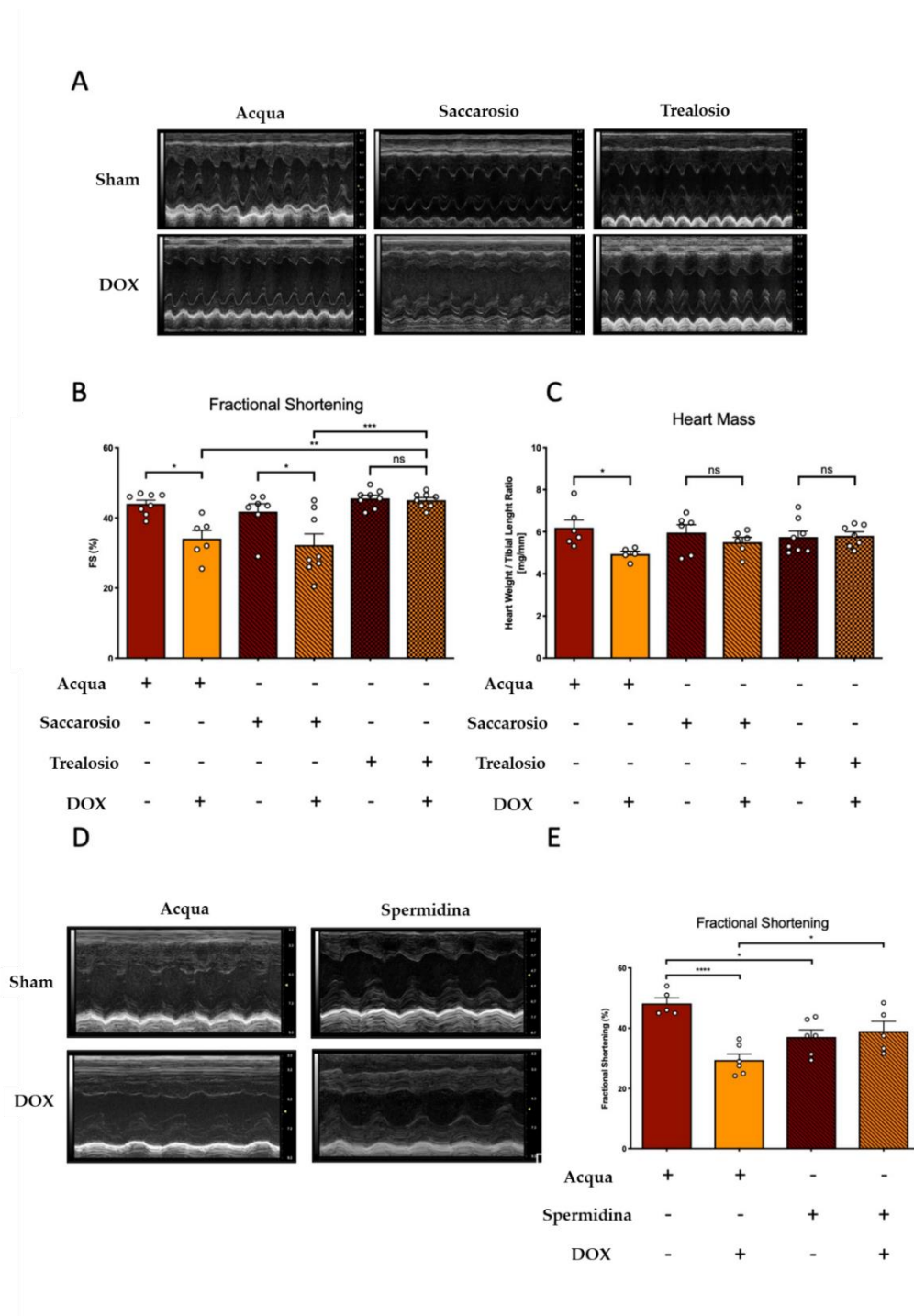
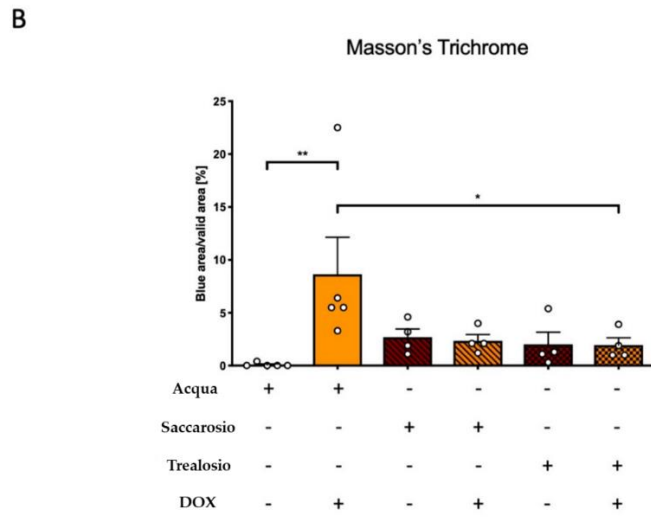
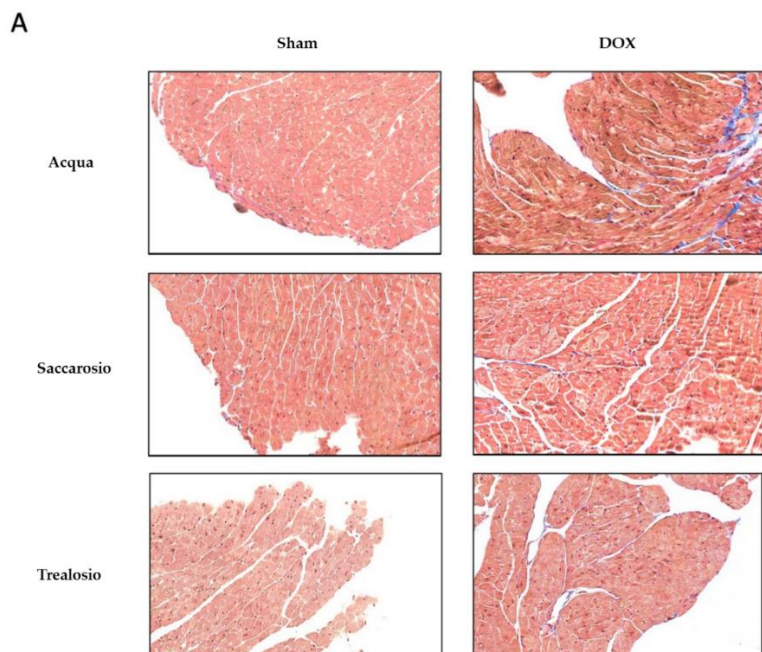


Figura 8. Gli attivatori naturali dell'autofagia proteggono il cuore dalla cardiomiopatia indotta da DOX. (AB) Analisi ecocardiografiche M-mode del fractional



*shortening del miocardio in topi C57BL/6J ( wt ) trattati per 6 settimane con doxorubicina (DOX) e saccarosio/trealosio. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM (n = 6-8 campioni indipendenti); (C) analisi gravimetriche post-mortem del rapporto peso cardiaco/lunghezza tibiale dopo 6 settimane di trattamento con doxorubicina e saccarosio/trealosio in topi C57BL/6J ( wt ). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM (n = 5-8 campioni indipendenti); (DE) Analisi ecocardiografiche M-mode dell'accorciamento frazionale del miocardio nei topi C57BL/6J ( wt ) trattati per 6 settimane con doxorubicina (DOX) e spermidina. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM (n = 5-6 campioni indipendenti). I dati sono stati analizzati con ANOVA unidirezionale con un test post-hoc di Bonferroni. \*P  $\leq$  0,05; \*\* P  $\leq$  0,01; \*\*\* P  $\leq$  0,001 ; \* \*\*\* P  $\leq$  0,0001; ns = non significativo (P > 0,05).*



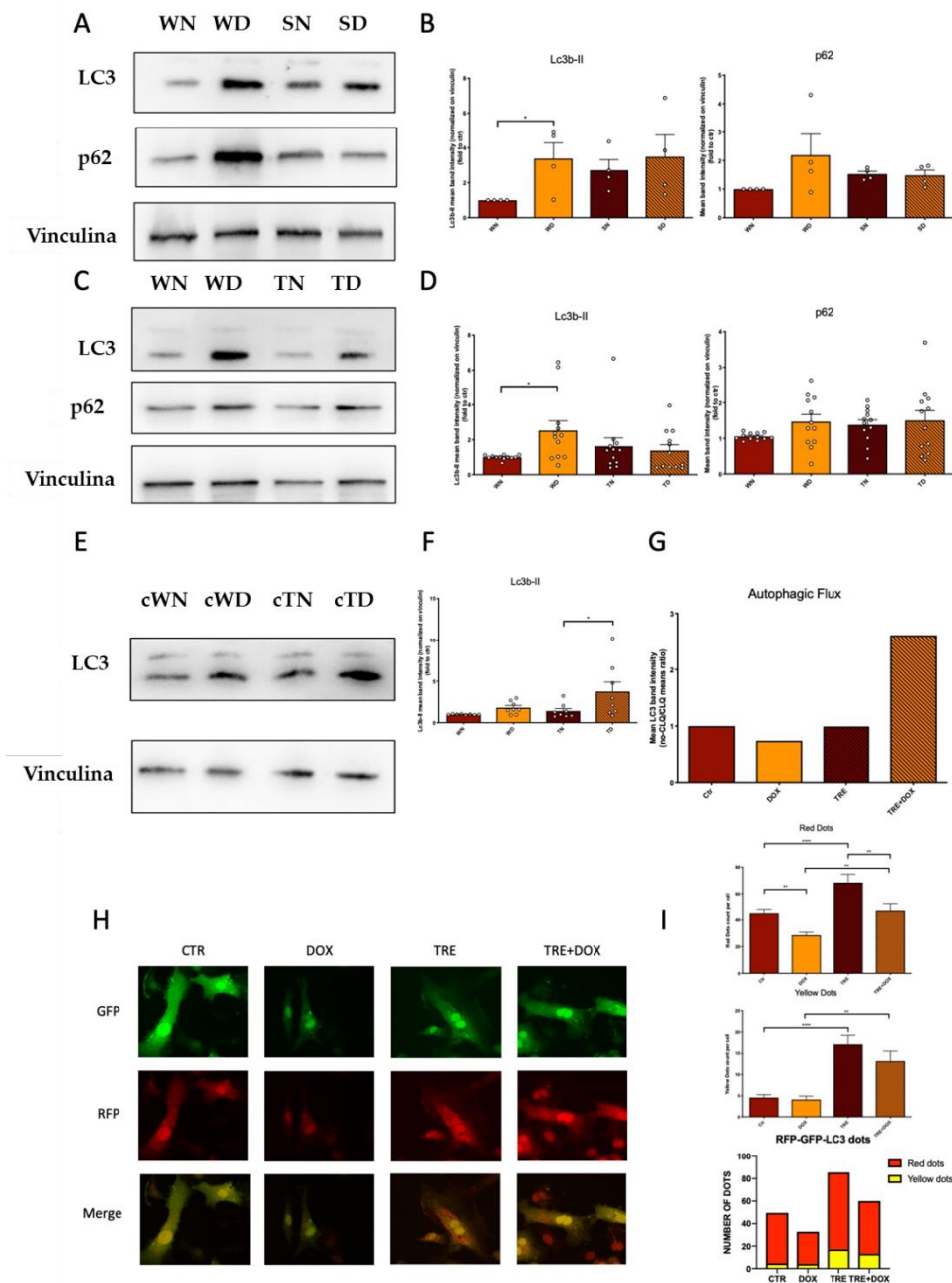
**Figura 9. Il trealosio riduce la deposizione interstiziale di collagene miocardico dopo il trattamento con DOX.**

(AB) La colorazione tricromica di Masson delle sezioni miocardiche è stata effettuata su tessuti di topi trattati con 3 iniezioni di doxorubicina con una dose cumulativa finale di 15 mg/kg e trealosio. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM (n = 4-5 campioni indipendenti). I dati sono stati analizzati con ANOVA unidirezionale con un test post-hoc di Bonferroni. \*P  $\leq$  0,05; \*\* P  $\leq$  0,01.

## **4.2 Il Trealosio e la spermidina recuperano il flusso autofagico del miocardio nei topi trattati con DOX.**

I cuori sono stati prelevati *post-mortem* dai topi e sono stati prodotti lisati proteici per valutare i livelli di attivazione dell'autofagia. Abbiamo scoperto che la DOX induce un accumulo di LC3-IIb, ma sia la spermidina (Fig. 10A-B) che il trealosio (Fig. 10C-D) riducono questo effetto. Abbiamo anche osservato che p62 mostrava una tendenza simile a LC3-IIb, aumentando nei campioni trattati con DOX ma risultando ridotta nei gruppi trattati con trealosio e DOX. Per determinare se il flusso autofagico fosse attivato o inibito in questo modello, abbiamo trattato diversi gruppi di topi con DOX e/o trealosio e somministrato cloroquina, un inibitore tardivo del flusso autofagico, 4 ore prima del sacrificio. Abbiamo quindi studiato i livelli di LC3-IIb e p62 in questi campioni e abbiamo riscontrato un notevole aumento di LC3-IIb nei campioni che hanno ricevuto sia trealosio che doxorubicina (Fig. 10E-F). Il rapporto tra i livelli misurati di LC3-IIb accumulato osservato nel trattamento con trealosio con e senza cloroquina dimostra che DOX inibisce il flusso autofagico mentre il trealosio lo migliora nei campioni trattati con DOX (Fig. 10G). Per corroborare ulteriormente questa deduzione, abbiamo eseguito una caratterizzazione *in vitro* dell'autofagia in cardiomiociti primari di ratto neonatale (CM) che sono stati infettati con un adenovirus che sovra-esprimeva mRFP-eGFP-LC3 [26], trattati con trealosio 50 mM per 24 ore e poi 4 ore con DOX 50  $\mu$ M

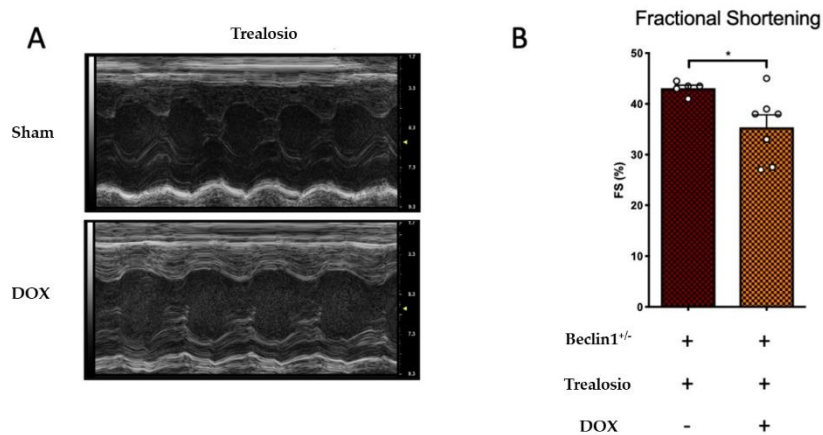
+ trealosio 50 mM. Abbiamo scoperto che la DOX riduce il numero di punti rossi (che indicano gli autolisosomi) e gialli (che indicano gli autofagosomi) osservati all'interno del citoplasma dei cardiomiociti, indicando un blocco tardivo del flusso autofagico. Il trealosio, al contrario, produce un forte incremento di questi punti rossi e gialli (Fig. 10H-I), mostrando in questo modo il ripristino del flusso autofagico. Inoltre, abbiamo trattato topi Beclin1<sup>+/-</sup> con deficit di autofagia e topi wt con trealosio e/o DOX. Non abbiamo osservato alcun effetto benefico dalla somministrazione di trealosio nei topi Beclin1<sup>+/-</sup> che hanno ricevuto DOX, dimostrando la stessa riduzione del FS che è stata osservata nei topi wt iniettati con DOX alimentati con acqua (Fig. 11A-B). Insieme, questi dati dimostrano che la DOX inibisce l'autofagia bloccandone le fasi tardive e che la riattivazione con un attivatore naturale dell'autofagia protegge il cuore dallo sviluppo della cardiomiopatia indotta dalla DOX.



**Figura 10.** Attivatori naturali dell'autofagia contro l'inibizione dell'autofagia indotta da DOX. (A-B) Profilo di espressione proteica dei marcatori di autofagia Lc3b-II e p62 nei lisati miocardici derivanti da topi trattati con doxorubicina a una dose cumulativa finale di 15 mg / kg e spermidina sacrificati dopo 6 settimane di trattamento. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$  campioni indipendenti); (C-D) Profilo di espressione proteica dei marcatori autofagici Lc3b-II e p62 nei lisati miocardici derivanti da topi trattati con doxorubicina e trealosio a una dose cumulativa finale di 15 mg / kg che sono stati

sacrificati dopo 6 settimane di trattamento. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 12$  campioni indipendenti); (E-F) Profilo di espressione proteica dei marcatori autofagici Lc3b-II e p62 nei lisati miocardici derivanti da topi trattati con doxorubicina e trealosio per 6 settimane di trattamento e che hanno ricevuto clorochina 4 ore prima del sacrificio (vedi metodi). I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 8$  campioni indipendenti); (G) flusso autofagico determinato dal rapporto medio normalizzato dei livelli di Lc3b-II (senza clorochina / con clorochina); (H-I) i cardiomiociti primari di ratto neonatale (CM) sono stati infettati con ad-mRFP-eGFP-Lc3b per 48 ore, quindi trattati con trealosio 50 mM, quindi 4 ore con DOX 50  $\mu$ M + trealosio 50 mM. Le cellule casuali sono state visualizzate con microscopia a fluorescenza e sono stati contati i numeri di punti rossi e gialli (cioè rosso + verde). I dati rappresentano i punti medi per numero di cella  $\pm$  SEM ( $n = 47-103$  cellule da 4 esperimenti indipendenti). I dati sono stati analizzati con ANOVA unidirezionale con un test post-hoc di Bonferroni. \* $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$  ; \* \*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

WN: topo wild type non trattato; WD: topo wild type trattato con DOX; SN: topo wild type trattato con spermidina; SD: topo wild type trattato con spermidina e DOX; TN: topo wild type trattato con trealosio; TD: topo wild type trattato con trealosio e DOX;  
c: Topo trattato con clorochina.



*Figura 11. I topi Beclin1<sup>+/-</sup> con deficit di autofagia non sono protetti dal trealosio da squilibri funzionali cardiaci indotti da DOX.*

*(A-B) Analisi ecocardiografiche M-mode fractional shortening del miocardio nei topi C57BL/6J ( wt) trattati per 6 settimane con doxorubicina (DOX) e trealosio. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM (n = 5-7 campioni indipendenti). I dati sono stati analizzati con un test T di Student non appaiato a due code. \*  $P \leq 0,05$ .*

### **4.3 La somministrazione di trealosio induce la mitofagia a eliminare i mitocondri danneggiati.**

Abbiamo eseguito analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) per esaminare eventuali alterazioni morfologiche all'interno dei cardiomiociti, riscontrando gravi anomalie nella morfologia mitocondriale dei campioni trattati con DOX. Oltre al rigonfiamento e ad alterazioni nel pattern delle creste mitocondriali, abbiamo riscontrato un aumento del numero di mitocondri inclusi nelle vescicole autofagosomiali in ogni gruppo trattato con DOX (alimentato con acqua, saccarosio, trealosio). Da notare che i topi alimentati con trealosio hanno mostrato un numero estremamente elevato di corpi autofagici che includevano un frammento mitocondriale. Tuttavia, il numero più alto è stato osservato nei topi alimentati con trealosio che hanno ricevuto DOX (Fig. 12A-B).

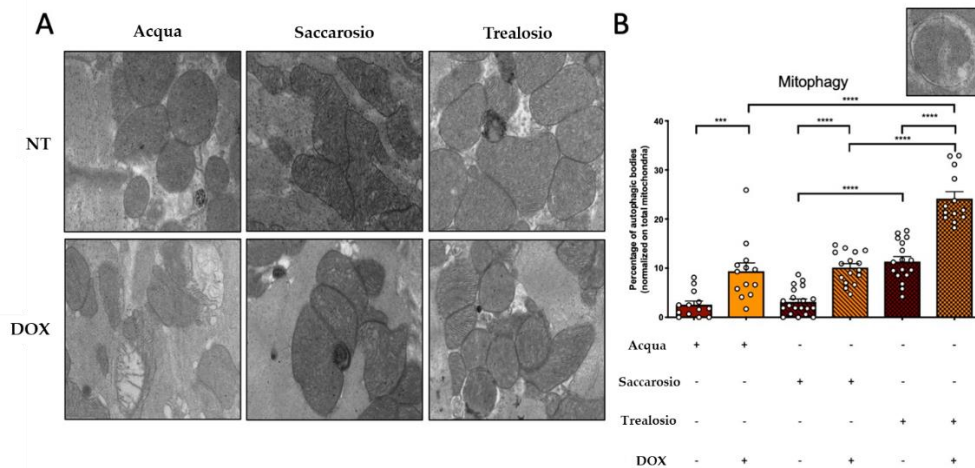


Figura 12. Il trealosio protegge il cuore dalla cardiotoxicità indotta da DOX rimuovendo i frammenti mitocondriali disfunzionali attraverso la sovraregolazione della mitofagia. (A) Immagini TEM rappresentative dei mitocondri miocardici da topi trattati con DOX e trealosio 6 settimane dopo la prima somministrazione e (B) quantificazione della percentuale di corpi mitofagici rispetto al totale dei mitocondri contati. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 13-20$  campi microscopici da 3 campioni indipendenti)

Inoltre, abbiamo indagato se la mitofagia fosse coinvolta in questo modello patologico tramite l'utilizzo di CM primari. Abbiamo utilizzato i coloranti commerciali MitoTracker e LysoTracker per quantificare rispettivamente la co-localizzazione dei mitocondri e dei lisosomi. Abbiamo trovato un numero maggiore di punti doppi positivi nei campioni trattati con DOX. Tuttavia, questo numero è stato ridotto nei campioni trattati con 24 ore di DOX 15  $\mu$ M e 48 ore di trealosio 50 mM (Fig. 13A-B). Abbiamo anche stimato la massa mitocondriale misurando l'intensità del segnale



MitoTracker normalizzata al numero di cellule e abbiamo scoperto che la DOX riduce la massa mitocondriale con o senza trattamento con trealosio. Inoltre, abbiamo scoperto che il trattamento con trealosio senza DOX riduce la massa mitocondriale, coerentemente con un aumento del turnover associato all'aumento dell'autofagia (Fig. 13C).

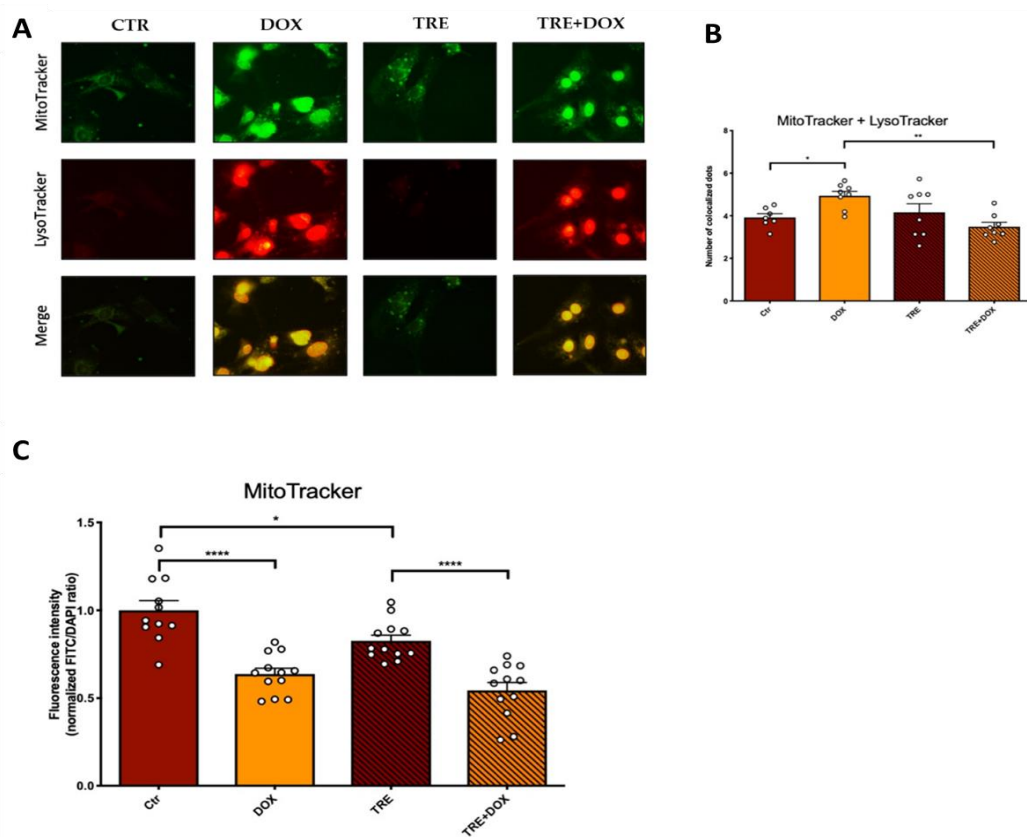
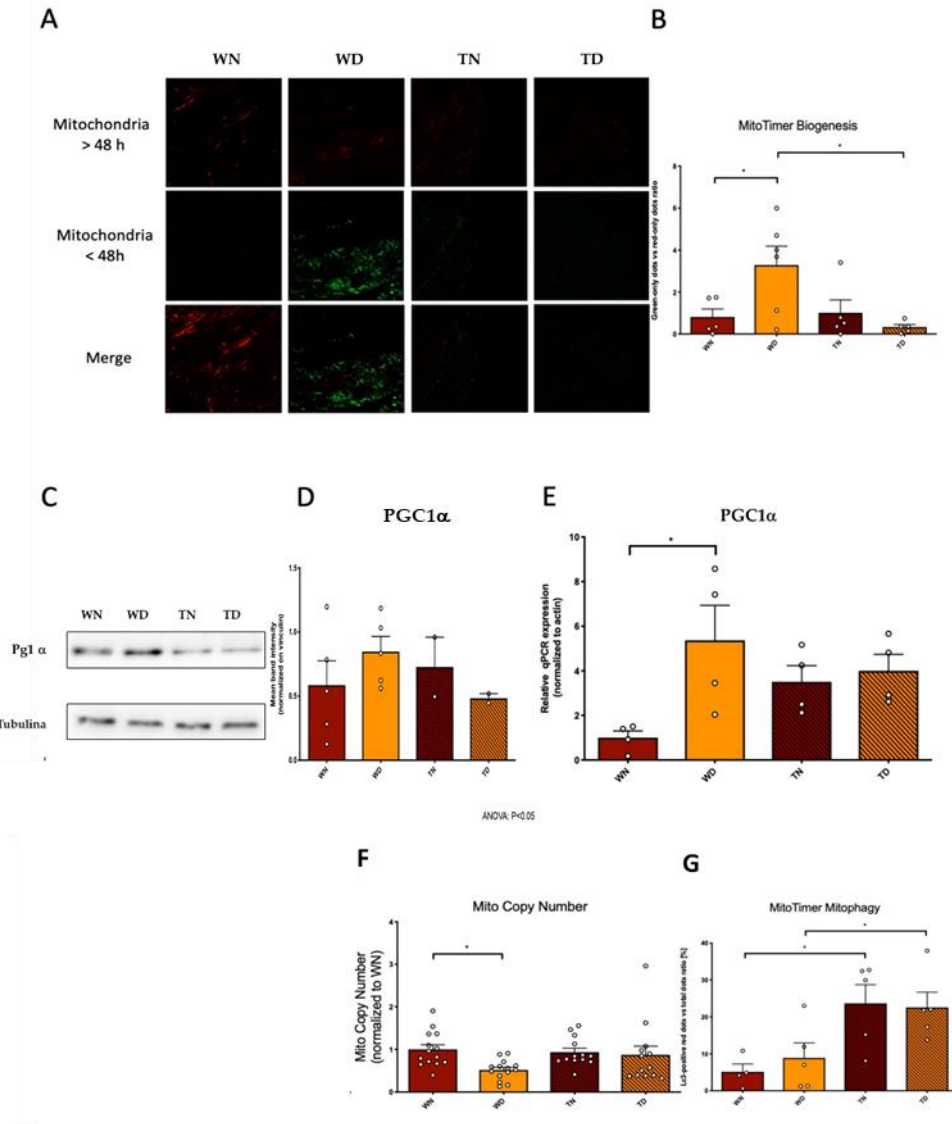


Figura 13. Il trealosio protegge il cuore dalla cardiotossicità indotta da DOX rimuovendo i frammenti mitocondriali disfunzionali attraverso la sovra-regolazione della mitofagia. (A-B) I coloranti MitoTracker Green e LysoTracker rosso co-colorano per quantificare la mitofagia. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 7-8$  campioni indipendenti); (C) Intensità della fluorescenza del colorante verde MitoTracker normalizzata sul segnale DAPI per quantificare la massa mitocondriale. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 11-12$  campioni indipendenti). I dati sono stati

*analizzati con ANOVA unidirezionale con un test post-hoc di Bonferroni. \*  $P \leq 0,05$ . \* $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .*

Nonostante una riduzione della massa mitocondriale, abbiamo osservato un aumento del numero di copie mitocondriali mediante quantificazione qPCR del DNA mitocondriale (mtDNA) nei CM trattati con DOX con o senza trealosio (Fig. 14F-G). Abbiamo studiato questo apparente paradosso trattando con DOX e/o trealosio una linea transgenica di topi chiamata MitoTimer , che aiuta a valutare la biogenesi mitocondriale [27]. Utilizzando questo modello, abbiamo determinato un aumento della biogenesi mitocondriale in campioni trattati con DOX ma non con trealosio, che non è stato osservato nel miocardio da topi trattati con trealosio e DOX (Fig. 14A-B). Questi dati sono stati corroborati trovando nei cuori trattati con DOX maggiori quantità di mRNA e proteina di PGC-1 $\alpha$ , che è considerato un gene principale della biogenesi mitocondriale (Fig. 14C-E) [28].

Nel complesso, questo studio suggerisce che il trealosio protegge il miocardio rimuovendo i mitocondri cardiomiocitici danneggiati dalla DOX attraverso l'aumento della mitofagia.



**Figura 14. Il trealoso riduce la biogenesi mitocondriale innescata da DOX.**

(A-B) Valutazione della biogenesi mitocondriale mediante analisi di fluorescenza di punti rossi/verdi nei topi MitoTimer trattati per 6 settimane con doxorubicina (DOX) e trealoso. I dati rappresentano la media  $\pm$  (SEM) ( $n = 5-6$  campioni indipendenti); (C-D) Profilo di espressione della proteina coattivatore 1 del proliferatore gamma del perossisoma (PGC1-alfa) nei lisati miocardici derivanti da topi trattati con doxorubicina a una dose cumulativa

finale di 15 mg/kg che sono stati sacrificati dopo 6 settimane di trattamento. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$  campioni indipendenti); (E) Profilo di espressione dell'mRNA di PGC1-alfa in lisati miocardici derivanti da topi trattati con doxorubicina a una dose cumulativa finale di 15 mg/kg che sono stati sacrificati dopo 6 settimane di trattamento. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$  campioni indipendenti); (F) valutazione del numero di copie mitocondriali mediante quantificazione del DNA mitocondriale (mtDNA) (vedi metodi) in lisati cardiaci ottenuti da topi c57BL/6J e MitoTimer trattati per 6 settimane con DOX e trealosio. I dati rappresentano la media  $\pm$  SEM ( $n = 13-14$  campioni indipendenti); (G) valutazione della mitofagia mediante immunofluorescenza utilizzando un anticorpo anti-LC3b nei campioni di cuore MitoTimer. È stata valutata la doppia percentuale di punti rossi positivi di Lc3b + mitotimer rispetto al totale dei punti rossi. I dati rappresentano media  $\pm$  SEM ( $n = 4-5$  campioni indipendenti). I dati sono stati analizzati con un test T di Student non appaiato a due code (D) o con ANOVA unidirezionale con un test post hoc di Bonferroni (B, EH). \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ .

WN: topo wild type non trattato; WD: topo wild type trattato con DOX; TN: topo wild type trattato con trealosio; TD: topo wild type trattato con trealosio e DOX.

CRM	Modello	Condizione cardiaca	Esiti cardiaci
<b>SPERMIDINA</b>	Topi wild type C57BL/6J	Danno Cardiaco da DOX	↑ Funzione sistolica ↓ Fibrosi interstiziale ↑ Flusso Autofagico
<b>TREALOSIO</b>	Topi wild type C57BL/6J	Danno Cardiaco da DOX	↑ Funzione sistolica ↓ Fibrosi interstiziale ↑ Flusso Autofagico ↑ Mitofagia

*Tabella 2. Effetti benefici dei CRM osservati.*

## 5 Discussione

Una maggiore comprensione dei meccanismi molecolari alla base della cardiotoxicità indotta da DOX ha portato allo sviluppo di nuove terapie per prevenire o trattare le alterazioni cardiache indotte dalle antracicline. Questi includono difetti nella gestione del  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento dell'apoptosi, alterazioni della dinamica mitocondriale, disaccoppiamento del ciclo redox e difetti della catena di trasporto degli elettroni [6].

Il presente lavoro estende il nostro precedente lavoro [7] sul ruolo della compromissione dell'autofagia nella cardiotoxicità da antracicline. Abbiamo identificato la disfunzione mitocondriale e il blocco dei meccanismi omeostatici autofagici come meccanismi chiave medianti le anomalie cardiache indotte da DOX. Inoltre, abbiamo scoperto per la prima volta che attivatori naturali dell'autofagia come il trealosio e la spermidina, che sono stati approvati dalla FDA per uso umano, ripristinano il flusso autofagico e preservano la funzione cardiaca in modelli murini di chemioterapia clinicamente rilevanti.

In generale, i dati ottenuti nei modelli animali indicano che la modulazione dell'autofagia è una strategia promettente di trattamento delle malattie cardiache nei pazienti umani.

Sebbene nello scorso decennio ci siano stati notevoli progressi nella ricerca sull'autofagia nel cuore, la capacità di valutare se l'autofagia sia attivata o inibita in una data condizione, e chiarire il suo significato funzionale in quelle condizioni, ad oggi deve ancora essere migliorata [14].

Diverse strategie terapeutiche sono state proposte per stimolare l'autofagia. Inibitori di mTORC1, come gli analoghi della rapamicina o attivatori di AMPK, come la metformina e 5-amminoimidazolo-4-carbossammide ribonucleotide (AICAR), conferiscono cardioprotezione in diverse condizioni di stress, compreso l'invecchiamento [10] [29] [30]. Inoltre, sono stati proposti anche altri composti naturali oltre a spermidina e trealosio. Tra questi, il resveratrolo, un polifenolo presente nel vino rosso, stimola l'autofagia cardiaca attraverso l'attivazione della Proteina NAD-dipendente deacetilasi sirtuina-1 (SIRT1) e AMPK [31] [32].

In letteratura, è stato mostrato come non sia facile valutare lo stato di attivazione, o inibizione, del flusso autofagico [33]. Seguendo le linee guida internazionali, dovrebbero essere utilizzati più metodi, includendo idealmente coloranti indicatori come il tandem fluorescente LC3, Mito-Keima o GFP-LC3-RFP-LC3 [34] [35]. Questi, vanno valutati in accoppiamento con inibitori dei lisosomi, con cui è possibile osservare i livelli di accumulo delle proteine LC3-II e p62 tramite western blot. In questo senso, il nostro studio appare allineato metodologicamente, e la guida all'interpretazione dei risultati conferma che il meccanismo che si osserva nel presente studio è un'inibizione tardiva del flusso autofagico causato dalla DOX che blocca la fase degradativa del flusso portando alla mancata fusione dei lisosomi con gli autofagosomi. Questo blocco citotossico viene fortemente mitigato dalla somministrazione di trealosio e spermidina, i cui valori mostrano un chiaro incremento del flusso bloccato dalla DOX.

Va comunque menzionato che nella patologia cardiaca sono stati riportati casi in cui sia un'eccessiva attivazione, e non un'inibizione del flusso

autofagico, a portare i cardiomiociti incontro a morte cellulare [36] [37]. La morte dei cardiomiociti indotta dall' autofagia si verifica nel cuore in condizioni patofisiologicamente rilevanti, come: danno da ischemia da riperfusione (I/R), insufficienza mitralica (IM), sovraccarico di pressione (PO) e tossicità acuta da DOX [11] [38] [39] . Questa particolare condizione prende il nome di autosi. Questa è stata definita come una forma di morte non-apoptotica dipendente dall'autofagia caratterizzata da incrementata adesione cellulare al proprio substrato, 'ballooning' focale dello spazio perinucleare e gravi alterazioni del reticolo endoplasmatico, che appare dilatato e frammentato in questa condizione [40].

## **5.1 Autofagia e mitofagia nella cardiotoxicità delle antracicline**

Precedenti studi hanno riportato che le antracicline stimolano l'autofagia cardiaca, che contribuisce principalmente alla morte dei cardiomiociti dopo il trattamento farmacologico. Un livello aumentato di marcatori autofagici, tra cui Beclin1, LC3-II, p62, e di altre proteine correlate all'autofagia come ATG5 e ATG7, è stato visto nei cardiomiociti e nei cuori trattati con antraciclina [41] [42] [43] [44]. A sostegno di questi risultati, l'inibizione di Beclin1 attenua la morte dei cardiomiociti indotta da antraciclina, mentre la sovraespressione di Beclin1 esacerba la cardiotoxicità da antraciclina [16]. Tuttavia, altri studi hanno dimostrato che le antracicline possono effettivamente bloccare l'autofagia e che la promozione del flusso autofagico cardiaco è protettiva contro la cardiotoxicità delle antracicline [45] [46] [47] [17] [7] [48] [49].



Questi risultati controversi possono essere attribuiti alla mancanza di modelli uniformi per studiare il ruolo dell'autofagia nella cardiotoxicità delle antracicline [50]. Il fatto che l'autofagia sia protettiva o dannosa nella cardiotoxicità delle antracicline può essere attribuito a molteplici ragioni, tra cui la mancanza di un'analisi accurata del flusso autofagico, della dose e della durata del trattamento con antracicline, nonché delle fasi dinamiche dello sviluppo patologico. Nonostante non sia stato raggiunto alcun consenso sul ruolo dell'autofagia nella cardiotoxicità delle antracicline, la maggior parte degli studi supporta l'opinione che le antracicline compromettano il flusso autofagico, con conseguente blocco della clearance e riciclaggio di componenti cellulari potenzialmente tossici, come i mitocondri danneggiati/disfunzionali. Inoltre, è importante sottolineare che il trattamento con antracicline provoca cardiotoxicità acuta, precoce e cronica. Negli studi in acuto si nota come l'autofagia sia attivata, verosimilmente nel tentativo delle cellule di sopravvivere ad un'ondata massiccia di agenti danneggianti i mitocondri. Al contrario, negli studi in cronico è possibile osservare gli effetti sul lungo periodo di queste specie che rimangono irreversibilmente legate al network mitocondriale, che sono, coerentemente a quanto osservato nel nostro studio, di inibizione [51].

I cardiomiociti sono abbondanti di mitocondri, che sono la principale fonte di produzione di ROS ma sono, a loro volta, particolarmente suscettibili a questa tipologia di danno. La mitofagia, è essenziale per eliminare i mitocondri danneggiati e mantenere quelli funzionali [52]. Oltre al normale macchinario molecolare coinvolto nella macroautofagia, la mitofagia prevede la partecipazione di proteine specifiche, che funzionano come

etichette per aiutare il riconoscimento dei mitocondri danneggiati da parte di LC3 e p62.

Queste proteine includono: BCL2/adenovirus E1B 19 kDa *interactive protein 3* (Bnip3), *NIP3-like protein X* (Nix, nota anche come Bnip3L), *FUN14 domain containing 1* (FUNDC1) e cardiolipina, che sono recettori diretti di LC3 su la membrana esterna mitocondriale e *PTEN-inducibile putative kinase 1* (PINK1) e *Parkinson juvenile disease protein 2* (Parkin), che regolano l'ubiquitinazione della proteina mitocondriale e il riconoscimento da parte di p62 e LC3 [52]. Il fatto che il nostro studio riconosca la mitofagia come snodo chiave dell'effetto protettivo dei CRM è coerente con le nozioni di danno mitocondriale generato dai ROS prodotti dalla DOX e di attivazione della mitofagia come risposta a questo tipo di danneggiamento mitocondriale.

Analogamente al dibattito sull'autofagia, anche il ruolo della mitofagia nella cardiotoxicità indotta da antracicline non è chiaro. Le prove attuali supportano l'opinione che le antracicline inibiscano la mitofagia regolata da PINK1/Parkin e che il ripristino della mitofagia salvi la cardiotoxicità delle antracicline. Al contrario, l'espressione di Bnip3, un doppio marcatore di mitofagia e necrosi, risulta aumentata dalle antracicline, prima della polarizzazione mitocondriale. Inoltre, i regimi di trattamento cronico ovvero a basso dosaggio [18] [53]; e acuto quindi ad alto dosaggio [54] sono utilizzati in diversi studi, con la conseguente difficoltà di raggiungere un consenso se la mitofagia è dannosa o protettiva durante la cardiotoxicità da antraciclina.

La nostra ricerca si allinea ad altri studi presenti in letteratura dove viene messo in evidenza come il trattamento con la doxorubicina porti ad un

danno cronico che richiede un incremento della biogenesi mitocondriale per sostituire le porzioni mitocondriali danneggiate dalla stessa DOX [55] [56]. L'aumento della biogenesi mitocondriale, infatti, è stato osservato nei topi trattati con DOX che hanno ricevuto ferruginolo, un attivatore farmacologico del co-attivatore PPAR $\gamma$  1 alfa (PGC1 $\alpha$ ), il principale regolatore della biogenesi mitocondriale. L'aumento di questo co-attivatore era associato ad una maggiore ossidazione degli acidi grassi, maggiore funzione mitocondriale e una migliore integrità del miocardio [57]. Altri studi hanno dimostrato che la DOX compromette la funzione dei componenti mitocondriali fondamentali agendo sui geni codificati sia dal mtDNA che dal DNA nucleare [58]. Mutazioni con perdita di funzione nelle subunità del complesso IV codificate dal mtDNA sono state trovate nei cuori di ratti sottoposti a trattamento cronico con la DOX [59] [60], con conseguente compromissione della fosforilazione ossidativa mitocondriale, deficit energetico e stress ossidativo.

Come osservato dai nostri esperimenti su PGC1 $\alpha$ , questa ipotesi è sostenuta dal fatto che non si vede un incremento del processo di biogenesi (a differenza dei campioni trattati con DOX), nei campioni in cui le porzioni della rete mitocondriale danneggiata sono state rimosse per azione della mitofagia promossa da trealosio e spermidina.

## 6 Conclusioni

Il nostro studio ha dimostrato che la DOX media i suoi effetti citotossici anche tramite inibizione del flusso autofagico, ed in particolar modo della mitofagia.

La somministrazione di attivatori naturali dell'autofagia si è rivelata efficace nel garantire una protezione rispetto allo sviluppo di cardiotoxicità in un modello preclinico murino che risulta essere una buona trasposizione rispetto ai modelli umani.

Pertanto, i CRM rappresentano efficaci strumenti terapeutici per stimolare l'autofagia in tutte quelle patologie che è stato dimostrato siano fortemente associate ad un'inibizione del flusso autofagico.

Il nostro studio suggerisce che la stimolazione nutraceutica dell'autofagia tramite somministrazione di trealosio o spermidina può rappresentare un promettente approccio cardio-protettivo in un'ottica di futura implementazione nella pratica clinica cardioncologica.

Ulteriori studi sono incoraggiati per caratterizzare l'esatta natura del coinvolgimento dell'autofagia in questo modello di patologia.

## 7 Materiali e Metodi

### 7.1 Animali

C57BL/6J, Beclin1<sup>+/-</sup> ( B6.129P2-Becn1tm1Htz/J – codice JAX n° 028796 ) e  $\alpha$ -MHC- MitoTimer I topi<sup>+/-</sup> ( C57BL/6- Tg( Myh6-DsRed1\*/COX8A)40830Rag/J – JAX stock n° 028715 ) sono stati acquistati dai laboratori Jackson. Per gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi e femmine.

### 7.2 Anticorpi

Gli anticorpi utilizzati per l' immunoblot sono stati acquistati dalle aziende indicate: Actin -  $\beta$  (Santa Cruz sc-69879) , cl-CAS3 (Cell Signaling CS-9661), GAPDH (Cell Signaling CS-2118) , LC3 (MBL (Giappone) M186-3 e Novus Biologicals NB100-2220), p62 (Abnova AH00008878-M01), PGC- 1 $\alpha$  (Invitrogen I-PA5-38021) , Vinculin (Santa Cruz sc-25336. Gli anticorpi HRP-linked anti-mouse e anti-rabbit sono stati acquistati da Biorad e Cell Signaling Technology. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti in latte in polvere scremato al 5% in soluzione salina tamponata con Tween 20 allo 0,05% (TBST) o BSA al 5% in TBST.

### **8.3 Colorazione tricromica di Masson**

Una sezione a forma di anello del cuore appena raccolto è stata immediatamente fissata in 4% PFA, inclusa in paraffina e quindi tagliata in sezioni istologiche. I campioni sono stati reidratati gradualmente e sequenzialmente colorati con ematossilina di ferro di Weigert per 10 minuti, quindi in soluzione di fucsina di acido scarlatto di Biebrich per 15 minuti e infine nella soluzione di acido fosfomolibdico - fosfotungstico per 15 minuti. Ciascuna di queste fasi è stata seguita da una fase di 15 minuti di risciacquo in acqua calda e 10 minuti di lavaggio in acqua di rubinetto corrente. Quindi i campioni sono stati disidratati in etanolo al 95%, chiarificati in xilene e montati con un mezzo resinoso. Le immagini sono state acquisite con un microscopio D-sight ( Menarini ) in campo chiaro. La fibrosi è stata valutata utilizzando ImageJ per eseguire una deconvoluzione del colore e misurare il rapporto tra le aree di colore blu e rosso .

### **8.4 Studi gravimetrici**

I cuori interi sono stati lavati in PBS per rimuovere il sangue e quindi asciugati e pesati. La lunghezza tibiale è stata quindi misurata e utilizzata per normalizzare la misura gravimetrica alla dimensione effettiva del topo.

## 8.5 Studi *in vivo*, ecocardiografia e prelievo di tessuto

Topi eterozigoti MitoTimer , Beclin1 <sup>+/-</sup> o c57BL6/J (WT) sono stati trattati con DOX (Sigma) i.p. 1 mg/ml nei giorni 0, 7 e 14 fino a una dose cumulativa finale di 15 mg/kg. Per 6 settimane, ai topi è stata somministrata acqua, eventualmente integrata con trealosio 2% (Sigma) o saccarosio 2% (Sigma) o spermidina 3 mM (Sigma). Inoltre, i topi sono stati iniettati i.p. con trealosio al 10% 1 g/kg o 10 mg/ml di spermidina alla dose di 50 mg/kg sciolta in soluzione fisiologica tre volte alla settimana per l'intera durata del trattamento. Dopo 6 settimane dalla prima iniezione, i topi sono stati anestetizzati con Avertin al 2,5% (Sigma T48402) per eseguire analisi ecocardiografiche strutturali (misurazione della parete anteriore, della parete posteriore e del setto) e funzionali (FS) con un VEVO 3100 (Visualsonics ®) utilizzando una sonda mx550d. Quindi i topi sono stati sacrificati e il tessuto raccolto per le analisi post mortem.

## 8.6 Valutazione del flusso autofagico

Il flusso autofagico è stato studiato utilizzando due strategie definite nelle Linee guida per l'uso e l'interpretazione dei test per il monitoraggio dell'autofagia (4a edizione) [33].

*In vitro*, abbiamo infettato per 48 ore CM con un adenovirus che sovraesprimeva RFP-GFP-LC3b, quindi abbiamo trattato le cellule per 24 ore con trealosio 50 mM, seguito da 4 ore di trealosio 50 mM + DOX 50  $\mu$ M. Le cellule sono state fissate con 4% PFA a 4°C per 15 minuti, quindi lavate con PBS. Le immagini in FITC e TRITC sono state acquisite utilizzando una Nikon Eclipse Ni. I punti gialli (indicanti gli autofagosomi) e rossi (indicanti gli autolisosomi) per cella sono stati contati manualmente in 4 campi microscopici casuali indipendenti per ciascun pozzetto di un vetrino di coltura cellulare a camera (Falcon). La media dei punti/cellula per pozzetto è stata utilizzata come singola replica biologica.

*In vivo*, abbiamo somministrato trealosio e DOX utilizzando le stesse dosi descritte di seguito. Tuttavia, dopo sei settimane dalla prima iniezione di DOX, abbiamo iniettato cloroquina diluita a 1 mg/ml alla dose di 10 mg/kg e sacrificato i topi dopo 4 ore. Abbiamo estratto le proteine (come dettagliato di seguito) e misurato i livelli di LC3b-II, quindi li abbiamo normalizzati rispetto al controllo trattato con sham ( alimentato con acqua + iniezione di soluzione salina per i gruppi che non sono stati trattati con cloroquina (WN, WD, TN, TD); alimentato con acqua + soluzione salina iniettata + cloroquina iniettata per i gruppi che hanno ricevuto cloroquina ( cWN , cWD , cTN , cTD )). Il flusso autofagico è stato determinato come il



rapporto tra il valore medio normalizzato dell'intensità della banda LC3b-II del gruppo trattato con cloroquina e il rispettivo gruppo senza cloroquina ( cWN /WN, cWD /WD, cTN /TN, cTD /TD).

## 8.7 Valutazione della biogenesi mitocondriale

I topi MitoTimer <sup>+/-</sup> ( C57BL/6- Tg( Myh6-DsRed1\*/COX8A)40830Rag/J – *JAX stock n° 028715* ) sono stati trattati con DOX e trealosio (come descritto sopra) per 6 settimane, quindi sacrificati per la raccolta dei tessuti. I cuori sono stati immediatamente inclusi nel cryogel composto da OCT e congelati. Sono state preparate fette spesse 5  $\mu$ M e i campioni sono stati fissati con PFA al 4% appena preparato per 15 minuti a 4°C. Quindi i campioni sono stati analizzati con microscopia a fluorescenza ( Nikon Eclipse Ni ) a lunghezze d'onda di 488 nm e 594 nm per contare rispettivamente i punti verdi e rossi. I punti verdi corrispondono ai mitocondri prodotti di recente (< 48 ore), i punti rossi a quelli più maturi (> 48 ore). Il rapporto tra punti solo verdi e rossi è stato utilizzato per valutare la biogenesi mitocondriale.

## 8.8 Valutazione della massa mitocondriale

La massa mitocondriale è stata determinata utilizzando due diverse strategie: la somministrazione del colorante MitoTracker® Green (Thermo-Fisher) e la stima del numero di copie mitocondriali (precedentemente descritta) [62]. In breve, i cardiomiociti primari di ratto sono stati trattati per 24 ore con trealosio 50 mM, quindi con trealosio 50 mM e DOX 5, 15 o 50 µM per 24 ore. Quindi è stato somministrato MitoTracker® a concentrazione 100 nM seguendo le istruzioni del produttore per 30 minuti in terreno cellulare; La colorazione nucleare di Hoechst è stata diluita in PBS (2 µM) e incubata per 10 minuti. Le cellule sono state quindi lavate due volte in PBS e l'intensità di fluorescenza del MitoTracker® e di Hoechst è stata misurata con un lettore di micropiastre Varioskan® LUX (Thermo Scientific) utilizzando le impostazioni ex/em fornite dal produttore. Il rapporto del segnale MitoTracker® / Hoechst è stato utilizzato per la valutazione quantitativa per regolare il numero di cellule.

Inoltre, RT-qPCR è stato utilizzato per quantificare il DNA mitocondriale dopo 24 ore di trattamento dei CM con trealosio 50 mM, seguito da 24 ore di DOX 15 µM + trealosio 50 mM. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit di purificazione del DNA genomico Wizard (Promega) seguendo le istruzioni del produttore. La quantità del gene del Citocromo B è stata utilizzata per stimare la quantità di DNA mitocondriale e quindi il numero di copie mitocondriali. (Sequenza di primer mt -CytB : senso 5'-CCTTCCTACCATTTCCTGCATAC-3'; antisenso 5'-TGGCCTCCGATTCATGTTAAG-3')

## 8.9 Western Blot

Il terreno di coltura è stato rimosso e le piastre di coltura sono state lavate con PBS. Le cellule sono state raschiate in tampone di lisi RIPA ghiacciato (TRIS (pH 7,4) 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, TritonX 1%, glicerolo 10% in dd-H<sub>2</sub>O) integrato con inibitori di fosfatasi (Sigma 04906845001) e inibitori di proteasi (Sigma 11873580001). Allo stesso modo, cuori interi sono stati omogenati in 200 µl di tampone di lisi RIPA con un mortaio. Gli omogenati derivati sono stati capovolti per 1 ora a 4°C e quindi chiarificati mediante centrifugazione a 14460g per 25 minuti. I surnatanti sono stati raccolti e miscelati con 4xLaemmli (BioRad 1610747) e 2-mercaptoetanololo (2,5%). I campioni sono stati bolliti per 8 minuti.

La concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio colorimetrico Bradford (Biorad 5000001) e quindi separata utilizzando SDS-PAGE dal 6 al 15% ed elettrotrasferita su membrane di fluoruro di polivinilidene. Le membrane sono state bloccate per 90 minuti in latte in polvere scremato al 5% in Tween 20 TBS allo 0,05%, quindi l'incubazione è stata eseguita durante la notte con gli anticorpi primari menzionati in precedenza. L'anticorpo secondario anti-mouse (Cell Signaling CS-7076) e anti-rabbit (Cell Signaling CS-7074) HRP linked è stato diluito 1:2000 in tampone bloccante e incubato per 90 minuti. Le membrane sono state sviluppate con un kit di chemiluminescenza potenziato (Amersham ECL Select™ RPN2235). L'acquisizione e l'analisi densitometrica sono state eseguite con ChemiDoc e Image Lab 5.2.1 (Biorad).



## 8 Bibliografia

1. Stoltzfus, K.C.; Zhang, Y.; Sturgeon, K.; Sinoway, L.I.; Trifiletti, D.M.; Chinchilli, V.M.; Zaorsky, N.G. Fatal heart disease among cancer patients. *Nature communications* **2020**, *11*, 2011, doi:10.1038/s41467-020-15639-5
2. Wallace, K.B., V.A. Sardão, and P.J. Oliveira, *Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy*. *Circ Res*, 2020. **126**(7): p. 926-941.
3. Zamorano, J.L., et al., *2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC)*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(36): p. 2768-2801.
4. Ghigo, A., M. Li, and E. Hirsch, *New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **7**(25): p. 29.
5. Anker, M.S., et al., *Recent advances in cardio-oncology: a report from the 'Heart Failure Association 2019 and World Congress on Acute Heart Failure 2019'*. *ESC Heart Fail*, 2019. **6**(6): p. 1140-1148.
6. Wenningmann, N., et al., *Insights into Doxorubicin-induced Cardiotoxicity: Molecular Mechanisms, Preventive Strategies, and Early Monitoring*. *Mol Pharmacol*, 2019. **96**(2): p. 219-232.
7. Li, M., et al., *Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth*. *Circulation*, 2018. **138**(7): p. 696-711.
8. Saha, S., et al., *Autophagy in health and disease: A comprehensive review*. *Biomed Pharmacother*, 2018. **104**: p. 485-495.
9. King, J.S., *Mechanical stress meets autophagy: potential implications for physiology and pathology*. *Trends Mol Med*, 2012. **18**(10): p. 583-8.
10. Sciarretta, S., et al., *The Role of Autophagy in the Heart*. *Annu Rev Physiol*, 2018. **80**: p. 1-26.
11. Sciarretta, S., et al., *Pharmacological modulation of autophagy during cardiac stress*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012. **60**(3): p. 235-41.
12. Frati, G., C. Vecchione, and S. Sciarretta, *Novel Beneficial Cardiovascular Effects of Natural Activators of Autophagy*. *Circ Res*, 2018. **123**(8): p. 947-949.
13. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. *Cell*, 2008. **132**(1): p. 27-42.
14. Kaludercic, N., et al., *Comprehensive autophagy evaluation in cardiac disease models*. *Cardiovasc Res*, 2020. **116**(3): p. 483-504.
15. Koleini, N. and E. Kardami, *Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *Oncotarget*, 2017. **8**(28): p. 46663-46680.

16. Kobayashi, S., et al., *Transcription factor GATA4 inhibits doxorubicin-induced autophagy and cardiomyocyte death*. J Biol Chem, 2010. **285**(1): p. 793-804.
17. Li, D.L., et al., *Doxorubicin Blocks Cardiomyocyte Autophagic Flux by Inhibiting Lysosome Acidification*. Circulation, 2016. **133**(17): p. 1668-87.
18. Hoshino, A., et al., *Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart*. Nat Commun, 2013. **4**(2308).
19. Sciarretta, S., et al., *Caloric restriction mimetics for the treatment of cardiovascular diseases*. Cardiovasc Res, 2021. **117**(6): p. 1434-1449.
20. Duan, Q., et al., *Spermine ameliorates ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes via regulation of autophagy*. Am J Transl Res, 2016. **8**(9): p. 3976-3985.
21. Morimoto, T., et al., *The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 868-78.
22. Liu, K., et al., *Curcumin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury*. Oncotarget, 2017. **8**(67): p. 112051-112059.
23. Singh, S.R., et al., *Activation of Autophagy Ameliorates Cardiomyopathy in Mybpc3-Targeted Knockin Mice*. Circ Heart Fail, 2017. **10**(10): p. 004140.
24. Yao, Q., et al., *Curcumin protects against diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy and alleviating apoptosis*. J Mol Cell Cardiol, 2018. **124**: p. 26-34.
25. Eisenberg, T., et al., *Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine*. Nat Med, 2016. **22**(12): p. 1428-1438.
26. Kimura, S., T. Noda, and T. Yoshimori, *Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3*. Autophagy, 2007. **3**(5): p. 452-60.
27. Hernandez, G., et al., *MitoTimer: a novel tool for monitoring mitochondrial turnover*. Autophagy, 2013. **9**(11): p. 1852-61.
28. Goffart, S. and R.J. Wiesner, *Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis*. Exp Physiol, 2003. **88**(1): p. 33-40.
29. Buss, S.J., et al., *Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(25): p. 2435-46.
30. Flynn, J.M., et al., *Late-life rapamycin treatment reverses age-related heart dysfunction*. Aging Cell, 2013. **12**(5): p. 851-62.
31. Kanamori, H., et al., *Resveratrol reverses remodeling in hearts with large, old myocardial infarctions through enhanced autophagy-activating AMP kinase pathway*. Am J Pathol, 2013. **182**(3): p. 701-13.
32. Wang, B., et al., *Resveratrol-enhanced autophagic flux ameliorates myocardial oxidative stress injury in diabetic mice*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(8): p. 1599-611.
33. Klionsky, D.J., et al., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)(1)*. Autophagy, 2021. **17**(1): p. 1-382.

34. Katayama, H., et al., *A sensitive and quantitative technique for detecting autophagic events based on lysosomal delivery*. Chem Biol, 2011. **18**(8): p. 1042-52.
35. McWilliams, T.G., et al., *mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo*. J Cell Biol, 2016. **214**(3): p. 333-45.
36. Mizushima, N., et al., *Autophagy fights disease through cellular self-digestion*. Nature, 2008. **451**(7182): p. 1069-75.
37. Mizushima, N. and M. Komatsu, *Autophagy: renovation of cells and tissues*. Cell, 2011. **147**(4): p. 728-41.
38. Sciarretta, S., et al., *New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System*. Circ Res, 2018. **122**(3): p. 489-505.
39. Sciarretta, S., et al., *Trehalose-Induced Activation of Autophagy Improves Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction*. J Am Coll Cardiol, 2018. **71**(18): p. 1999-2010.
40. Liu, Y. and B. Levine, *Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy*. Cell Death Differ, 2015. **22**(3): p. 367-76.
41. Zhang, Y., et al., *Overexpression of Nrdp1 in the heart exacerbates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. 27.
42. Zhang, Q.L., J.J. Yang, and H.S. Zhang, *Carvedilol (CAR) combined with carnosic acid (CAA) attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing excessive oxidative stress, inflammation, apoptosis and autophagy*. Biomed Pharmacother, 2019. **109**: p. 71-83.
43. Wang, X., et al., *Ghrelin inhibits doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting excessive autophagy through AMPK and p38-MAPK*. Biochem Pharmacol, 2014. **88**(3): p. 334-50.
44. Luo, P., et al., *HMGB1 contributes to adriamycin-induced cardiotoxicity via up-regulating autophagy*. Toxicol Lett, 2018. **292**: p. 115-122.
45. Kawaguchi, T., et al., *Prior starvation mitigates acute doxorubicin cardiotoxicity through restoration of autophagy in affected cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2012. **96**(3): p. 456-65.
46. Sishi, B.J., et al., *Autophagy upregulation promotes survival and attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Biochem Pharmacol, 2013. **85**(1): p. 124-34.
47. Dutta, D., et al., *Calorie restriction combined with resveratrol induces autophagy and protects 26-month-old rat hearts from doxorubicin-induced toxicity*. Free Radic Biol Med, 2014. **74**: p. 252-62.
48. Song, R., et al., *HDAC6 inhibition protects cardiomyocytes against doxorubicin-induced acute damage by improving  $\alpha$ -tubulin acetylation*. J Mol Cell Cardiol, 2018. **124**: p. 58-69.
49. He, H., et al., *Epigallocatechin-3-gallate pretreatment alleviates doxorubicin-induced ferroptosis and cardiotoxicity by upregulating AMPK $\alpha$ 2 and activating adaptive autophagy*. Redox Biol, 2021. **48**(102185): p. 102185.

50. Li, M., et al., *Autophagy and cancer therapy cardiotoxicity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020. **3**(118493): p. 22.
51. Schirone, L., et al., *Mitochondria and Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: A Complex Interplay*. *Cells*, 2022. **11**(13).
52. Saito, T. and J. Sadoshima, *Molecular mechanisms of mitochondrial autophagy/mitophagy in the heart*. *Circ Res*, 2015. **116**(8): p. 1477-90.
53. Hull, T.D., et al., *Heme oxygenase-1 regulates mitochondrial quality control in the heart*. *JCI Insight*, 2016. **1**(2): p. 85817.
54. Dhingra, R., et al., *Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(51): p. 8.
55. Lebrecht, D., et al., *Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin*. *J Pathol*, 2005. **207**(4): p. 436-44.
56. Ferreira, A., et al., *Altered mitochondrial epigenetics associated with subchronic doxorubicin cardiotoxicity*. *Toxicology*, 2017. **390**: p. 63-73.
57. Li, W., et al., *Ferruginol Restores SIRT1-PGC-1 $\alpha$ -Mediated Mitochondrial Biogenesis and Fatty Acid Oxidation for the Treatment of DOX-Induced Cardiotoxicity*. *Front Pharmacol*, 2021. **12**(773834).
58. Adachi, K., et al., *A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **195**(2): p. 945-51.
59. Lebrecht, D., et al., *Time-dependent and tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in chronic doxorubicin cardiomyopathy*. *Circulation*, 2003. **108**(19): p. 2423-9.
60. Serrano, J., et al., *Cardioselective and cumulative oxidation of mitochondrial DNA following subchronic doxorubicin administration*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **21**(1): p. 201-5.
61. Forte, M., et al., *Pharmacological restoration of autophagy reduces hypertension-related stroke occurrence*. *Autophagy*, 2020. **16**(8): p. 1468-1481.
62. Ikeda, Y; Sciarretta, S; Nagarajan, N; Rubattu, S; Volpe, M; Frati, G; Sadoshima, J. *New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **210934**(10): p.15.

Il presente documento è distribuito secondo la licenza: Tutti i diritti riservati.