

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE
CURRICULUM IN SCIENZE MEDICHE TRASLAZIONALI

XXXII Ciclo
(Anni 2017-2020)

Coordinatore: Prof. Francesco Beguinot

TESI DI DOTTORATO

TITOLO

**La Fenilalanina-Butirrammide, un nuovo derivato dell'Acido
Butirrico, previene la cardiotossicità indotta dalla doxorubicina.**

RELATORE

Chiar.mo
Prof. Carlo Gabriele Tocchetti

CANDIDATO

Dott. Russo Michele

INDICE

1. ABSTRACT	4
2. INTRODUZIONE	5
3. SCOPO	8
4. MATERIALI E METODI	9
4.1 Trattamenti in vivo con Doxorubicina.....	9
4.2 Ecocardiografia transtoracica	9
4.3 Analisi immunoistologiche.....	10
4.4 Valutazione della fibrosi interstiziale	10
4.5 Saggio TUNEL	10
4.6 Analisi dell'atrofia cardiaca	10
4.7 Real Time PCR.....	11
4.8 Western Blot.....	11
4.9 Isolamento dei Mitocondri.....	12
4.10 Valutazione di marcatori per danni ossidativi ed enzimi antiossidanti ...	12
4.11 Misurazione dei parametri funzionali mitocondriali.....	13
4.12 Coltura cellulare	14
4.13 Saggio della Lattato Deidrogenasi.....	14
4.14 Saggio della MTT	15
4.15 Analisi statistica	15
5. RISULTATI	16
5.1 Il pretrattamento con FBA previene la disfunzione del ventricolo sinistro indotto dalla DOXO	16
5.2 L'FBA previene il danno e rimodellamento cardiaco indotto dalla DOXO	17
5.3 L'FBA contrasta l'aumento di ANP, BNP, CTGF e MMP-2 indotto dalla DOXO	17
5.4 L'FBA previene l'incremento dello stress ossidativo e nitrosativo indotto dalla DOXO	18
5.5 L' FBA protegge dalla disfunzione mitocondriale indotta dalla DOXO....	18

<i>5.6 L'FBA riduce il danno dalla DOXO in modelli cellulari umani non tumorali e aumenta l'azione tumoricida del chemioterapico in modello cellulare umano di tumore alla mammella.....</i>	<i>19</i>
6. DISCUSSIONE	21
7. CONCLUSIONI.....	24
8. REFERENZE.....	25
9. IMMAGINI.....	29

1. ABSTRACT

Con i progressi della medicina moderna e l'innalzarsi della sopravvivenza dal cancro, un numero sempre più crescente di pazienti è a rischio di sviluppare una cardiotoxicità da farmaci antitumorali. Le Antracicline (ANTs), e in particolare la Doxorubicina (DOXO), continuano ad essere i farmaci più utilizzati nel trattamento di numerosi tumori per la loro elevata efficacia, nonostante il loro spiccato effetto cardiotossico. Sebbene numerose strategie terapeutiche sono state provate per ridurre, prevenire o attenuare l'effetto cardiotossico indotto dalle ANTs, nessuna di queste ha mostrato tutt'ora un'efficacia univoca, rendendo necessari ulteriori studi in questo ambito.

Recentemente, il ruolo del microbiota intestinale ha suscitato notevole interesse per il suo impatto nello sviluppo di molteplici patologie cardiovascolari. In particolare, l'acido Butirrico (BUT), un acido grasso a catena corta prodotto quotidianamente dal microbiota intestinale, è stato dimostrato esercitare molteplici effetti benefici in diversi modelli di malattie cardiovascolari.

In questo lavoro abbiamo valutato in vivo l'effetto della Fenilalanina-Butirramide (FBA), un derivato sintetico del BUT, nel prevenire la cardiotoxicità indotta dalla DOXO.

In topi C57BL6, la DOXO produce un rimodellamento cardiaco e dilatazione del ventricolo sinistro a seguito di un aumentato stress nitrosativo e ossidativo indotto da un'alterata funzionalità mitocondriale. Il co-trattamento con FBA previene tali alterazioni preservando la funzionalità mitocondriale e riducendo lo stress ossidativo indotto dalla DOXO. Inoltre, dati preliminari ottenuti *in vitro* su modelli cellulari umani aprono interessanti prospettive sull'effettiva potenzialità traslazionale dell'FBA nella pratica clinica.

2. INTRODUZIONE

L'insorgenza di complicazioni cardiovascolari durante il trattamento con farmaci antineoplastici è al momento una delle più grandi limitazioni per i pazienti oncologici [1-3], rappresentando un importante problema clinico durante e dopo il trattamento stesso. Le Antracicline (ANTs) sono da sempre utilizzate come farmaci di prima scelta nel trattamento di numerosi tipi di tumore, come tumori solidi, leucemie, linfomi e il cancro della mammella, nonostante siano ben noti i loro effetti cardiotossici [4]. Pazienti trattati con ANTs, infatti, mostrano una progressiva dilatazione cardiaca e disfunzione contrattile che sfocia, in ultimo, nello scompenso cardiaco, anche ad un anno dalla sospensione dal regime terapeutico. Attualmente, numerose strategie sono in corso di sviluppo per ridurre, prevenire o attenuare la cardiotossicità indotta dal trattamento con ANTs. Nonostante la riduzione della dose di ANTs e l'utilizzo di farmaci gold-standard per il trattamento dello scompenso cardiaco sono attualmente utilizzati per limitare la cardiotossicità, l'efficacia di queste strategie è ridotta e l'interesse della comunità scientifica si è da sempre focalizzata sull'introduzione di farmaci antiossidanti. L'utilizzo del Dexrazoxano [5] è stato clinicamente valutato in bambini con leucemia linfoblastica acuta trattati con doxorubicina (DOXO), i quali mostravano un ridotto danno al miocardio, come indicato dalla riduzione dei livelli plasmatici di Troponina T [6]. Nonostante ciò, l'effetto del Dexrazoxano è stato fortemente dibattuto, specialmente in ambito pediatrico, per l'associazione con un aumentato rischio di infezioni, mielosoppressione e la comparsa di ulteriori neoplasie primarie. Fino ad oggi però, numerosi studi hanno categoricamente sconfessato tali evidenze, confermando l'effettiva efficacia cardioprotettiva del Dexrazoxano in pazienti pediatrici e adulti soggetti a cicli con elevati dosi di DOXO [7]. Nonostante ciò, nessuna di queste strategie precedentemente citate è univocamente consigliata, sollecitando la necessità di ulteriori studi a riguardo [8].

Recentemente, sempre più evidenze promuovono il microbiota intestinale come un nuovo promettente target nello sviluppo di nuovi approcci terapeutici per il trattamento di patologie croniche, includendo quelle cardiovascolari [9]. Approcci tecnologicamente sempre più avanzati nello studio delle interazioni tra ospite-microbioma, come la metabolomica e la metagenomica, hanno permesso di

mettere in evidenza l'importante effetto di numerosi metaboliti prodotti dal nostro microbiota intestinale a partire da macromolecole assunte durante la dieta [10]. La loro secrezione, degradazione o modificazione ad opera di differenti vie metaboliche attive nella flora batterica intestinale possono, in maniera diretta o indiretta, avere un effetto sistemico sul nostro organismo, promuovendo il microbiota intestinale come nuovo e indipendente sistema endocrino [11].

In particolare, la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFAs) durante la fermentazione anaerobica delle fibre da parte del microbiota intestinale, come l'acetato, il propionato e l'acido butirrico (BUT), ha destato grande interesse per il suo impatto sul sistema cardiovascolare [12]. Tra queste il BUT, è noto essere la principale fonte di sostentamento per le cellule epiteliali intestinali [13] e molteplici studi sperimentali hanno messo in evidenza i numerosi effetti benefici del BUT sul sistema cardiovascolare quando somministrato per via esogena [14-17]. Il principale effetto del BUT è quello di esercitare importanti effetti epigenetici, agendo come un potente inibitore delle HDAC (iHDACs), che è noto esercitare un effetto protettivo durante il processo d'ipertrofia e ischemia [18]. Molto interessanti sono invece degli studi condotti da Rephaeli e colleghi in cui è stato evidenziato il duplice ruolo del BUT e i suoi analoghi sintetici, nel proteggere le cellule cardiache dalla tossicità mediata dalla DOXO e contemporaneamente sinergizzare l'azione citotossica del chemioterapico [15].

Nonostante questi promettenti risultati preliminari, l'introduzione del BUT nella pratica clinica è fortemente compromessa per le sue scarse proprietà organolettiche (per esempio il suo intenso odore di formaggio stagionato) e la sua rapida degradazione a livello sistemico, che ne abbassa considerevolmente la biodisponibilità ed il profilo farmacocinetico. Lo sviluppo di nuove molecole simili al BUT che possano ovviare alle sue limitazioni farmacocinetiche ha suscitato pertanto un notevole interesse.

La Fenilalanina-Butirrammide (FBA), un nuovo derivato sintetico del BUT [19], presenta un profilo tossicologico comparabile alla molecola originaria, ma totalmente insapore e inodore, rendendola così adoperabile per un ampio spettro di condizioni, incluse le patologie cardiovascolari [20]. Inoltre, è stato dimostrato che l'FBA è in grado di modulare le funzioni mitocondriali,

promuovendola come un nuovo approccio terapeutico contro obesità e insulino-resistenza [21].

3. SCOPO

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare se il nuovo derivato del BUT, l'FBA, protegge dalla cardiotoxicità indotta dalla DOXO, andando a prevenire lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale indotte dal trattamento chemioterapico. A tale scopo, topi C57BL6 sono stati trattati con DOXO con o in assenza di pretrattamento con FBA e la loro funzionalità cardiaca valutata sia *in vivo* che *ex vivo*.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Trattamenti *in vivo* con DOXO

Topi C57Bl/6 di 2-4 mesi (Envigo Srl Italy, San Pietro al Natisone, Udine, Italia) sono stati iniettati con una dose cumulativa di 7mg/Kg di DOXO attraverso 7 iniezioni intraperitoneali (i.p.) giornaliere (1mg/Kg/die) (gruppo DOXO). Nessuna mortalità è stata associata con questo regime posologico. Un secondo gruppo di topi è stato trattato con FBA (US patent US 2011 00983.19A1; 28 April 2011) (30 mg/Kg/die) [22, 23], giornalmente per 21 giorni (Gruppo FBA). Un terzo gruppo di topi, dopo 14 giorni di trattamento con FBA, è stato co-trattato con FBA (somministrato 1 ora prima della iniezione i.p. di DOXO) e DOXO, allo stesso dosaggio usato per il gruppo DOXO (gruppo FBA+DOXO). Animali SHAM, iniettati i.p. con soluzione salina e oralmente con placebo, sono stati usati come controllo (Figura 1). Per le analisi *ex vivo*, gli animali sono stati sacrificati previa traslocazione cervicale previa anestesia con Tiletamina (0.09mg/g), Zolazepam (0.09mg/g), e 0.01% Xilazina (0.04 mL/g); i cuori sono stati escissi e processato per ulteriori studi. 10 animali per gruppo sono stati utilizzati per tutte le analisi.

4.2 Ecocardiografia transtoracica

La funzionalità cardiaca *in vivo* è stata valutata tramite un'ecocardiografia transtoracica in topi C57Bl/6 anestetizzati, utilizzando una strumentazione ecocardiografica *Vevo 770 High Resolution In Vivo Micro-Imaging System* (VisualSonics, Toronto, ON, Canada, 40 MHz transducer). La funzionalità cardiaca è stata valutata attraverso un'ecocardiografia non invasiva in condizioni basali e ripetuta poi al 3° ed al 7° giorno di somministrazione di DOXO per quanto riguarda il gruppo DOXO ed al 14°, 17° e 21° giorno per quanto riguarda i gruppi FBA e FBA+DOXO. L'ecocardiogramma del ventricolo sinistro è stato effettuato sia in asse lungo che asse corto, ad una risoluzione di 233 Hz. Le dimensioni ventricolari al termine della fase sistolica (*end-systolic*) e diastolica (*end-diastolic*) sono state definite all'ECG come le fasi corrispondenti all'onda T e onda R, rispettivamente. Le misurazioni in M-mode sulle *LV end-systolic dimensions* (LVESDs) e *LV end-diastolic dimensions* (LVEDDs) sono state effettuate su 3-5 battiti per animale, all'altezza dei muscoli papillare. Il *Fractional Shortening* (FS) è stato calcolato

come [(LVEDD-LVESD)/LVEDD] x100 [24]. Studi e analisi sono stati eseguiti in cieco rispetto alle condizioni cardiache. Gli esperimenti qui descritti sono stati condotti in conformità con le normative italiane per la sperimentazione sugli animali. Tutti gli esperimenti in vivo sono stati condotti con l'approvazione del comitato etico e hanno soddisfatto gli standard richiesti dalla Direttiva 2010/63 / UE del Parlamento europeo.

4.3 Analisi immunoistologiche

I cuori di ogni gruppo sono stati rapidamente escissi, lavati in *phosphate-buffered saline* (PBS, Sigma-Aldrich, D8537) e fissati in formalina al 4% *overnight* (ON) e inclusi in paraffina. I cuori sono stati successivamente tagliati in sezioni dallo spessore di 5µm poste su vetrini e conservate per le successive analisi.

4.4 Valutazione della fibrosi interstiziale

La fibrosi interstiziale è stata analizzata attraverso una colorazione con *PicroSirius Red*. Brevemente, le sezioni di cuore sono state deparaffinate, reidratate e incubate in una soluzione acquosa satura di acido picrico (Fluka, Buchs, Svizzera) 0,1% *PicroSirius Red* (Fluka, Buchs, Switzerland) per 1 ora. Le sezioni sono state poi lavate per 2 secondi in una soluzione acquosa acidificata 0,5% acido acetico glaciale, deidratate e montate. La percentuale delle aree fibrotiche positive alla colorazione rossa è stata quantificata e analizzata usando il software *ImageJ*. La percentuale della fibrosi sull'area totale della sezione è stata valutata su 5 sezioni per ogni cuore.

4.5 Saggio TUNEL

L'analisi *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling* (TUNEL) è stata usata per valutare l'apoptosi cardiaca, in accordo con il protocollo fornito dal fornitore (*in situ cell death detection Kit*, Roche Applied Science, Penzberg, Germany). L'apoptosi è indicata come il rapporto tra le i nuclei TUNEL positivi/Nuclei totali colorati con *DAPI* in 5 immagini per ogni cuore.

4.6 Analisi dell'atrofia cardiaca

L'atrofia cardiaca è stata valutata attraverso una colorazione ematossilina/eosina. Le sezioni di cuore sono state deparaffinate, reidratate e incubate per 30 secondi in eosina e 30 secondi in ematossilina, per una colorazione citoplasmatica e nucleare rispettivamente. Le sezioni sono state poi deidratate e

montate per l'analisi delle dimensioni cellulari attraverso il software *ImageJ*, valutata su 5 sezioni per ogni cuore.

4.7 Real Time PCR

L'RNA totale è stato isolato dai cuori dei topi utilizzando il *Trizol Reagent kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e quantificato usando il *Nanodrop 2000c spectrophotometer* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Per la sintesi del cDNA, 1µg di RNA totale è stato retro-trascritto usando l'*High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in accordo con il protocollo fornito dal kit. L'analisi di *quantitative Real Time PCR* (qRT-PCR) per il peptide natriuretico atriale (ANP), peptide natriuretico di tipo B (BNP), fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) e metalloproteasi di matrice 2 (MMP-2) è stata effettuata utilizzando sonde TaqMan specifiche (Applied Biosystems, Grand Island, NY, USA).

I campioni sono stati analizzati in triplicato a 95°C per 30 secondi e successivamente per 40 cicli a 95°C per 10 secondi e 60°C per 30 secondi, usando il *Light Cycler 7900 HT* (Applied Biosystems). La quantificazione dell'espressione genica è stata effettuata utilizzando il metodo di comparazione dei cicli soglia (*threshold cycle*, CT) e normalizzata usando l'mRNA della β -Actina come gene reporter.

4.8 Western Blot

Il tessuto cardiaco è stato omogeneizzato e la concentrazione proteica è stata stimata attraverso il *Bio-Rad protein assay*, usando concentrazioni note di *fatty acid-free bovine serum albumin* (BSA) come standard. Gli estratti totali di proteine (50 µg) sono stati separati su un gel elettroforesi SDS-poliacrilamide e trasferiti poi su una membrana di nitrocellulosa (240 mA per 40 minuti a temperatura ambiente). Il filtro è stato poi incubato con anticorpi *anti-nitric oxide synthase* (iNOS; diluito 1:1000; cat. no. 610204, BD Biosciences, Milan, Italy), *anti-3-nitrotyrosine* (diluito 1:5000; cat. no. 06-284, EMD Millipore Corporation, Temecula, CA, USA) e *anti-catalase* (diluito 1:1000; cat no. 14097, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) a 4°C ON in PBS 1x, 3% latte e 0,1% Tween 20. L'anticorpo secondario è stato incubato per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente il filtro è stato lavato 3 volte in PBS 1x, 0,1% Tween 20 per 10 minuti a temperatura

ambiente e sviluppato usando il *chemiluminescence detection reagents* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) in accordo con il protocollo fornito dal kit. Le immagini sono visualizzate utilizzando il software *Image Quant* (GE Healthcare, Milan, Italy) e le bande proteiche individuate sono state analizzate con il software *GS-700 imaging densitometer* (Bio-Rad Laboratories, Milan, Italy). L'omogeneità nella quantità di proteina caricata è stata effettuata utilizzando un anticorpo *anti-β-actin* (Sigma-Aldrich, Milan, Italy).

4.9 Isolamento dei Mitocondri

I cuori sono stati finemente sminuzzati e lavati in un mezzo contenente 100 mM KCl, 50 mM Tris pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 g/L BSA. I frammenti di tessuto sono stati trattati con la proteasi Nagarse (E.C. 3.4.21.62; 1 mg/g tissue) per 5 minuti, lavati, omogeneizzati per 1 minuto con il mezzo precedentemente descritto (1:8, wt/v) in un omogeneizzatore *Potter Elvehjem* (Heidolph, Kelheim, Germany) a 500 rpm e filtrati. L'omogenato è stato centrifugato a 3000 g per 10 minuti, il pellet di mitocondri così ottenuto è stato lavato 2 volte e risospeso in un mezzo contenente 250 mM saccarosio, 50 mM Tris pH 7.5, 1 g/L BSA e centrifugato a 700g per 10 minuti. Il surnatante così ottenuto è stato di nuovo centrifugato a 3000 g per 10 minuti. Il pellet mitocondriale è stato risospeso in un tampone contenente LiCl 80 mM, HEPES 50 mM, Tris P 5 mM, EGTA 1 mM, 0,1% (peso/volume) di BSA a pH 7.0. Le proteine contenute nella sospensione mitocondriale sono state determinate attraverso il metodo di Hartree [25] usando una curva di taratura creata con concentrazioni note di BSA come controllo standard. I mitocondri isolati sono stati poi usati per la determinazione dei parametri respiratori.

4.10 Valutazione di marcatori per danni ossidativi ed enzimi antiossidanti

Il tasso di rilascio di H₂O₂ mitocondriale è stato misurato spettrofotometricamente, seguendo il lineare incremento della fluorescenza (eccitazione 312 nm, emissione 420 nm) dovuto all'ossidazione dell'acido omovanillico in presenza della perossidasi di rafano [26]. L'attività della Superossido Dismutasi (SOD) è stata misurata in un mezzo contenente 0,1 mM EDTA, 2mM KCN, 50 mM KH₂PO₄, 20 mM citocromo C, 5 mM Xantina, 0,01 U di Xantina Ossidasi con pH 7,8. La determinazione dell'attività enzimatica è stata

determinata spettrofotometricamente (550nm) a temperatura controllata (25°C), monitorando la riduzione dei livelli di citocromo C ridotto dai radicali superossido, generati dal sistema Xantina-Xantina Ossidasi. Una unità di attività enzimatica della SOD è definita come la concentrazione di enzima che inibisce del 50% la riduzione del citocromo C in presenza di Xantina+Xantina Ossidasi [27].

4.11 Misurazione dei parametri funzionali mitocondriali

I mitocondri isolati dal tessuto cardiaco sono stati utilizzati per valutare il consumo d'ossigeno polarograficamente, mediante l'utilizzo dell'elettrodo di Clark (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Oh, USA). Tale elettrodo è costituito da un catodo di platino e da un anodo d'argento, entrambi immersi in una soluzione di KCl (0,1M) e separati dalla soluzione in esame, tramite una membrana. L'ossigeno diffonde attraverso la membrana dalla soluzione presente nella camera di misura al compartimento dell'elettrodo. In tal modo, l'ossigeno al catodo si riduce e origina una corrente proporzionale all'attività dell'ossigeno presente in soluzione, nel momento in cui è applicato agli elettrodi un voltaggio di 0.5 – 0.8 Volts. All'anodo, infatti, sono prodotti quattro elettroni a loro volta utilizzati per ridurre una molecola di ossigeno al catodo. La tensione di ossigeno al catodo, quindi, tende ad azzerarsi promuovendo la diffusione dell'ossigeno verso il catodo. L'elettrodo di Clark consente, quindi, di misurare i rapidi cambiamenti che si riscontrano nell'utilizzazione dell'ossigeno da parte dei sistemi cellulari e subcellulari.

Le misure sono state realizzate in camere termostate ad una temperatura di 30°C utilizzando, per il fegato, un mezzo di incubazione contenente KCl 80 mM, Hepes 50 mM, EGTA 1 mM, K₂HPO₄ 5 mM, pH 7.0, 0.1% (p/v) di BSA.

Prima di procedere alla misura del consumo di ossigeno, i mitocondri sono indotti a consumare i substrati endogeni, mediante una preincubazione di qualche minuto, alla fine della quale sono aggiunti i substrati respiratori, quali Succinato 10 mM + Rotenone 3,75 µM o Piruvato 2,5mM + Malato 5mM. Le misurazioni della respirazione mitocondriale durante lo Stato 3 sono state effettuate in presenza di 0,6 mM di ADP, quelle dello Stato 4 a seguito dell'esaurimento di ADP. Il tasso di controllo respiratorio (RCR), calcolato dal rapporto tra Stato 3 e Stato 4, è indicativo dell'alta qualità nella preparazione dei mitocondri (dati non mostrati).

Il grado di accoppiamento termodinamico è stato determinato nel cuore, applicando l'equazione di Cairns *et al.* [28]: Grado di accoppiamento = $[1 - (Jo)_{sh}/(Jo)_{unc}]^{1/2}$ dove $(Jo)_{sh}$ rappresenta il tasso di consumo d'ossigeno in presenza della Oligomicina che inibisce l'ATP sintetasi, e $(Jo)_{unc}$ è il tasso disaccoppiato del consumo di ossigeno indotto dalla *carbonyl cyanide trifluoro-methoxy-phenylhydrazone* (FCCP), la quale dissipa il gradiente protonico transmitocondriale. $(Jo)_{sh}$ e $(Jo)_{unc}$ sono stati misurati come sopra indicato, usando succinato (10 mM), Rotenone (3,75 μ M), in presenza di Oligomicina (2 μ g/mL) o FCCP (1 μ M), rispettivamente.

4.12 Coltura cellulare

I cardiomiociti derivanti da cellule staminali umane pluripotenti indotte (hiPSC) sono state acquistate da *Ncardia* (Cor.4U cardiomyocytes, Ax-B-HC02-MPC, Cologne, Germany) e conservate in azoto liquido in aliquote di almeno 1×10^6 cellule ciascuna. Le cellule endoteliali umane derivanti dalla vena ombelicale (HUVEC) sono state acquistate dall' *American Type Culture Collection* (ATCC) e cresciute nel mezzo di coltura *Endothelial Growth Medium* (EGM). Le cellule di tumore alla mammella, MCF-7, sono state acquistate dall'ATCC e cresciute in mezzo di coltura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), supplemento al 10% con siero fetale bovino (FBS).

4.13 Saggio della Lattato Deidrogenasi

Il rilascio di Lattato Deidrogenasi (LDH) è stato misurato con il *Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit* (Termofisher™ #88954). Le cellule sono state scongelate in accordo con il protocollo standard fornito dal produttore e piastrate ad una densità di 35×10^3 cellule/pozzetto in una piastra cellulare da 96 pozzetti rivestita con 10 μ g/mL di fibronectina bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) disciolta in PBS con Calcio e Magnesio (DPBS Sigma-Aldrich, D8662) dopo un'incubazione overnight a 4°C. Le cellule sono cresciute in *Cor.4U Culture Media* (Ncardia) ed il mezzo è stato cambiato giornalmente per 2 giorni prima di effettuare l'esperimento. Le cellule sono state pretrattate per 12h con FBA (2mM) o DMSO come controllo e dopo esposte alla DOXO ad una concentrazione di (1 μ M) per 24 h. L'attività della LDH extracellulare è stata analizzata in accordo con le istruzioni fornite dal fornitore. In breve, tutto i trattamenti sono stati effettuati in un volume

finale di 100 μ L ed un egual volume di mix di reazione è stato aggiunto, seguito da un'incubazione al buio per 30 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza è stata misurata a 490 nm utilizzando il *GloMax 96-well plate reader*. L'aumento di assorbanza è direttamente proporzionale all'attività della LDH rilasciata nel mezzo di coltura. La lettura dell'attività della LDH in mezzo di coltura in assenza di cardiomiociti è stata considerata come valore basale.

4.14 Saggio della MTT

La vitalità cellulare dopo i trattamenti concentrazione e tempo dipendenti è stata misurata utilizzando il classico saggio dell'MTT [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*]. Tutti i trattamenti sono stati effettuati su 3×10^4 cellule/pozzetto in una piastra da 24 pozzetti dopo un periodo di adattamento alla messa in coltura di 24 ore. Il mezzo di coltura è stato poi rimosso e ripristinato con diverse dosi di FBA e DOXO, in trattamento singolo o in combinazione, per 3 giorni. Per i trattamenti in combinazione, l'FBA è stato amministrato 12 ore prima della DOXO per valutarne l'effetto protettivo. All'ultimo giorno, dopo aver rimosso il surnatante da ogni pozzetto e aver lavato con PBS, 20 μ L di una soluzione con MTT (5 mg/L in PBS) è stato aggiunto e 100 μ L di mezzo è stato aggiunto. Dopo l'incubazione per un'altra ora, i cristalli di formazano risultanti, sono stati disciolti in 100 μ L di DMSO e l'intensità dell'assorbanza è stata misurata con un *microplate reader* (BioTek, USA) a 490 nm con una lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato, e la relativa vitalità cellulare (%) è stata espressa in percentuale relativa rispetto al campione cellulare non trattato.

4.15 Analisi statistica

I dati sono presentati come media \pm errore standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando *Prism 5* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Per la maggior parte degli studi, le differenze tra i gruppi sono state valutate dal test t di Student, ANOVA ad una via o ANOVA a due vie, a seconda dei casi, seguito da Bonferroni test post hoc. La significatività statistica è stata definita come $P < 0,05$, se non diversamente specificato.

5. RISULTATI

5.1 Il pretrattamento con FBA previene la disfunzione del ventricolo sinistro indotto dalla DOXO.

Come primo approccio, abbiamo testato la capacità dell'FBA nel prevenire il danno cardiaco indotto dalla DOXO. A questo scopo abbiamo suddiviso in maniera casuale i topi in 4 diversi gruppi, composto da 10 unità ognuno. Un primo gruppo di animali è stato trattato con iniezioni intraperitoneali di DOXO ad una dose giornaliera di 1 mg/Kg per 7 giorni, per valutare l'effetto del chemioterapico in singolo (Gruppo DOXO). Un secondo gruppo di animali è stato pretrattato per 14 giorni con una somministrazione orale di FBA ad una dose giornaliera di 30 mg/Kg, prima di essere trattato per una settimana con DOXO (Gruppo FBA+DOXO). Gli animali hanno ricevuto la stessa dose di DOXO del gruppo DOXO e il chemioterapico è stato iniettato un'ora dopo l'ultima somministrazione orale di FBA. Un terzo gruppo di animali ha ricevuto il solo trattamento orale di FBA per 21 giorni (Gruppo FBA), mentre topi riceventi iniezioni i.p. di soluzione salina e veicolo dell'FBA sono stati usati come controllo (Gruppo SHAM) (Figura 1).

Dopo 7 giorni di trattamento con DOXO, l'analisi ecocardiografica transtoracica in vivo ha evidenziato la dilatazione del ventricolo sinistro: *Left Ventricular end-diastolic volume* (LVEDV) $51.31 \pm 0.32 \text{ mm}^3$ Vs. $44.40 \pm 2.19 \text{ mm}^3$ SHAM ($P < 0.05$); *Left Ventricular end-systolic volume* (LVESV) $12.70 \pm 1.62 \text{ mm}^3$ Vs. $7.11 \pm 0.51 \text{ mm}^3$ SHAM ($P < 0.0005$); *Left Ventricular end-diastolic internal dimension* (LVIDd) $3.28 \pm 0.07 \text{ mm}$ Vs. $3.52 \pm 0.01 \text{ mm}$ SHAM ($P < 0.005$) (Figure 2).

In maniera molto interessante, il pretrattamento con FBA inibisce in maniera significativa il rimodellamento del ventricolo sinistro indotto dalla DOXO (Figura 2), come confermato dagli stessi parametri ecocardiografici, che risultano essere considerevolmente ridotti nei topi del Gruppo FBA+DOXO rispetto al gruppo DOXO: LVEDV $43.84 \pm 2.61 \text{ mm}^3$ ($P < 0,05$); LVESV $7.24 \pm 0.35 \text{ mm}^3$ ($P < 0,0005$); LVIDd $3.20 \pm 0.03 \text{ mm}$ ($P < 0,0005$). I topi trattati con solo FBA non mostravano differenze significative rapportati al gruppo SHAM (Figura 2). In definitiva,

l'analisi ecocardiografica conferma l'effetto protettivo dell'FBA, andando a prevenire l'allargamento della camera ventricolare sinistra indotto dalla DOXO.

5.2 L'FBA previene il danno e rimodellamento cardiaco indotto dalla DOXO.

Successivamente, l'analisi di tre marcatori caratteristici della cardiotossicità da DOXO, quali fibrosi cardiaca, atrofia e apoptosi dei cardiomiociti sono state analizzate ex-vivo dai cuori espianati dai topi dei diversi gruppi. La colorazione tissutale con PicroSirius red mostra un significativo, ma modesto, aumento della fibrosi interstiziale nel cuore dei topi trattati con DOXO, che risulta ridotta dalla co-somministrazione di FBA (Figura 3A). In maniera simile, l'FBA previene l'atrofia cardiaca indotta dalla DOXO (Figura 3B). In linea con questi risultati, il pretrattamento con FBA riduce anche il tasso di apoptosi indotto dalla DOXO (Figura 3C). Messi insieme, confermano l'effetto cardioprotettivo dell'FBA, andando a inibire il rimodellamento del tessuto muscolare cardiaco innescato dalla DOXO.

5.3 L'FBA contrasta l'aumento di ANP, BNP, CTGF e MMP-2 indotto dalla DOXO.

I cuori sono stati anche processati per l'analisi d'espressione di mRNA e detenzione di alterazioni metaboliche cardiache. L'espressione del gene del peptide natriuretico atriale (ANP) e peptide natriuretico di tipo B (BNP), due marcatori di disfunzione cardiaca, sono notevolmente aumentati nel gruppo DOXO rispetto al gruppo SHAM. La somministrazione orale con FBA previene tale effetto, rispetto al gruppo DOXO (Figura 3A). Inoltre, negli animali trattati con DOXO, l'incremento dell' ANP e BNP avviene in parallelo ad un aumento d'espressione genica del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) e della metalloproteasi di matrice 2 (MMP-2) rispetto agli SHAM, confermando l'attivazione del rimodellamento tissutale cardiaco a seguito dello stress (Figura 4A). Il pretrattamento con FBA riduce significativamente l'overspressione del mRNA di geni marcatori dello stress cardiaco e coinvolti nell'omeostasi tissutale indotti dalla DOXO.

5.4 L’FBA previene l’incremento dello stress ossidativo e nitrosativo indotto dalla DOXO.

Uno dei principali meccanismi responsabili della cardiotoxicità indotta dalla DOXO è l’aumento dello stress ossidativo e nitrosativo [4, 5, 8, 29]. Quindi, abbiamo valutato la capacità dell’FBA di contenere lo sbilanciamento dello stato redox intracellulare indotto dalla DOXO. Lo stress nitrosativo è stato valutato mediante analisi della S-nitrosilazione proteica in corrispondenza delle tirosine e attraverso la quantificazione dell’espressione proteica della ossido-nitrico sintetasi inducibile (iNOS). Come mostrato in figura 3B, rispetto agli SHAM, gli animali DOXO mostrano livelli di S-nitrosilazione proteica significativamente più alti, che correlano con un aumento d’espressione dell’iNOS. In contrasto, gli animali del gruppo FBA+DOXO mostrano livelli significativamente più bassi di iNOS e rispettivamente, nitrosazione proteica. In aggiunta, sono stati valutati i livelli d’espressione della Catalasi, un noto enzima dall’azione antiossidante. I cuori dei topi del gruppo DOXO esprimevano livelli intracellulari di Catalasi significativamente più bassi rispetto agli SHAM, mentre il pretrattamento con FBA previene questo decremento ($P < 0.05$ Vs. DOXO) (Figura 4B). L’FBA previene lo sbilanciamento dello stato Redox intracellulare provocato dalla DOXO, agendo sull’espressione di proteine attivamente coinvolte nella produzione delle specie reattive dell’azoto (RNS) e detossicazione delle specie reattive dell’ossigeno (ROS).

5.5 L’ FBA protegge dalla disfunzione mitocondriale indotta dalla DOXO

Successivamente, abbiamo valutato la produzione di specie reattive dell’ossigeno (ROS) mitocondriali, riscontrando che il trattamento con DOXO induce un aumentato rilascio di H_2O_2 e un aumento d’attività della SOD (Figura 5A e Figura 5B), significativamente contenuti dal pretrattamento con FBA.

La valutazione della respirazione mitocondriale è stata effettuata in assenza (Stato 4 o stato non fosforilante della respirazione) o in presenza (Stato 3 o stato fosforilante della respirazione) di ADP. Durante lo stato 3, dopo l’aggiunta di ADP e utilizzando Succinato come substrato, si è evidenziata una notevole riduzione del tasso di consumo di ossigeno nei topi trattati con DOXO, ma tale effetto è

contrastato dal pretrattamento con FBA. Lo stesso risultato si è ottenuto utilizzando come substrato il piruvato/malato (Figura 5C e Figura 5D). In maniera analoga allo stato 3, anche la capacità ossidativa mitocondriale dello stato 4, sia in presenza di Succinato o Piruvato/Malato come substrati, è risultata significativamente alterata dal trattamento con DOXO e preservata dalla co-amministrazione di FBA (Figura 5E e 5F). Per testare l'efficienza mitocondriale, la misura del consumo d'ossigeno è stata effettuata in presenza di Oligomicina (inibitore complesso dell'ATP sintasi) e FCCP (disaccoppiante di membrana). Nel gruppo DOXO, il grado di accoppiamento termodinamico risulta significativamente aumentato negli animali DOXO rispetto agli SHAM, mentre il trattamento con FBA previene tale incremento, contribuendo alla limitazione di produzione di ROS (Figura 5G). Presi tutti insieme, questi dati confermano l'azione protettiva dell'FBA, limitando la produzione di ROS e preservando la funzionalità della catena respiratoria mitocondriale.

5.6 L'FBA riduce il danno dalla DOXO in modelli cellulari umani non tumorali e aumenta l'azione tumoricida del chemioterapico in modello cellulare umano di tumore alla mammella

Per valutare il potenziale traslazionale dell'FBA per un approccio clinico, abbiamo esaminato l'effetto protettivo della molecola su vari tipi cellulari umani, rilevanti nella cardioncologia.

In primo luogo, cardiomiociti derivanti da cellule staminali umane pluripotenti indotte (hiPSC) sono stati trattati con FBA e DOXO. In linea con le precedenti evidenze in vivo, FBA previene in maniera significativa il danno cellulare ed il rilascio di Lattato deidrogenasi (LDH) indotto dalla DOXO nel mezzo di coltura (Figura 6A).

Abbiamo poi valutato l'effetto dell'FBA su un modello endoteliale umano costituito dalle cellule HUVEC. Come mostrato in Figura 6B, il pretrattamento con FBA riduce la mortalità delle HUVEC indotta da differenti dosi di DOXO.

In ultima analisi, è stato valutato l'effetto dell'FBA in combinazione con differenti dosi di DOXO in una linea cellulare di tumore alla mammella MCF-7. Il

pretrattamento con FBA non interferisce, ma al contrario, potenzia l'azione tumoricida della DOXO (Figura 6C).

L'FBA quindi, conferma *in vitro* le proprietà cardioprotettiva e tumoricida su modelli cellulari umani, aprendo la possibilità ad una sua traslazione in clinica.

6. DISCUSSIONE

Il BUT, un acido grasso a catena corta prodotto a concentrazioni nanomolari dal microbiota intestinale, ha evidenziato molteplici benefici quando utilizzato in modelli di patologi cardiovascolari. Nonostante la medicina moderna metta a disposizione farmaci sempre più sofisticati e specifici, basate sull'utilizzo di anticorpi monoclonali e piccole molecole inibitorie, l'utilizzo delle antracicline (ANTs) rimane una prima scelta nel trattamento di numerose tipologie di cancro, quali tumori solidi, leucemie, linfomi e cancro della mammella. A limitare l'uso delle ANT nella pratica clinica, vi è la comparsa di importanti eventi cardiotoxici, che si manifestano nel paziente durante o anche un anno dopo la sospensione del regime terapeutico. In questo lavoro mostriamo per la prima volta che l'amministrazione dell' FBA, un analogo sintetico derivato dal BUT, previene la cardiotoxicità indotta da DOXO *in vivo*, contrastando lo stress ossidativo e migliorando la funzionalità mitocondriale. In aggiunta, l'FBA riduce il danno indotto dalla DOXO in diversi modelli cellulari umani e aumenta l'azione tumoricida della DOXO.

Tra i meccanismi ampiamente studiati alla base della cardiotoxicità di ANT, l'aumento dello stress ossidativo e nitrosativo gioca un ruolo molto importante [3, 4, 29, 30]. È ben stabilito che i ROS sono molecole che giocano un ruolo chiave a livello fisiologico nel mantenimento delle normali funzioni cardiache, adattamento alla crescita e rimodellamento della matrice, ma elevati livelli sono correlati a gravi patologie cardiache, avendo un ruolo centrale nella patofisiologia dell'aterosclerosi e del danno da ischemia/riperfusion [31-35]. Il trattamento con DOXO destabilizza il delicato equilibrio tra ROS, specie reattive dell'azoto (RNS) e i sistemi antiossidanti, promuovendo in maniera diretta o indiretta l'attivazione di vie di segnalazione pro-apoptotiche, il rimodellamento patologico della matrice extracellulare, interferendo con l'omeostasi intracellulare di Ca^{2+} e danneggiando in maniera severa la funzione mitocondriale. Inoltre, la cardiotoxicità da DOXO è mediata, almeno in parte, da cambiamenti nel pool ad alta energia dei fosfati e livelli d'espressione dell'endotelina-1, da interferenze nella via di segnalazione adrenergica e del Toll-like receptor-2 (TLR-2), nella traslocazione nucleare di NF- κ B [36] e nell'inibizione selettiva della topoisomerasi

Il β [37]. Un ulteriore fattore contribuente alla disfunzione cardiaca indotta dalla DOXO è rappresentato dal danno mitocondriale. Infatti, è ben noto che le ANT inducono un'alterazione nei livelli di produzione di ATP, sovvertendo l'omeostasi energetica intracellulare e destabilizzando la fosforilazione ossidativa attraverso un danno diretto alla funzione mitocondriale, con conseguente attivazione dei meccanismi apoptotici [4, 30]. Molteplici strategie sono state sviluppate per proteggere il cuore dalla cardiotoxicità indotta da DOXO, tra cui riduzione nella dose cumulativa e somministrazione di molecole ad azione antiossidante. Tuttavia, l'utilizzo e l'effetto di quest'ultime è ancora dibattuto [5, 6, 8].

Recentemente, grande interesse è stato dedicato dalla potenzialità dei prebiotici e probiotici nel ridurre il rischio cardiovascolare, promuovendo il ruolo chiave del microbiota intestinale nel prevenire le malattie cardiovascolari come ipertensione, sindrome metabolica e ipercolesterolemia [9, 38]. Tra i vari prodotti di fermentazione del microbiota intestinale, il BUT è uno dei più promettenti ed importante, poiché garantisce circa il 60–70% dell'energia consumata dalle cellule epiteliali del colon. I meccanismi d'azione del BUT sono molteplici, ma molti di questi sono legati alla sua attività epigenetica nel regolare l'espressione genica, esercitando effetti antinfiammatori con un considerevole valore traslazionale nella prevenzione dell'aterogenesi, obesità indotta dalla dieta [19], insulino-resistenza [21], ipercolesterolemia e malattie infiammatorie intestinali, come precedentemente documentato dal nostro gruppo di ricerca [20].

McKay e Mathers [39] dimostrarono nei loro studi che il BUT a concentrazioni sovra-fisiologiche (5mM) esercita un effetto inibitorio su una classe di proteine, note come istone deacetilasi (HDACs), andando a modificare l'espressione di geni strettamente associati a processi sia fisiologici che patologici. Nel cuore, diverse evidenze sperimentali, sia *in vitro* che *in vivo*, evidenziano come l'inibizione delle HDACs antagonizzi l'ipertrofia dei cardiomiociti, che sembra proprio essere attivata a seguito di una iperacetilazione degli istoni [40]. Inoltre, nel cuore come in altri organi, l'inibizione delle HDACs sembra prevenire e proteggere dal danno ischemico [41]. È interessante notare come, gli iHDACs sono stati introdotti con successo nel trattamento polichemioterapico di numerosi tumori [41].

Tra questi iHDACs, il BUT ha dato prova di possedere importanti proprietà antineoplastiche *in vitro* [20, 42]. In aggiunta, Tarasenko e colleghi hanno dimostrato, *in vitro* e *in vivo*, che analoghi del butirrato come il *butyroyloxymethyl-diethyl phosphate*, noto come AN-7, aumentano l'effetto citotossico della DOXO, mentre proteggono i cardiomiociti da effetti tossici [16, 42]. È interessante notare che un'altra molecola derivata del butirrato, il *sodium-4-phenylbutyrate* (4-PBA), è stata approvata per il trattamento dei disordini del ciclo dell'urea [43]. Risultati preliminari molto promettenti hanno inoltre la capacità del 4-PBA di alleviare l'apoptosi cardiaca e la disfunzione del miocardio indotta dalla DOXO, riducendo lo stimolo apoptotico indotto dallo stress reticolare e l'inibizione dei meccanismi attivati dalle HDACs [43, 44]. Per tutte queste evidenze, il BUT potrebbe rappresentare un'ottima strategia nel sinergizzare l'azione antineoplastica della DOXO e, contemporaneamente, contrastare la sua azione cardiotossica.

La grande limitazione per l'introduzione nella pratica clinica del BUT e dei suoi derivati, è rappresentato dalle loro scarse proprietà organolettiche e proprietà farmacocinetiche, le quali limitano in maniera diretta la somministrazione al paziente. D'altro canto, l'FBA si presenta come molecola solida, scarsamente igroscopica, facile da pesare, stabile a pH fortemente acidi o alcalini e in grado di rilasciare continuamente nel tempo butirrato a livello dell'intestino tenue e crasso. Inoltre, l'FBA presenta un profilo tossicologico simile al BUT e, cosa molto importante, non presenta lo spiacevole odore del BUT e i suoi derivati (tra cui il 4-PBA), risultando praticamente insapore [21].

Il nostro studio sperimentale mostra che il pretrattamento con FBA previene la precoce disfunzione del ventricolo sinistro indotta dalla DOXO, prevenendo lo stress nitrosativo e ossidativo, e migliorando la funzionalità mitocondriale compromessa dalla DOXO. Esperienze del gruppo di ricerca avevano già evidenziato l'efficacia della DOXO di indurre disfunzione cardiaca conclamata ad una dose cumulativa di 15 mg/Kg per una settimana (2,17 mg/Kg/day)[24], senza però individuare se e quali meccanismi partecipino attivamente allo sviluppo di tale disfunzione. L'utilizzo per la prima volta di una dose cumulativa settimanale di 7 mg/Kg (1 mg/Kg/day), ci ha permesso di sviluppare un nuovo modello animale di cardiotossicità precoce, con presenza di danno subclinico non individuabile

ecocardiograficamente tramite variazioni significative nella frazione d'accurciamento e d'eiezione. Tale modello, ci ha permesso di sottolineare l'importanza della disfunzione mitocondriale e produzione di ROS nel promuovere e sostenere il rimodellamento cardiaco indotto dalla DOXO e prevenuto dal pretrattamento con FBA.

Con questi risultati, noi crediamo che grazie alle sue migliori proprietà organolettiche e farmacocinetiche, l'assunzione orale di FBA potrà essere facilmente tollerata dai pazienti oncologici adulti e somministrata con successo anche in ambito pediatrico. I dati ottenuti su cardiomiociti derivati da hiPSCs e HUVEC, insieme all'abilità mostrate dell'FBA di sinergizzare con l'azione tumoricida della DOXO, costituiscono un'importante step per la traslazione clinica dei nostri risultati.

7. CONCLUSIONI

Oltre ai farmaci utilizzati nel trattamento dell'insufficienza cardiaca, non esistono trattamenti specifici per la cardiotossicità indotta dal DOXO. La prospettiva di utilizzare una molecola naturale, derivata dalla dieta, facilmente somministrabile al paziente e con un ottimo rapporto costo/beneficio è molto interessante. Grazie alle sue proprietà di essere inodore e insapore, l'FBA può essere somministrato in sicurezza a pazienti oncologici. Il nostro studio mostra per la prima volta che l'FBA, un nuovo derivato sintetico del BUT, è in grado di attenuare la cardiotossicità indotta sperimentalmente dalla DOXO *in vivo*, attraverso un meccanismo che prevede la riduzione dello stress ossidativo e nitrosativo e il miglioramento della funzione mitocondriale. Tuttavia, ulteriori ricerche sono necessarie per stabilire al meglio le potenzialità dell'FBA in cardioncologia. Oltre ad esplorare ulteriormente i meccanismi d'azione descritti per altre molecole simili al BUT [16, 43], sarà importante valutarne anche l'azione anti-neoplastica in un modello tumorale murino.

8. REFERENZE

1. Armenian, S.H., et al., *Prevention and Monitoring of Cardiac Dysfunction in Survivors of Adult Cancers: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline*. J Clin Oncol, 2017. **35**(8): p. 893-911.
2. Kenigsberg, B., A. Wellstein, and A. Barac, *Left Ventricular Dysfunction in Cancer Treatment: Is it Relevant?* JACC Heart Fail, 2018. **6**(2): p. 87-95.
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. Menna, P., et al., *Anthracycline cardiotoxicity*. Expert Opin Drug Saf, 2012. **11 Suppl 1**: p. S21-36.
5. Sterba, M., et al., *Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(8): p. 899-929.
6. Lipshultz, S.E., et al., *The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2004. **351**(2): p. 145-53.
7. Reichardt, P., et al., *Risk-benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling*. Future Oncol, 2018. **14**(25): p. 2663-2676.
8. Varricchi, G., et al., *Antineoplastic Drug-Induced Cardiotoxicity: A Redox Perspective*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 167.
9. Tang, W.H., et al., *Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk*. N Engl J Med, 2013. **368**(17): p. 1575-84.
10. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
11. Brown, J.M. and S.L. Hazen, *The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases*. Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 343-59.
12. Tang, W.H.W., D.Y. Li, and S.L. Hazen, *Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(3): p. 137-154.
13. Topping, D.L. and P.M. Clifton, *Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1031-64.
14. Engel, D., et al., *Mode of interaction between butyroyloxymethyl-diethyl phosphate (AN-7) and doxorubicin in MCF-7 and resistant MCF-7/Dx cell lines*. J Cancer Res Clin Oncol, 2006. **132**(10): p. 673-83.
15. Tarasenko, N., et al., *The histone deacetylase inhibitor butyroyloxymethyl diethylphosphate (AN-7) protects normal cells against toxicity of anticancer agents while augmenting their anticancer activity*. Invest New Drugs, 2012. **30**(1): p. 130-43.
16. Rephaeli, A., et al., *Anticancer prodrugs of butyric acid and formaldehyde protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Br J Cancer, 2007. **96**(11): p. 1667-74.
17. Kessler-Icekson, G., et al., *A histone deacetylase inhibitory prodrug - butyroyloxymethyl diethyl phosphate - protects the heart and*

- cardiomyocytes against ischemia injury*. Eur J Pharm Sci, 2012. **45**(5): p. 592-9.
18. Evans, L.W. and B.S. Ferguson, *Food Bioactive HDAC Inhibitors in the Epigenetic Regulation of Heart Failure*. Nutrients, 2018. **10**(8).
 19. Mattace Raso, G., et al., *Effects of sodium butyrate and its synthetic amide derivative on liver inflammation and glucose tolerance in an animal model of steatosis induced by high fat diet*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68626.
 20. Paparo, L., et al., *The Influence of Fiber on Gut Microbiota: Butyrate as Molecular Player Involved in the Beneficial Interplay Between Dietary Fiber and Cardiovascular Health*. 2017: p. 61-71.
 21. Mollica, M.P., et al., *Butyrate Regulates Liver Mitochondrial Function, Efficiency, and Dynamics in Insulin-Resistant Obese Mice*. Diabetes, 2017. **66**(5): p. 1405-1418.
 22. Russo, R., et al., *Sodium butyrate and its synthetic amide derivative modulate nociceptive behaviors in mice*. Pharmacol Res, 2016. **103**: p. 279-91.
 23. Simeoli, R., et al., *An orally administered butyrate-releasing derivative reduces neutrophil recruitment and inflammation in dextran sulphate sodium-induced murine colitis*. Br J Pharmacol, 2017. **174**(11): p. 1484-1496.
 24. Tocchetti, C.G., et al., *Ranolazine protects from doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac dysfunction*. Eur J Heart Fail, 2014. **16**(4): p. 358-66.
 25. Hartree, E.F., *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response*. Anal Biochem, 1972. **48**(2): p. 422-7.
 26. Barja, G., *Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 224-38.
 27. Flohe, L. and F. Otting, *Superoxide dismutase assays*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 93-104.
 28. Cairns, C.B., et al., *Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles*. Am J Physiol, 1998. **274**(5): p. R1376-83.
 29. Simunek, T., et al., *Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(1): p. 154-71.
 30. Sawyer, D.B., *Anthracyclines and heart failure*. N Engl J Med, 2013. **368**(12): p. 1154-6.
 31. Sawyer, D.B., et al., *Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure*. J Mol Cell Cardiol, 2002. **34**(4): p. 379-88.
 32. Giordano, F.J., *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 500-8.
 33. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 241-8.
 34. Nediani, C., et al., *Nitric oxide/reactive oxygen species generation and nitroso/redox imbalance in heart failure: from molecular mechanisms to therapeutic implications*. Antioxid Redox Signal, 2011. **14**(2): p. 289-331.

35. Di Lisa, F., et al., *Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66(Shc) and monoamine oxidase*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(2): p. 131-9.
36. Nozaki, N., et al., *Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice*. Circulation, 2004. **110**(18): p. 2869-74.
37. Zhang, S., et al., *Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Nat Med, 2012. **18**(11): p. 1639-42.
38. Schirmer, M., et al., *Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity*. Cell, 2016. **167**(4): p. 1125-1136 e8.
39. McKay, J.A. and J.C. Mathers, *Diet induced epigenetic changes and their implications for health*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **202**(2): p. 103-18.
40. Zhang, C.L., et al., *Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy*. Cell, 2002. **110**(4): p. 479-88.
41. Abend, A. and I. Kehat, *Histone deacetylases as therapeutic targets--from cancer to cardiac disease*. Pharmacol Ther, 2015. **147**: p. 55-62.
42. Rephaeli, A., et al., *Derivatives of butyric acid as potential anti-neoplastic agents*. Int J Cancer, 1991. **49**(1): p. 66-72.
43. Fu, H.Y., et al., *Chemical Endoplasmic Reticulum Chaperone Alleviates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction*. Circ Res, 2016. **118**(5): p. 798-809.
44. Daosukho, C., et al., *Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against Adriamycin-induced cardiac injury*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(12): p. 1818-25.

9. IMMAGINI

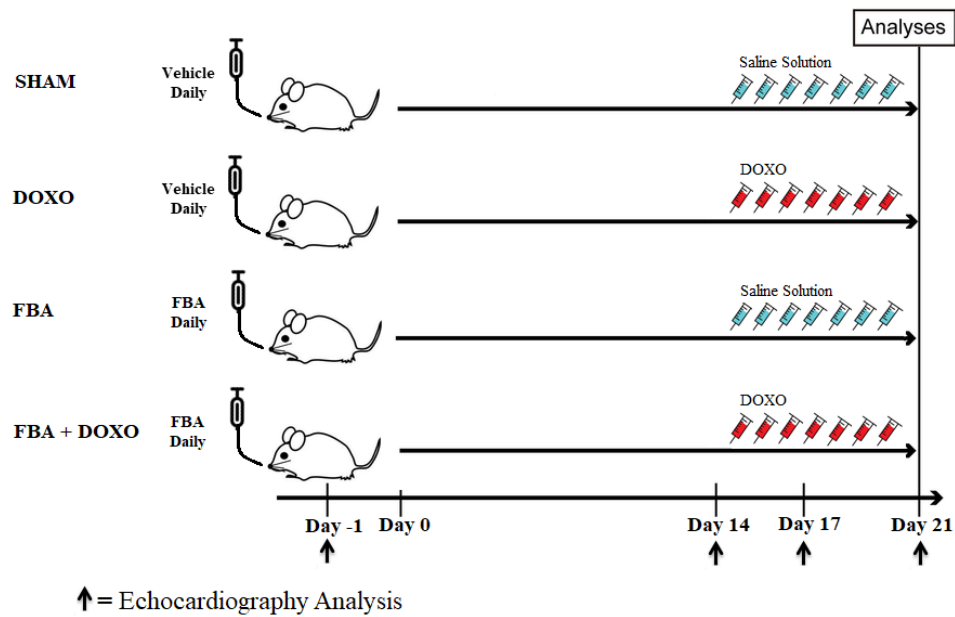


Figura 1: schema di trattamento

Topi C57 / BL6 sono stati divisi casualmente in quattro gruppi. Al giorno 0, i gruppi FBA (n=10) e FBA + DOXO (n=10) (sono stati pretrattati quotidianamente con FBA per 21 giorni per via orale, mentre i gruppi DOXO e SHAM hanno ricevuto il veicolo come controllo. Al giorno 15, i gruppi DOXO (n=10) e FBA + DOXO sono stati iniettati con Doxorubicina 1 ora dopo il pretrattamento giornaliero con veicolo o FBA, rispettivamente, per i successivi 7 giorni, mentre i gruppi SHAM (n=10) e FBA sono stati trattati con soluzione salina. Al giorno 21, i topi sono stati sacrificati per le successive analisi ex-vivo. La funzionalità cardiaca è stata monitorata mediante analisi ecocardiografica nei giorni 1, 14, 17 e 21.

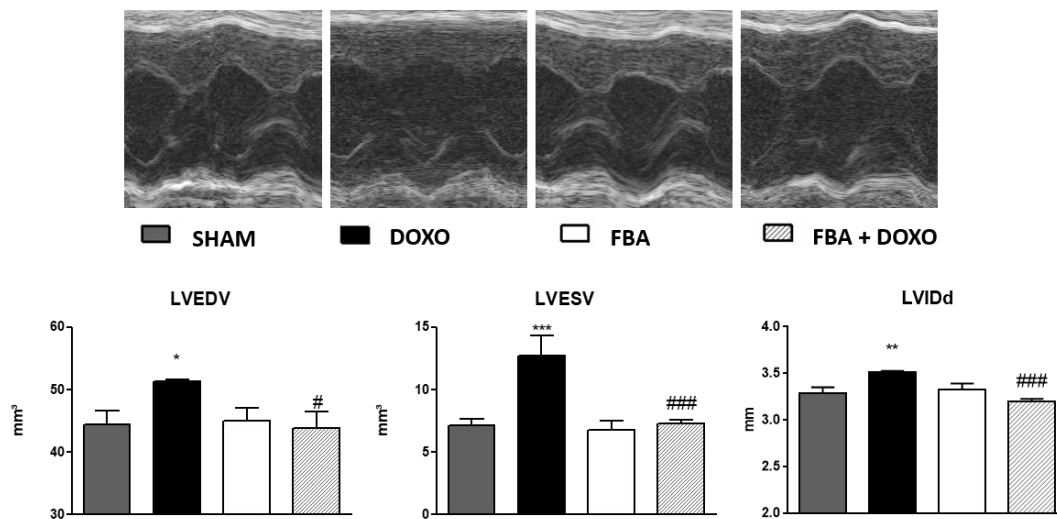


Figura 2 : l'FBA impedisce la dilatazione ventricolare sinistra indotta dalla DOXO.

In alto: immagini ecocardiografiche acquisite in M-mode sull'asse corto mostrano la dilatazione ventricolare sinistra indotta da DOXO e gli effetti protettivi dell'FBA nel gruppo FBA + DOXO. In basso: nei topi trattati con FBA + DOXO, il *left ventricular end-diastolic volume*, *left ventricular end-systolic volume* e il *left ventricular internal dimension in diastole* sono significativamente più piccoli rispetto ai topi trattati con DOXO. (n=10 in tutti i gruppi) * P <0,05 vs. SHAM; ** P <0,005 vs. SHAM; *** P <0,0005 vs. SHAM; #P <0,05 vs. DOXO; ### P <0,0005 vs. DOXO.

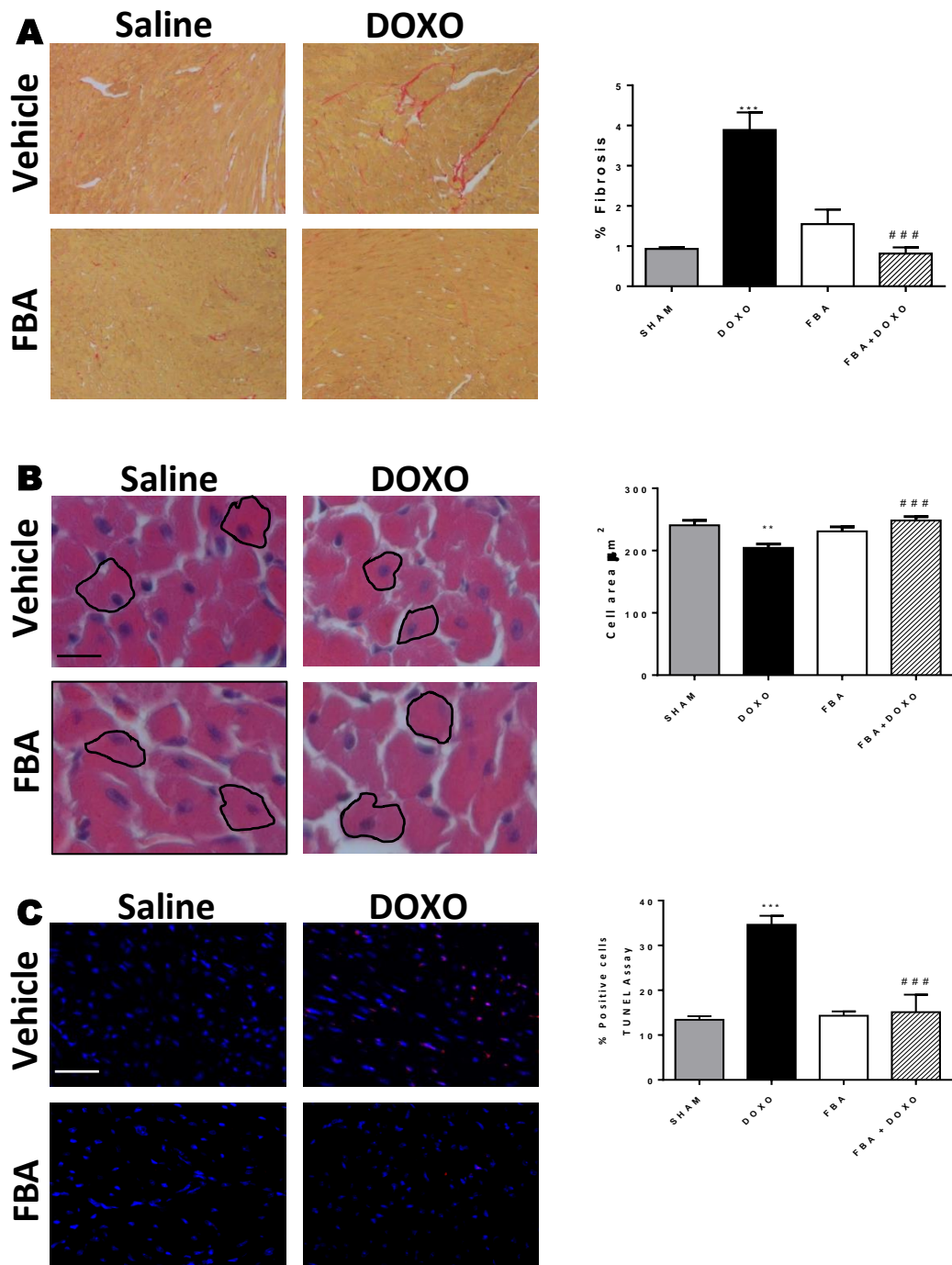


Figura 3: la Fenilalanina-Butirramide (FBA) protegge il cuore dal rimodellamento indotto dalla doxorubicina (DOXO).

(A) L'FBA riduce la fibrosi interstiziale provocata dalla DOXO nel cuore. (B) L'FBA protegge il cuore dall'atrofia dei cardiomiociti indotta dalla DOXO (Barra di scala 20 µM). (C) Il danno cellulare e la frammentazione del DNA sono ridotti dalla somministrazione di FBA rispetto a DOXO (Barra di scala 30 µM). (n=5 in tutti i gruppi) ** P <0,005 vs. SHAM; *** P <0,0005 vs. SHAM; ### P <0,0005 vs. DOXO mediante analisi ANOVA a una via seguita da test post-hoc Bonferroni.

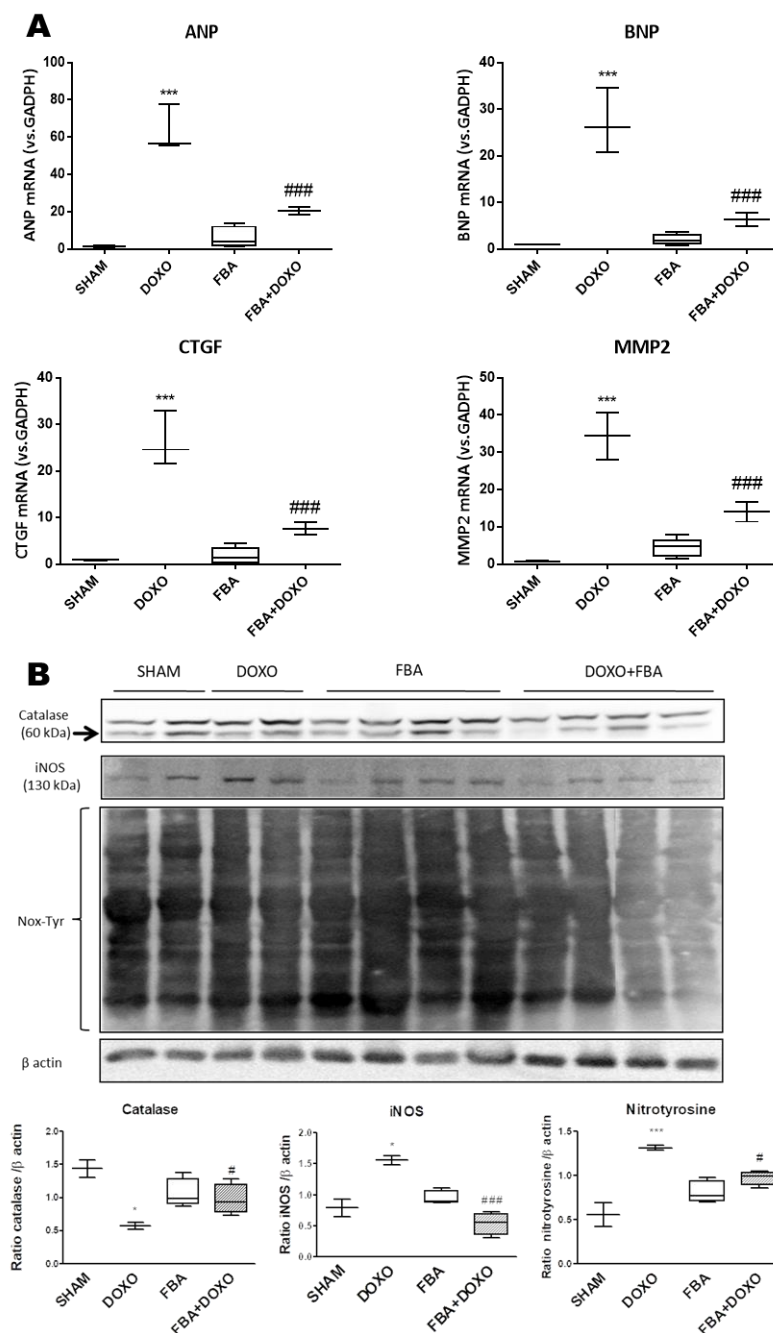


Figura 4: La Fenilalanina-Butirrammide (FBA) riduce i livelli di mRNA di geni elevati durante lo stress e il rimodellamento cardiaco, contrastando l'aumento dello stress nitrosativo causato dalla doxorubicina (DOXO).

(A) I livelli di espressione di peptide natriuretico atriale (ANP), peptide natriuretico di tipo B (BNP), fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF), matrice metalloproteinae-2 (MMP-2) sono aumentati nei topi trattati con DOXO, mentre sono più bassi il gruppo FBA + DOXO vs. DOXO. (B) L'FBA diminuisce la nitrosilazione proteica andando ad attenuare l'aumento dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e la riduzione della catalasi indotta dalla DOXO. (n=5 in tutti i gruppi) * P <0,05 vs. sham; *** P <0,0005 vs. sham; #P <0,05 vs. DOXO; ### P <0,0005 vs. DOXO.

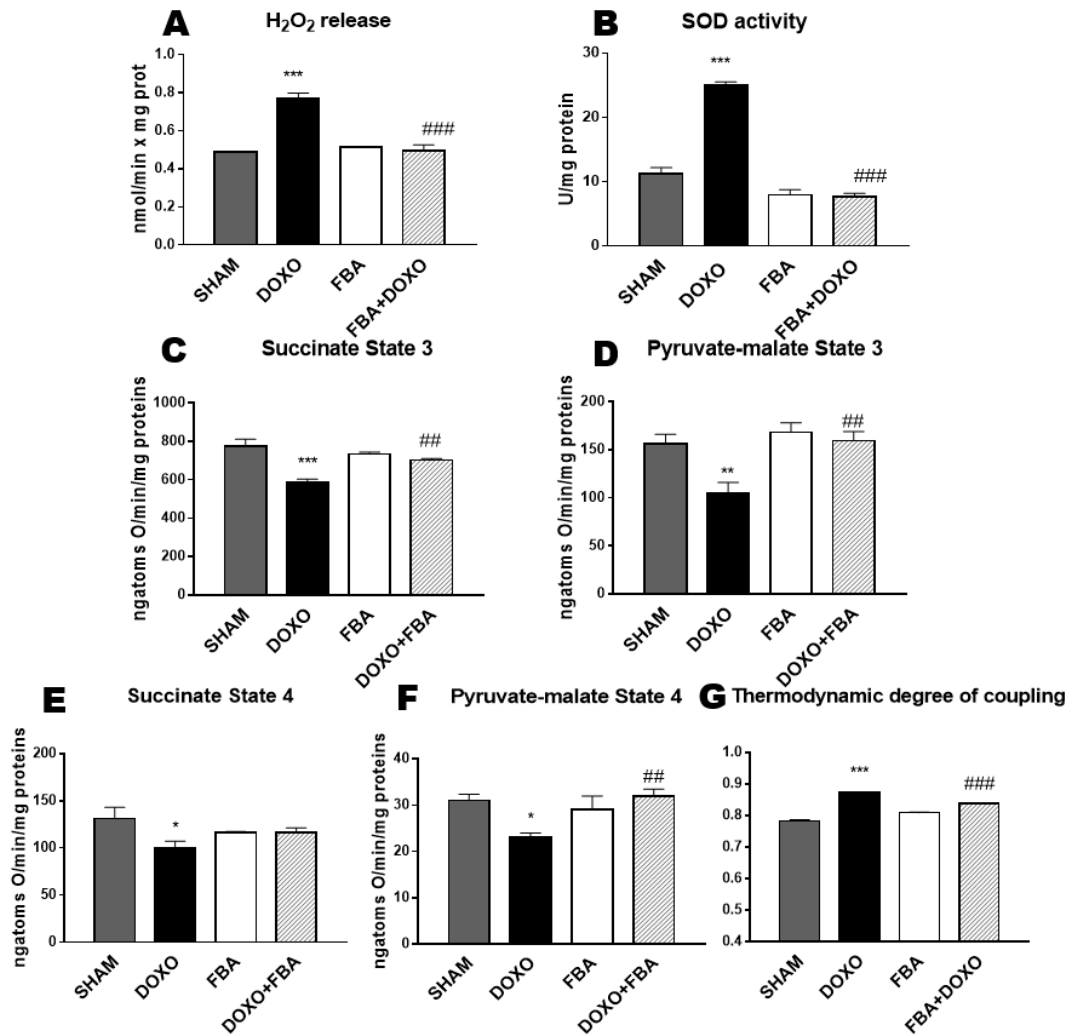


Figura 5: La Fenilalanina-Butirrammide (FBA) previene il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mitocondriali e contrasta la disfunzione mitocondriale indotta dalla doxorubicina (DOXO).

La produzione di H₂O₂ (A) e l'aumentata attività della superossido dismutasi (SOD) (B) innescate dalla DOXO sono limitate dopo il pretrattamento con FBA. Il tasso di consumo d'ossigeno diminuisce negli stati 3 e 4 della respirazione mitocondriale nel gruppo DOXO (C – F), mentre sono conservati dopo il pretrattamento con FBA in presenza di succinato (C, E) o piruvato-malato (D, F). Il grado di accoppiamento termodinamico (G) è significativamente preservato nel gruppo FBA + DOXO rispetto al gruppo DOXO. (n=5 tutti i gruppi) * P <0,05 vs. SHAM; ** P <0,005 vs. SHAM; *** P <0,0005 vs. SHAM; #P <0,05 vs. DOXO; ## P <0,005 vs. DOXO; ### P <0,0005 vs. DOXO.

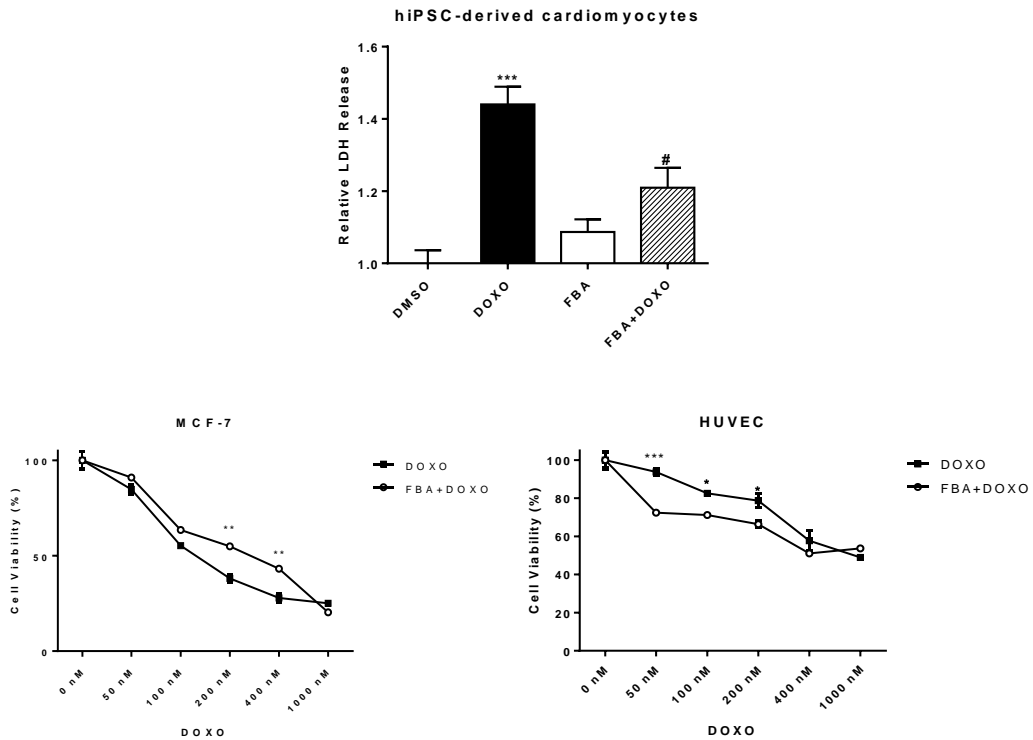


Figura 6: La Fenilalanina-Butirrammide (FBA) riduce la tossicità della doxorubicina (DOXO) nei modelli cellulari cardiaci umani aumentandone l'azione antitumorale.

L'FBA riduce la tossicità della DOXO nei cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti umane (hiPSCs) misurata come rilascio relativo di lattato deidrogenasi (LDH). (A) *** P <0,0005 vs. DMSO; #P <0,05 vs. DOXO mediante analisi ANOVA ad una via seguito dal test post-hoc Bonferroni. (B) L'FBA protegge le cellule endoteliali derivanti dalla vena ombelicale umane dalla mortalità indotta dal DOXO e (C) aumenta l'azione tumoricida della DOXO nelle cellule MCF-7 dopo l'esposizione a concentrazioni crescenti di DOXO. (n=5 in tutti i gruppi) * P <0,05; ** P <0,005; *** P <0.0005 ANOVA a due vie seguito da test post-hoc Bonferroni.