

**TESI DI DOTTORATO IN MEDICINA INTERNA CLINICO-SPERIMENTALE
CURRICULUM DI FISIOPATOLOGIA E CLINICA DELLE MALATTIE
CARDIOVASCOLARI, RENALI, E DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA**

**IL METABOLISMO CARDIACO ESPLORABILE IN VIVO CON FDG-
PET È UN POTENZIALE MARCATORE DI CARDIOTOSSICITÀ DA
ANTRACICLINE**

**STUDIO SPERIMENTALE E CLINICO IN MODELLO MURINO E IN PAZIENTI
CON LINFOMA DI HODGKIN**

Dott. Matteo Sarocchi

Specialista in malattie dell'apparato cardiovascolare

Coordinatore del corso: prof. Marcello Bagnasco

Università degli Studi di Genova, dipartimento di Medicina Interna

Tutor: prof. Giorgio Ghigliotti

Clinica di Malattie Cardiovascolari, IRCCS Policlinico San Martino di Genova
Università degli Studi di Genova

RICONOSCIMENTI

Si ringraziano tutti i coautori dei lavori pubblicati.

Per lo speciale contributo a questo lavoro, un particolare ringraziamento ai coautori:

prof. Claudio Brunelli

dott. Paolo Spallarossa

prof. Pietro Ameri

Clinica di Malattie Cardiovascolari, IRCCS Policlinico San Martino di Genova
Università degli Studi di Genova

dott. Matteo Bauckneht

prof. Gianmario Sambuceti

U.O. Medicina Nucleare, IRCCS Policlinico San Martino di Genova
Università degli Studi di Genova

INTRODUZIONE

ATTUALITÀ DELLA CARDIOTOSSICITÀ DA ANTRACICLINE

Affrontare la cardiotoxicità da farmaci chemioterapici richiede un impegno clinico e scientifico tale da giustificare la fondazione di una vera e propria disciplina dedicata, la cardio-oncologia (Lancellotti et al. 2018; Okwuosa e Barac 2015). Sebbene tale disciplina sia stata riconosciuta a seguito dell'evidenza della tossicità associata all'anticorpo monoclonale anti ERB2 trastuzumab, la tossicità da antracicline (ANT) è nota da molto più tempo e tuttora condiziona significativamente la pratica clinica (Montemurro et al. 2010).

Per evitare la cardiotoxicità da ANT si è creduto inizialmente sufficiente mantenere la dose cumulativa al di sotto di una cosiddetta "dose-soglia" (circa 350-450 mg/mq di doxorubicina). Oggi sappiamo che ciò non è del tutto vero e che, virtualmente, anche dosi molto basse causano tossicità, che si manifesta in relazione non solo alla dose, ma anche al tempo dall'esposizione (cardiotoxicità tardiva), alle comorbilità cardiache preesistenti e all'associazione di altre terapie (D. Cardinale et al. 2006).

Per evitare la tossicità da ANT, che si può verificare anche a dosi basse, si potrebbe proporre di evitare l'uso delle ANT. Ciò priverebbe però moltissimi pazienti delle migliori chance di sopravvivere al tumore. Tale classe di farmaci, infatti, è ancora alla base di molti degli schemi chemioterapici più efficaci, sia nei tumori solidi (tumore mammario) che nelle malattie ematologiche ad alto grado di malignità, come i linfomi e le leucemie.

Allo stato attuale non vi sono delle alternative alle ANT altrettanto efficaci ma significativamente meno cardiotossiche, con la non trascurabile eccezione delle ANT liposomiali (Dell'olio et al. 2011; Olivieri et al. 2017; Rohlfing et al. 2015). La cardiotoxicità da ANT rimane pertanto un problema attuale e irrisolto dopo oltre trent'anni di impiego clinico: se da un lato non sono ancora completamente noti i meccanismi fisiopatologici, dall'altro le strategie clinicamente applicabili di prevenzione sono limitate.

FISIOPATOLOGIA DELLA CARDIOTOSSICITÀ E POSSIBILI RISVOLTI CLINICI

La cardiotoxicità (cronica) da ANT ha una storia naturale progressiva che, non trattata, si manifesta prevalentemente come scompenso cardiaco. Il decorso può essere più o meno rapido e le prime manifestazioni cliniche possono comparire da qualche mese a pochi anni dopo l'esposizione, e possono essere esacerbate da stress secondari (ischemia, ipertensione, sovraccarico emodinamico), come ipotizzato dalla teoria del "double-hit" (Groarke e Nohria 2015; Suter e Ewer 2013). Nei pazienti a basso rischio come quelli trattati in prima linea per linfoma di Hodgkin il decorso è molto subdolo, la cardiotoxicità tardiva si può manifestare insidiosamente anche molti anni dopo i trattamenti (Aleman et al. 2003; Bhakta et al. 2016; van Nimwegen et al. 2015), e se ricercata proattivamente la disfunzione ventricolare sinistra subclinica interessa sino a un terzo dei pazienti a 10 anni (Hequet et al. 2004). Prima di sviluppare scompenso cardiaco conclamato avvengono modificazioni cellulari (senescenza, disfunzione mitocondriale, disfunzione contrattile) (Spallarossa et al. 2009; Varricchi et al. 2018), rilascio di enzimi miocardici (Daniela Cardinale et al. 2010), alterazioni minori della funzione sistolica e diastolica (Plana et al. 2014), sino al calo della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) asintomatico.

Il meccanismo fisiopatologico alla base di tali eventi clinici è tuttora oggetto di discussione. Dapprima si è evidenziato un danno causato dalle ANT sui miocardiociti causato da stress ossidativo. Senza escludere tale meccanismo, ad oggi si considera determinante l'effetto delle ANT sull'avvolgimento del DNA, mediato dalla topoisomerasi-2 β , che causa senescenza cellulare sia sui miocardiociti differenziati che sulle cellule staminali cardiache (Spallarossa et al. 2009). Pur in assenza di una teoria unitaria della tossicità da ANT, è bene sottolineare che alterazioni mitocondriali e di lipoperossidazione si associano ad alterazioni del metabolismo cellulare sperimentalmente documentate (Hrelia et al. 2002). Di particolare interesse allo scopo del nostro lavoro è il fatto che dal punto di vista metabolico vi sia una riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi, bilanciato da un aumento dell'impiego di glucosio come substrato, il cosiddetto "glucose-shift" (Tokarska-Schlattner, Wallimann, e Schlattner 2006). La rilevanza di tale effetto

è stata documentata sia a livello biochimico in vitro che mediante FDG-PET (tomografia a emissione di positroni con fluoro-deossiglucosio) in vivo (Borde, Kand, e Basu 2012).

TRATTAMENTO E PREVENZIONE DELLA CARDIOTOSSICITÀ

La prevenzione della cardiotoxicità da ANT pone al clinico diverse questioni pratiche: come farla, quando farla e a chi.

Diverse molecole sono state proposte nel tempo come cardioprotettivi: metformina, antiossidanti, statine, carvedilolo, betabloccanti, ace-inibitori, sartani, dexrazoxane (Bosch et al. 2013; Harake et al. 2012). Il dexrazoxane ha avuto una sorte particolarmente emblematica poiché, nonostante la dimostrata efficacia nel ridurre la cardiotoxicità da ANT, il suo utilizzo è stato quasi completamente abolito a causa di possibili rischi di secondo tumore, di meno provati rischi di riduzione dell'efficacia della chemioterapia (Lyu et al. 2007), ma probabilmente anche per motivi molto più banali quali la difficoltà pratica di utilizzo. Molto più promettente è l'utilizzo di formulazioni intrinsecamente protette come le ANT liposomiali (pegilate e non). Tali formulazioni riducono l'esposizione cardiaca al farmaco, e ne aumentano l'esposizione relativa nelle cellule neoplastiche (Dell'olio et al. 2011; Olivieri et al. 2017; Rohlffing et al. 2015). Considerazioni economiche pesano certamente nel limitare tale strategia, inoltre tali farmaci sono al momento studiati solo in una modesta proporzione delle indicazioni che hanno le ANT convenzionali.

Riguardo alla tempistica, è stato dimostrato che il trattamento con beta-bloccanti e ACE-inibitori è efficace quanto più precocemente iniziato, e alcuni dati suggeriscono l'efficacia del trattamento preventivo, idealmente intervenendo sulla tossicità al momento dell'esposizione alla chemioterapia (Bosch et al. 2013; D. Cardinale et al. 2015). Il loro utilizzo come cardioprotezione in prevenzione primaria però, seppure supportato da alcuni lavori, rimane off-label e non vi è alcun consenso in merito, specialmente considerati i possibili effetti collaterali emodinamici (ipotensione e bradicardia). E' comunque raccomandato il loro utilizzo di prima scelta in caso di ipertensione in pazienti candidati a terapia con ANT.

L'attuale linea di comportamento che emerge dai documenti di consenso è piuttosto orientata sull'individuazione di quei pazienti ad alto rischio di cardiotoxicità, per i quali esista un rapporto favorevole tra il beneficio di una terapia con cardioprotezione e i possibili effetti collaterali/costi. I pazienti che hanno un'età molto avanzata, una cardiopatia preesistente o una pregressa esposizione a ANT sono definibili ad alto rischio "a priori", prima ancora che inizino i trattamenti. Tali pazienti sono inclusi in una nota del Ministero della Sanità che permette, per indicazioni selezionate, l'utilizzo delle ANT liposomiali. La maggior parte dei pazienti trattati con ANT non ha queste caratteristiche e, seppur l'impatto relativo della cardiotoxicità sia minore, è possibile che il maggior numero di pazienti che svilupperanno cardiotoxicità, specialmente tardiva, siano senza tali caratteristiche di rischio.

STRATEGIE DI IDENTIFICAZIONE PRECOCE DELLA CARDIOTOSSICITÀ

Il clinico ha la necessità di individuare quei pazienti che si presentano a basso rischio sulla base dell'anamnesi, ma che in realtà non lo sono. Tali pazienti potrebbero infatti richiedere un uso selezionato di beta-bloccanti e ACE-inibitori e un monitoraggio clinico-strumentale stretto. Purtroppo predire la cardiotoxicità tardiva è una sfida complessa. Sono state proposte almeno due strategie basate rispettivamente sui biomarker (troponina) e sull'imaging (ecocardiografia con speckle-tracking e RMN)(Plana et al. 2014). La prima deriva dall'osservazione che circa il 20% dei pazienti mostra livelli circolanti sopra norma di troponina, enzima altamente specifico per i cardiomiociti, durante i cicli di chemioterapia con ANT. In questo gruppo si concentrano i pazienti che svilupperanno disfunzione ventricolare e scompenso cardiaco. Similmente, valutando i pazienti con ecocardiografia speckle-tracking, un calo >15% del global-longitudinal-strain si è dimostrato predittivo di un successivo calo della LVEF. Alcuni studi dimostrano la bontà teorica di un intervento cardioprotettivo basato su tali strategie, ben prima che la LVEF cali. Lo stato dell'arte tuttavia si scontra con la realtà clinica. Lo screening con troponina è infatti fonte di potenziali problemi per l'oncologo nei casi di positività, e deve essere concordato all'interno di un programma di cardio-oncologia non disponibile in molti centri. La disponibilità

di ecocardiografia speckle-tracking è tuttora limitata, richiede riproducibilità con esami eseguiti preferibilmente con stesso apparecchio a ultrasuoni (vendor-dependent) e da parte di stessi operatori (operator-dependent). Infine, sia i biomarkers che gli esami ecocardiografici avanzati, qualora applicati su larga scala, richiedono impiego di risorse e costi aggiuntivi non trascurabili, e un carico ulteriore per pazienti già operati.

RAZIONALE PER LO STUDIO DELLA FDG-PET COME MARCATORE DI CARDIOTOSSICITÀ, IN PARTICOLARE NEL LINFOMA DI HODGKIN

Il razionale per l'impiego di un esame come la FDG-PET per prevedere la cardiotoxicità deriva da diverse considerazioni fisiopatologiche e cliniche.

- modelli murini hanno evidenziato un'alterazione del ciclo ossidativo mitocondriale dopo esposizione ad ANT, che porta a un precoce aumento della captazione cellulare di glucosio, mediata almeno in parte dall'attività dell'esochinasi(Lyu et al. 2007; Varricchi et al. 2018; Neubauer 2007; Hrelia et al. 2002);
- la FDG-PET è in grado di identificare le alterazioni della captazione di glucosio a livello cardiaco in condizioni diverse, come per esempio nell'ischemia;
- report clinici identificano un aumento della captazione di FDG alla PET in caso di cardiotoxicità documentata(Gorla et al. 2016);
- nei primi stadi subclinici di insufficienza cardiaca la captazione del glucosio risulta aumentata, per poi ridursi nello scompenso cardiaco conclamato(Neubauer 2007);
- la FDG-PET è ampiamente utilizzata a scopo diagnostico in molti tumori solidi e linfomi; costituisce per esempio lo “standard-of-care” nel linfoma di Hodgkin(Barrington et al. 2016; Ansell 2014; Cheson et al. 2014);
- i dati della captazione cardiaca vengono comunque inclusi nell'esame richiesto dall'ematologo o oncologo, seppur abitualmente non valutati.

IPOTESI SPERIMENTALI

Il presente lavoro ha valutato in maniera traslazionale il potenziale impiego della FDG-PET come marcatore di cardiotossicità da ANT. Le ipotesi progressivamente verificate iniziano da modelli sperimentali e sono state quindi valutate su dati retrospettivi e prospettici di pazienti.

Come prima cosa abbiamo valutato in modello murino di cardiotossicità non letale da ANT la presenza, l'entità, l'andamento temporale e la variabilità di un effetto delle ANT sulla captazione di glucosio evidenziabile alla FDG-PET a livello cardiaco.

Quindi lo stesso risultato è stato ricercato retrospettivamente in pazienti esposti ad ANT e sottoposti a FDG-PET. La risposta alla captazione del FDG a livello cardiaco è stata confrontata con quella a livello del muscolo periferico degli stessi pazienti, e a quella di pazienti non esposti a chemioterapia (controlli).

Quindi è stata ricercata la correlazione tra valori di captazione SUV cardiaca (o pattern di variazione dei valori) con eventi cardiovascolari minori.

In un secondo studio è stata espansa la valutazione con il controllo prospettico a breve termine dell'ecocardiografia, per confrontare il risultato fornito dalla FDG-PET con lo strumento più comunemente utilizzato per lo screening della cardiotossicità, con l'intento di avvicinare alla pratica clinica l'applicazione della FDG-PET come screening della cardiotossicità.

METODI

MODELLO SPERIMENTALE MURINO DI CARDIOTOSSICITÀ

Gli esperimenti sono stati condotti nel rispetto delle Linee Guida per l'utilizzo e la cura degli animali da esperimento (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals 2011); lo studio è stato approvato dal comitato etico locale dell'IRCCS - Policlinico San Martino di Genova. Tutti gli animali sono stati mantenuti allo stesso regime dietetico e quindi divisi in tre gruppi di 5 animali ciascuno, per essere trattati rispettivamente con doxorubicina 5 mg/Kg e.v. (dose standard), doxorubicina 7.5 mg/Kg e.v.

(dose alta), e soluzione salina (controlli). Gli animali sono stati sottoposti a una microPET dinamica (Albira, Bruker US) subito prima della somministrazione del trattamento e sei giorni dopo. L'analisi è stata condotta nel laboratorio di Medicina Nucleare del nostro istituto, la captazione di glucosio del ventricolo sinistro (LV-SUV) e del muscolo scheletrico (SM-SUV) è stata misurata e indicizzata a consumo di glucosio (LV-MRGluc e SM-MRGluc) secondo la procedura validata in studi precedenti del laboratorio (Cossu et al. 2015; Marini et al. 2016).

ANALISI RETROSPETTIVA DELLA FDG-PET CARDIACA NELL'UOMO

Abbiamo interrogato il database di tutti i pazienti sottoposti a FDG-PET tra gennaio 2017 e dicembre 2015 nel laboratorio di Medicina Nucleare, utilizzando le chiavi di ricerca per linfoma di Hodgkin (LH). Sono stati quindi identificati 587 pazienti, successivamente selezionati secondo i seguenti criteri:

1. età ≥ 18 anni
2. nessun precedente di malattia cardiovascolare
3. assenza di diabete
4. massimo 2 fattori di rischio cardiovascolare tra ipertensione, fumo, dislipidemia, familiarità
5. elettrocardiogramma normale
6. disponibilità dell'esame FDG-PET basale (PET^{STAGING})
7. risposta al trattamento alla PET a metà dei trattamenti (PET^{INTERIM})
8. completamento dello schema ABVD/BEACOPP previsto (40-50 mg/m² di doxorubicina o equivalente per ciclo)
9. FDG-PET negativa al termine del trattamento (PET^{EOT} e al follow-up a 6 mesi (PET^{FOLLOWUP}))
10. Nessuna ricaduta clinica di malattia (nessun trattamento di salvataggio o II linea successivo).

Tale selezione ha ristretto la popolazione a 69 pazienti, di cui abbiamo raccolto i dati anamnestici completi dalle cartelle cliniche disponibili nei centri di ematologia. Sono quindi stati individuati dal database 69 altri soggetti accoppiati per età e sesso, non affetti da LH e non esposti a ANT né ad altri trattamenti con cardiotoxicità miocardica, per costituire un gruppo di controllo. Tutti i pazienti avevano firmato un consenso informato in merito alla procedura di imaging (FDG-PET), prevista come parte delle cure standard (studio retrospettivo). Nessuna ulteriore FDG-PET è stata richiesta ai pazienti, rispetto a quanto eseguito nel contesto delle cure previste dagli ematologi; lo studio è stato approvato dal comitato etico del nostro istituto.

La metodologia standard di esecuzione della FDG-PET nel laboratorio di Medicina Nucleare, applicata pertanto anche per il nostro studio, prevede la somministrazione endovenosa di FDG (4,8 – 5,2 MBq/kg) preceduta da un minimo di 6 ore di digiuno e dal dosaggio della glicemia immediatamente prima della somministrazione. Tutte le scansioni erano state acquisite secondo procedura convenzionale su sistema Hirez-16 PET/CT Hybrid System (Siemens Medical Solution); l'acquisizione inizia 60-75 min dopo la somministrazione di FDG, nel frattempo il paziente viene idratato per aumentare la clearance urinaria della frazione libera di tracciante. La scansione include l'intero corpo con gli arti superiori estesi verso l'alto. Le acquisizioni di emissione durano 120 secondi per posizione; i dati RAW sono quindi ricostruiti con analisi OSEM (ordered subset expectation maximization). Una scansione tomografica non diagnostica (120 kV; 80 mA) senza contrasto è stata associata e i dati PET tridimensionali sono stati uniti a quelli tomografici utilizzando il software integrato (Syngo; Siemens). L'attenuazione del segnale PET è stata corretta utilizzando i dati densitometrici della tomografia.

Due volumi di interesse (VOI) sono stati acquisiti sul miocardio ventricolare sinistro e su uno strato di muscolo lunghissimo del torace, per stimare rispettivamente LV-SUV e SM-SUV. In caso di bassa captazione cardiaca alla PET, per identificare il miocardio sono state utilizzate le immagini CT associate.

I valori di SUV sono stati normalizzati per la concentrazione circolante di FDG, stimata come valore medio di segnale in un VOI tracciato a livello della vena cava inferiore. Queste

analisi sono state eseguite da due medici nucleari specializzati in PET e in imaging cardiaco, in cieco rispetto ai dati cardiologici.

VALUTAZIONE PROSPETTICA DELLA CARDIOTOSSICITÀ

I 69 pazienti inclusi nello studio retrospettivo sono stati ricontattati telefonicamente da un medico. 43 di essi hanno accettato di eseguire una rivalutazione cardiologica clinica ed ecocardiografica, o di fornire i referti di tali esami, eseguiti nel contesto di uno screening routinario della cardi tossicità già prescritto dal centro ematologico di riferimento. Un cardiologo esperto, in cieco rispetto ai dati PET, ha rivalutato tutta la documentazione cardiologica disponibile dei 43 pazienti, ricercando in particolare la presenza di sintomatologia cardiologica intercorrente (palpitazioni, sincopi, angina, dispnea), segni di cardiopatia, e completando la valutazione con elettrocardiogramma (ECG) e ecocardiogramma color-doppler nei pazienti che si sono resi disponibili.

All'ECG è stata valutata la comparsa di nuove alterazioni morfologiche o aritmie.

L'analisi ecocardiografica ha raccolto i dati di frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF), spessori diastolici del ventricolo sinistro settale (IVSd) e posteriore (PWd), diametri ventricolari telesistolici e telediastolici (LVIDs e LVIDd) e la funzione diastolica valutata mediante rapporto tra picco onda E/A e mediante tempo di decelerazione (DT) dello spettro doppler pulsato transmitralico.

Per essere considerato ai fini dello studio l'ecocardiogramma doveva essere stato effettuato almeno 6 mesi dopo l'esposizione a ANT (ECHO^{POST}). Nel caso in cui il paziente avesse reso disponibili più ecocardiogrammi, è stato valutato l'ultimo, privilegiando l'identificazione di alterazioni a medio-lungo termine rispetto a quelle precoci e potenzialmente transitorie.

Sono stati inoltre raccolti i dati ecocardiografici basali di quei pazienti che avevano eseguito un ecocardiogramma prima di iniziare i trattamenti (ECHO^{PRE}).

ANALISI DEI DATI

L'analisi dei dati è stata eseguita utilizzando il pacchetto statistico del software "R" (ver. 3.4) e SPSS (ver. 1.2). I dati sono presentati come media \pm deviazione standard (SD), e come valori assoluti e proporzioni (%), se non altrimenti specificato. Il test delle ipotesi statistiche è stato considerato significativo per un valore di $p < 0,05$. Le differenze tra variabili continue sono state testate mediante test-T di Student per misure indipendenti o appaiate quando appropriato, e con ANOVA per misure ripetute se le misurazioni erano > 2 . Le variabili categoriche sono state valutate con test del chi-quadrato.

Le relazioni tra variabili continue sono state testate mediante test di correlazione lineare di Pearson.

TRASFORMAZIONE DELLE VARIABILI

I valori di SUV sono stati sottoposti a una analisi preliminare di normalità. I valori di asimmetria e curtosi hanno confermato una distribuzione asimmetrica evidenziata graficamente, che è stata normalizzata efficacemente mediante log-trasformazione (dati trasformati in \log_{10}) per le analisi che richiedevano una variabile normale.

I valori di LVEF riportati nella maggior parte dei referti sono stati valutati affidabili ai fini clinici, tuttavia erano viziati da diversi fattori:

1. Esecuzione in diversi centri, con diverse apparecchiature e operatori;
2. Utilizzo non standardizzato di metodiche di calcolo come la Simpson nei pazienti con soli dati retrospettivi (nella pratica clinica spesso la LVEF è stimata visualmente);
3. Abitudine degli operatori a definire un valore normale (tipicamente 55% o 60%) senza fornire una variabile continua, specialmente importante in uno studio sulle alterazioni precoci della cardi tossicità, in cui i valori di LVEF si aggirano vicino al range di normalità.

Tale limite è stato aggirato mediante ricalcolo della LVEF sulle misure lineari secondo formula di Teicholz. Tale valutazione ha permesso di ridurre il BIAS legato all'interpretazione

effettuata dagli operatori. La valutazione è stata infatti standardizzata sulle misure originali (ricalcolabili dalle immagini allegate) ed eseguita da un solo ecocardiografista esperto. L'utilizzo di valutazioni lineari della funzione sistolica è stato ampiamente documentato in letteratura nel paziente giovane con cardiotoxicità, e i limiti delle assunzioni geometriche della metodica sono stati ritenuti modesti in assenza di dilatazione ventricolare o alterazioni regionali (Hequet et al. 2004). Ai fini del nostro lavoro, e nel contesto dei nostri pazienti definiti non cardiopatici a priori, i limiti sono stati considerati inferiori ai benefici.

GESTIONE DEI FATTORI CONFONDENTI

Per verificare che i 69 pazienti studiati fossero rappresentativi della popolazione affetta da LH, la distribuzione di LV-SUV e di SM-SUV è stata confrontata tra il gruppo di studio e i rimanenti 36 pazienti esclusi per malattia residua alla PET^{INTERIM}.

Nel valutare l'impatto della captazione PET sulla cardiotoxicità, è stata effettuata una analisi multivariata che ha incluso età, sesso, dose cumulativa di ANT, stadio di malattia Ann-Arbor. Inoltre, data la variabilità dell'intervallo di tempo con cui è stata fatta la valutazione cardiologica rispetto all'esposizione a ANT (range 8-96 mesi), la durata del follow-up cardiologico è stata inclusa come covariata.

RISULTATI

LA CAPTAZIONE DI GLUCOSIO AUMENTA DOPO L'ESPOSIZIONE A ANT NEL MODELLO MURINO, ED È EVIDENZIABILE ALLA FDG-PET

All'analisi di micro-PET dinamica, i topi esposti a dose standard di ANT hanno mostrato un incremento di LV-MRGlucose da $17,5 \pm 3,7$ a $27,9 \pm 9,1$ $\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ ($p < 0,05$ vs controlli; $p < 0,05$ vs baseline). La dose elevata di ANT ha indotto un aumento ancora più marcato da $16,7 \pm 5,1$ to $37,2 \pm 7,8$ $\text{nMol} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ ($p < 0,01$ vs controlli e baseline, $p < 0,05$ vs dose standard). Nessuna

variazione significativa si è verificata nei controlli (da $17,9\pm 4,4$ a $18,9\pm 4,8$ $\text{nMol}\times\text{min}^{-1}\times\text{g}^{-1}$; $p=\text{n.s.}$). Come intuibile, anche l'analisi di LV-SUV ha riprodotto risultati analoghi (**fig.1 A, B**).

L'analisi del muscolo scheletrico ha mostrato una selettività dell'effetto di ANT sul muscolo cardiaco. Sia SM-MRGlu che SM-SUV sono risultati stabili nei topi esposti ad entrambe le dosi di ANT e nei controlli (**fig.1 C**).

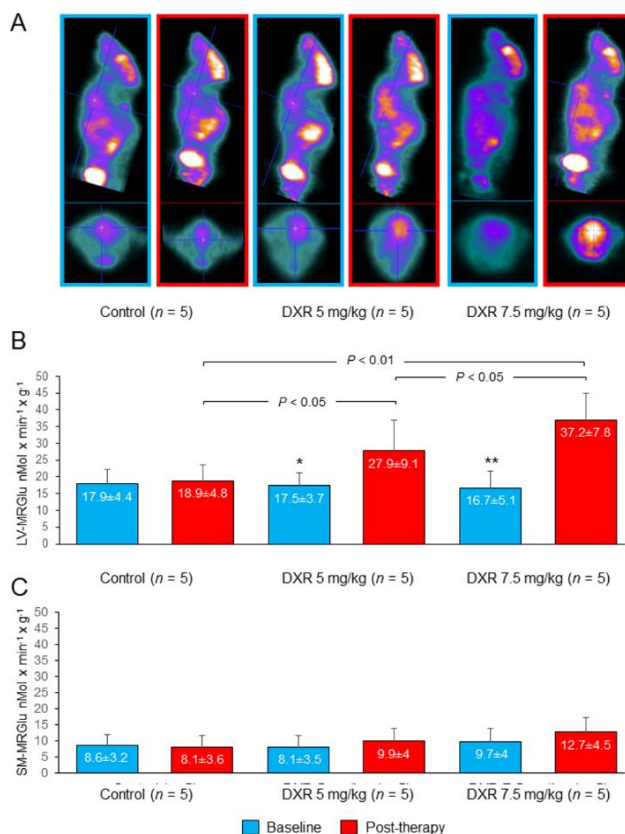


Figura 1: analisi micro-PET dei topi esposti a doxorubicina a dose 5 mg/Kg (DXR 5) e 7,5 mg/Kg (DXR 7,5) rispetto al basale e al gruppo di controllo. Consumo di glucosio nel miocardio (B) e nel muscolo scheletrico (C).

Di conseguenza il rapporto LV/SM-SUV è rimasto stabile nei topi di controllo ($3,28\pm 0,9$) e ha mostrato un incremento nei soli topi esposti a ANT, ($4,42\pm 1,02$ e $6,43\pm 1,96$ rispettivamente per la dose standard ed elevata di ANT, $p<0,05$ e $p<0,01$).

I PAZIENTI ESPOSTI A ANT MOSTRANO UN PATTERN CARDIACO INCOSTANTE IN FDG-PET, MA NON PRESENTE NEI CONTROLLI

Di seguito sono riportati i dati dei 69 pazienti con LH esposti ad ANT e dei controlli in cui è stata valutata la FDG-PET (**tab.1**).

Tab.1	LH (ANT)		controlli		p
	n	%	n	%	
sexo maschile	37	53%	35	50%	ns
	media	DS	media	DS	
età	39	±13	41	±8	ns
peso (kg)	67,1	±12	76,5	±7	<0,05
intervallo tra PET (giorni)					
T1 (interim)	74	±21	99	±90	<0,05
T2 (end of treatment)	148	±70	167	±98	ns
T3 (follow-up)	195	±92	229	±100	ns
follow up (T0-T3)	427	±198	448	±141	ns
stadio Ann Arbor					
	n	%			
I	7	10%			
II	42	60%			
III	8	12%			
IV	12	17%			
sintomi B	10	14%			

Caratteristiche dei pazienti nello studio PET

Il valore di $LV-SUV^{STAGING}$ era simile nel gruppo di studio, nei controlli, e nei pazienti con LH esclusi per presenza di malattia alle valutazioni successive (**fig.2 A**). Erano simili anche lo stadio Ann-Arbor, l'età e il sesso dei pazienti esclusi per altri criteri (malattia o perdita al follow-up). Ciò suggerisce una bassa probabilità di BIAS di selezione.

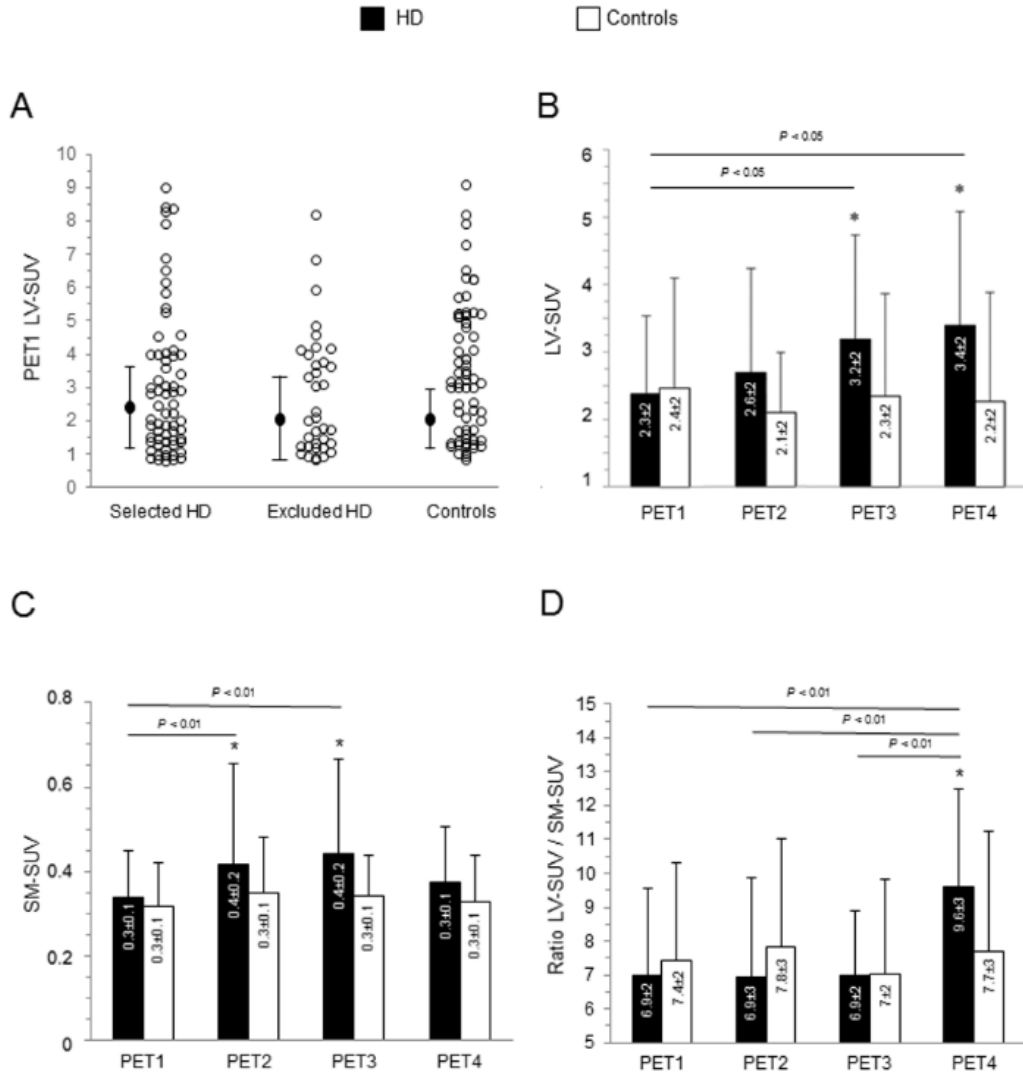


Figura 2: controllo del BIAS di selezione (A): captazione di glucosio prima di ANT al basale nei pazienti inclusi, nei controlli e nei pazienti esclusi. SUV miocardica (B), nel muscolo scheletrico (C) e loro rapporto (D) alle PET eseguite nei diversi tempi dello studio (baseline=PET1; interim=PET2; fine trattamento=PET3; follow-up=PET4). In nero i pazienti con linfoma di Hodgkin esposti a ANT, in bianco i controlli.

Nei pazienti esposti a ANT, la captazione cardiaca alla FDG-PET mostrava un comportamento medio già evidenziato nel modello murino. $LV-SUV^{STAGING}$ era $2,37 \pm 1,6$ ed

aumentava progressivamente a LV-SUV^{INTERIM} e alla LV-SUV^{EOT} a fine trattamento (“end of treatment”). L’aumento di LV-SUV si manteneva anche al follow up a 6 mesi (**fig.2 B**).

I controlli invece, non esposti a ANT, non mostravano tale comportamento dell’LV-SUV durante trattamenti. Pertanto il confronto tra il gruppo ANT e i controlli mostrava una differenza dell’LV-SUV che era significativa alla PET^{EOT} e PET^{FOLLOWUP}.

Anche nell’uomo è stato confermato il differente comportamento del muscolo scheletrico rispetto al miocardio, con solo un minimo incremento del SM-SUV durante esposizione a ANT, peraltro transitorio ovvero non più evidenziabile alla PET^{FOLLOWUP} (**fig.2 C**). Il rapporto LV/SM-SUV risulta pertanto incrementato nei pazienti esposti ad ANT (**fig.2 D**).

Tuttavia, rispetto al modello sperimentale, sebbene si sia confermato un incremento medio della captazione miocardica durante e dopo ANT nei pazienti con LH, tale effetto si è presentato in maniera eterogenea nei pazienti. La presenza di un pattern di LV-SUV in aumento era presente solo in alcuni pazienti, e tale variabilità non veniva giustificata da una analisi che ha incluso la dose di ANT.

LO SVILUPPO DI ALTERAZIONI CARDIACHE SI ASSOCIA A UN PATTERN CARDIACO SPECIFICO

Dei 69 pazienti, 36 hanno svolto una valutazione cardiologica clinica e anamnestica approfondita. Nel periodo di osservazione dalla PET^{FOLLOWUP} al contatto telefonico (mediana 30 mesi, range 3-96 mesi) nessuno dei 69 pazienti ha avuto ospedalizzazioni potenzialmente relate a un problema cardiologico. La valutazione clinica è stata effettuata nei 36 pazienti con un intervallo di tempo mediano di 27 mesi (range 8 – 96). Segni di possibile cardiotoxicità all’ECG ed ecocardiogramma sono stati identificati in 11 pazienti (31%):

2 pazienti con lieve calo della frazione di LVEF ritenuto clinicamente significativo (<53%).

1 paziente con fibrillazione atriale

2 pazienti con alterazioni della ripolarizzazione all’ECG (onde T negative/difasiche) senza correlato di ischemia

6 pazienti con comparsa di disfunzione diastolica di I-II grado (alterato rilasciamento o pattern pseudo-normale al doppler pulsato transmitralico).

La LVEF media nel gruppo di 36 pazienti era normale al basale come definito nei criteri di inclusione, e non risultava significativamente ridotta al follow-up. Lo sviluppo di alterazioni ECG/ecocardiografiche non era significativamente correlata in analisi multivariata con età, sesso, dose cumulativa di ANT o con la durata del follow-up (**tab.2**).

Tab.2 fattori al basale	follow up cardiologico				p
	normale (n=25)		alterato (n=11)		
	n	%	n	%	
genere maschile	14	56%	7	63%	ns
ipertensione	2	8%	1	9%	ns
fumo	5	20%	2	18%	ns
famigliarità	2	8%	1	9%	ns
	media	DS	media	DS	
età	36,8	±12	44,5	±17	ns
peso (kg)	68,9	±13	70,7	±12	ns
LDL colesterolo (mg/dl)	120	±28	113	±31	ns
creatinine (mg/dl)	0,8	±0,1	0,7	±0,1	ns
dose di ANT (mg)	431	±109	421	±107	ns
durata follow-up (giorni)	1121	±874	860	±665	ns
diametro telediastolico (mm)	49,2	±1,0	48,0	±3,0	ns
LVEF (%)	59,8	±2,1	59,3	±1,7	ns

caratteristiche cardiologiche e fattori di rischio per cardiotoxicità nei pazienti in studio

Abbiamo invece evidenziato che LV-SUV era in aumento rispetto al basale nei pazienti con alterazioni cardiologiche, mantenendo livelli superiori al basale anche 6 mesi dopo il trattamento alla PET^{FOLLOWUP}. Tale pattern, già evidenziato nel modello murino, non era evidenziato nei pazienti senza alterazioni ECG/ecocardiografiche (**fig.3 D**).

La valutazione dei valori assoluti di LV-SUV non è stata in grado di evidenziare differenze significative alla LV-SUV^{INTERIM} o LV-SUV^{EOT}. È stata invece evidenziata una ridotta captazione cardiaca alla PET di stadiazione. LV-SUV^{STAGING} era infatti significativamente più basso negli 11 pazienti con alterazioni rispetto ai 25 con follow-up cardiologico negativo, rispettivamente $1,53 \pm 0,90$ vs $3,34 \pm 2,54$ ($p < 0,01$) (**fig.3 C**).

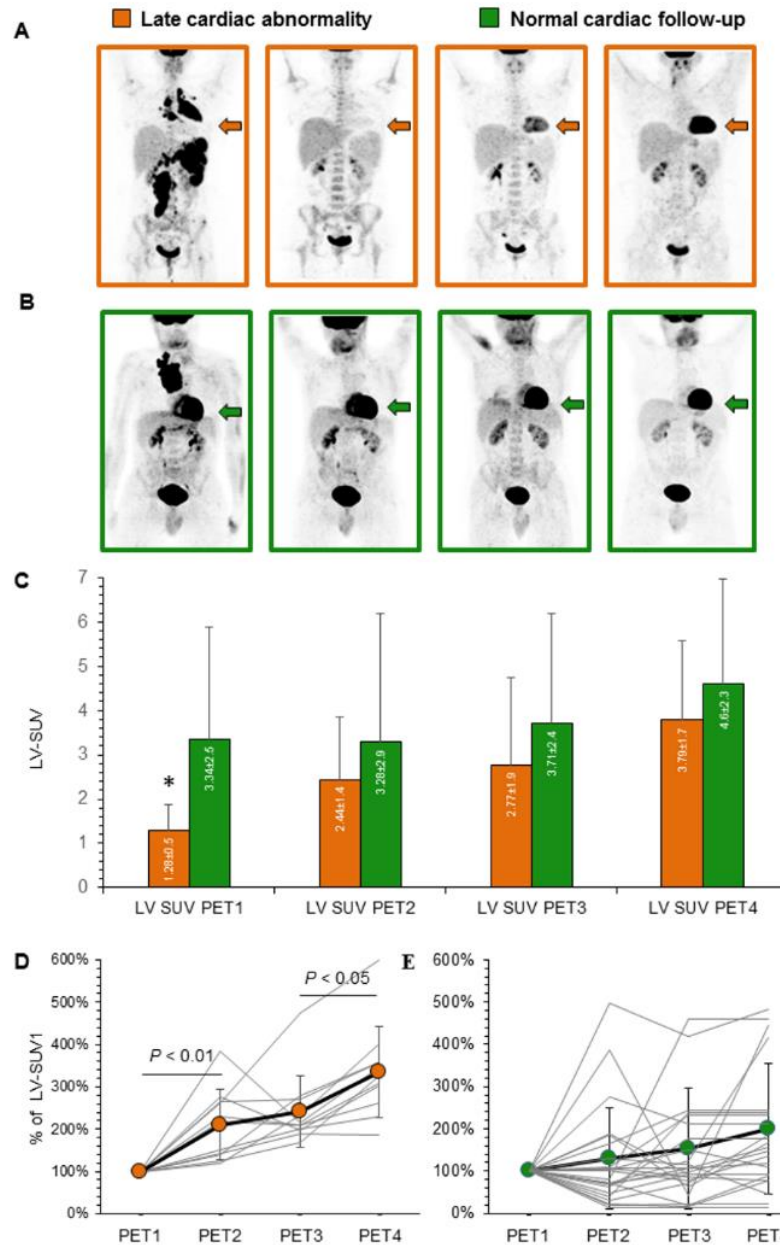


Figura 3: captazione cardiaca del glucosio nei pazienti con (arancio) e senza (verde) alterazioni ECG/Ecocardigrafiche. Esempi (A, B), valori assoluti (C) e variazioni relative (D, E).

All'analisi multivariata, un basso valore di LV-SUV^{STAGING} ha mostrato un significativo valore predittivo della comparsa di alterazioni ECG/ecocardiografiche, aggiuntivo rispetto ai classici fattori di rischio di cardiotoxicità (**tab.3**).

Tab.3	Univariata			Multivariata		
	OR	IC (95%)	p	OR	IC (95%)	p
sexo	0,80	0,19 – 3,35	0,760	*		0,142
età	1,04	0,99 – 1,09	0,140	*		0,339
stadio Ann Arbor	0,94	0,41 – 2,12	0,882	*		0,694
radioterapia	1,30	0,31 – 5,39	0,718	*		0,711
dose ANT (mg/mq)	1,00	0,99 – 1,01	0,963	*		0,486
LV-SUV ^{STAGING}	0,18	0,03 – 0,85	0,030	0,065	0,006 – 0,74	<0,001
durata follow-up (mesi)	1,00	0,99 – 1,00	0,364	*		0,408

* n.s. ; escluso dal modello finale

analisi multivariata dei fattori associabili a alterazioni ECG/ecocardiografiche

NEI PAZIENTI CON LH, VALORI DI LV-SUV ELEVATI DOPO ANT SI ASSOCIANO A UN LIEVE CALO DELLA FUNZIONE SISTOLICA

Abbiamo rivalutato il database del laboratorio di ecocardiografia cercando i 69 pazienti nello studio, ed includendo nella ricerca anche i pazienti di cui non avevamo i dati di acquisizione della PET^{FOLLOWUP} (perché eseguiti, ad esempio, presso altro centro). Tale scelta è stata indotta dai risultati dello studio precedente che evidenziavano una significatività di LV-SUV^{EOT} comparabile. In tal modo siamo stati in grado di raccogliere i dati ecocardiografici dettagliati di 43 pazienti, che da disegno dello studio erano stati acquisiti ≥ 6 mesi dopo l'esposizione ad ANT (mediana 22 mesi; range 6-76), e definiti ECHO^{POST}.

Di 26 pazienti era disponibile anche un dato ecocardiografico basale, prima dell'esposizione ad ANT, definito ECHO^{PRE}. Su entrambi gli ecocardiogrammi abbiamo quindi calcolato la LVEF mediante formula di Teicholz, come definito nei metodi.

Nei 43 pazienti dello studio il profilo di rischio cardiovascolare era basso, l'età media era 35 ± 15 anni (**tab.4**). La glicemia è risultata normale in tutti i pazienti al baseline (82 ± 5 mg/dl) ed è rimasta normale alla PET^{INTERIM} (83 ± 10 mg/dl) e a fine trattamento (86 ± 24 mg/dl).

Tab.4	n	%
genere maschile	25	58%
fattori di rischio		
ipertensione	0	0%
diabete	0	0%
fumo	18	42%
dislipidemia	4	9%
famigliarità	8	19%
età >65	0	0%
storia di cardiopatia	0	0%
insufficienza renale	0	0%
caratteristiche oncologiche		
radioterapia mediastinica (extra cardiaca)	6	14%
anaemia (Hb <10 g/dl)	0	0%
	media	DS
dose di doxorubicina (mg/m ²)	251	± 57
ecocardiografia		
	n	%
eseguita	26	60%
	media	DS
diametro telediastolico (mm)	47,2	$\pm 5,2$
diametro telesistolico (mm)	28,2	$\pm 3,9$
LVEF teicholtz (%)	70,3	$\pm 7,1$
frazione di accorciamento (%)	40,1	$\pm 6,2$
caratteristiche al basale dei pazienti nello studio ecocardiografico		

LVEF^{PRE} è risultata nel range di normalità (>53%) in tutti i pazienti, anche dopo ricalcolo con metodo Teicholz. Normali erano anche i diametri ventricolari (tab.). Nel follow-up il valore medio di LVEF^{POST} era di nuovo entro i limiti di normalità (68,8±10,3 %), e solo in 3 pazienti (7%) era sceso sotto il limite di normalità, in assenza di scompenso cardiaco clinico (disfunzione ventricolare sinistra subclinica). Nei pazienti in cui era confrontabile un ECHO^{PRE}, LVEF e LVEDD non subivano variazioni significative, rispettivamente da 69,0±9,3 % a 70,3±7,1 % ($p=0,43$) e da 47,2±5,2 mm a 46,9±4,9 mm ($p=0,60$).

L'analisi dell'LV-SUV già eseguita nello studio precedente è stata riprodotta nei 43 pazienti, ed è stato confermato un valore medio in aumento durante l'esposizione ad ANT, risultante da un comportamento eterogeneo: alcuni pazienti con un pattern in aumento e altri con una sostanziale stabilità della captazione miocardica (**fig.4**).

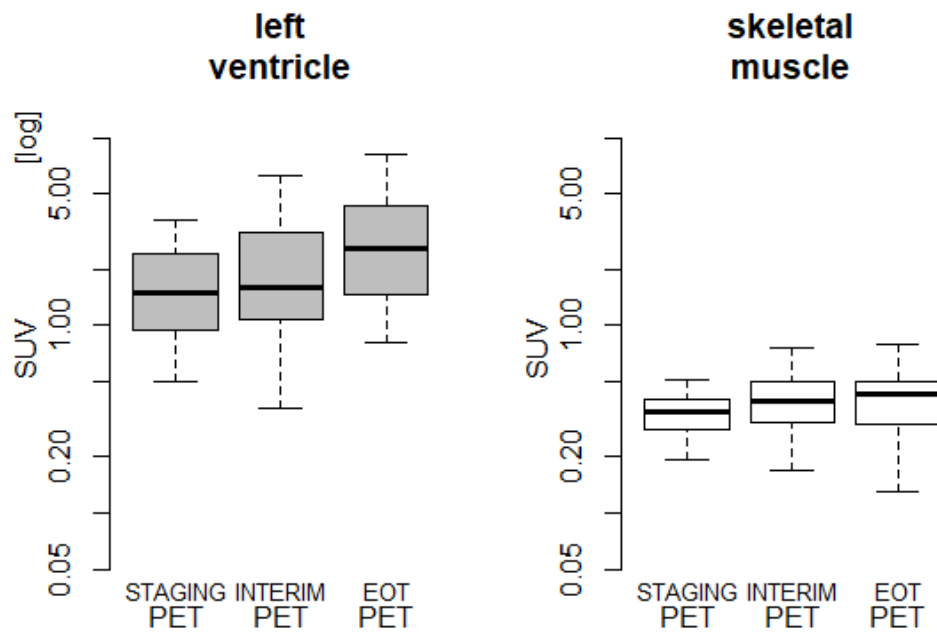


Figura 4: captazione di glucosio nel miocardio e nel muscolo scheletrico dei pazienti con linfoma di Hodgkin, calcolati al basale, durante e al termine del trattamento con ANT.

Dividendo i pazienti rispetto al valore mediano di LV-SUV in corso di trattamento con ANT (PET^{INTERIM} o la PET^{EOT}) in un gruppo LV-SUV^{HIGH} e un gruppo LV-SUV^{LOW}, i pazienti LV-SUV^{HIGH} mostravano una LVEF^{POST} più bassa (**fig.5**).

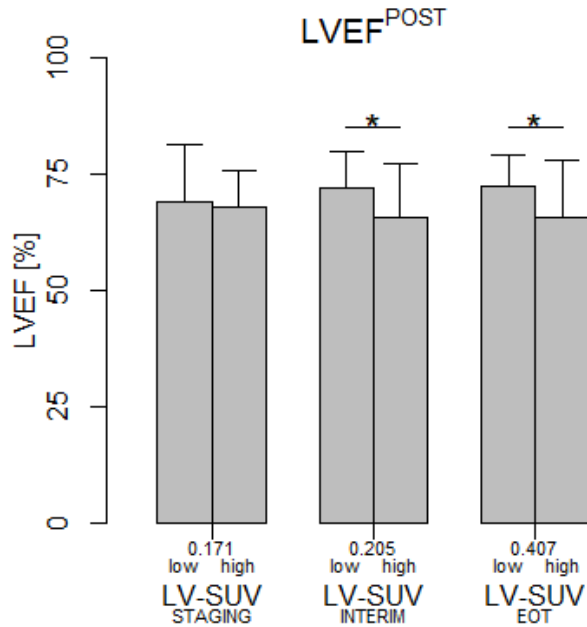


Figura 5: frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) suddividendo i 43 pazienti in base alla captazione di glucosio elevata (high) o bassa (low) ai diversi tempi di valutazione PET

Tale riscontro era riproducibile anche nel sottogruppo di 26 pazienti con ECHO^{PRE}. In tale sottogruppo non è stata evidenziata una diversa LVEF basale in relazione ai valori di LV-SUV a qualunque scansione nello studio. Di conseguenza abbiamo evidenziato un calo medio significativo (§; #) della LVEF nei soli pazienti LV-SUV^{HIGH} (**fig.6**).

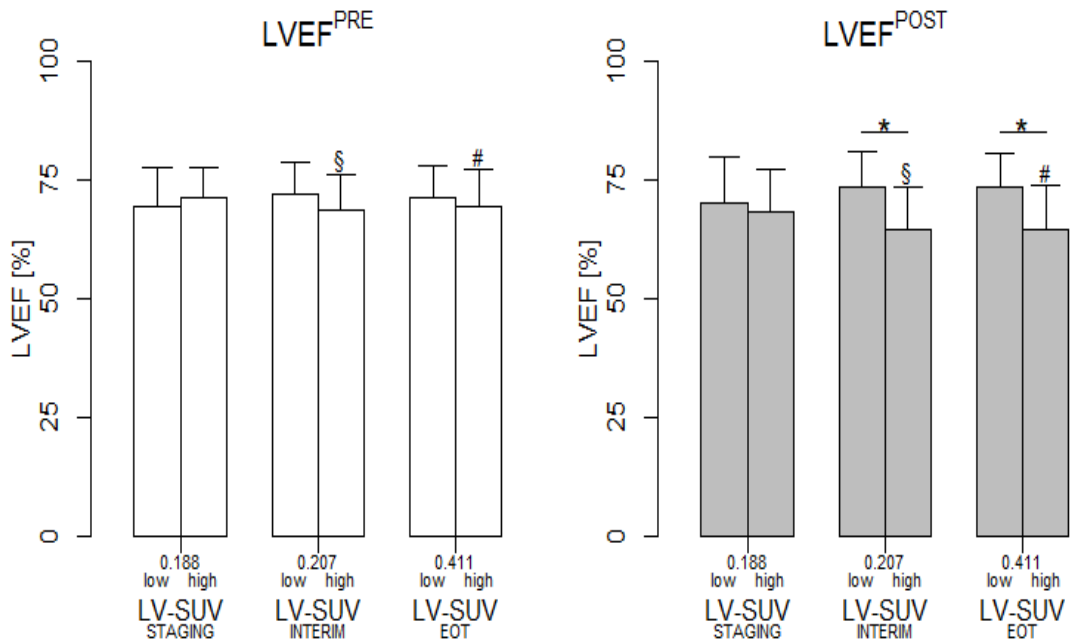


Figura 6: frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) suddividendo i 26 pazienti in base alla captazione di glucosio elevata (high) o bassa (low) ai diversi tempi di valutazione PET. Rispetto alla figura 5 è possibile valutare il confronto con il valore di LVEF basale (colonne bianche).

Abbiamo quindi eseguito un'analisi continua di correlazione tra LV-SUV e le variazioni LVEF tra ECHO^{PRE} ed ECHO^{POST} (Δ LVEF). Abbiamo presentato i dati relativi alla PET^{EOT} poiché gli scostamenti di LV-SUV erano maggiori rispetto alla PET^{INTERIM} (stadio di esposizione a metà dose cumulativa di ANT). Le due variabili LV-SUV^{EOT} e Δ LVEF hanno mostrato una correlazione inversa, ovvero a maggior valore di captazione di glucosio miocardico corrisponde un calo di LVEF. L'associazione in modello lineare univariato (**fig.7**) rimaneva significativa anche in modello multivariato dopo aggiustamento per età, dose di ANT e durata del follow-up ecocardiografico, incluse come covariate (**tab.5**).

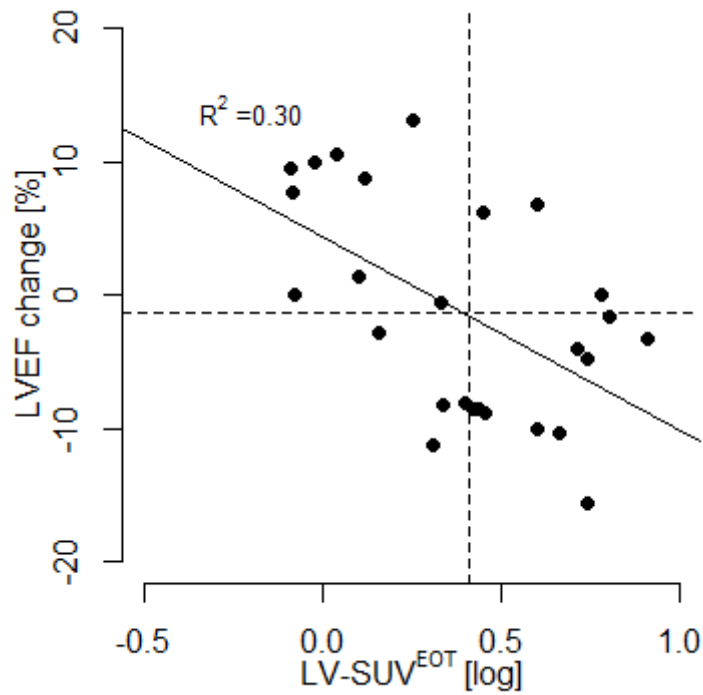


Figura 7: correlazione tra la variazione della frazione di eiezione (LVEF) e la captazione miocardica di glucosio alla PET

Tab.5	Coeff.	SE	β	p	R²	p
Univariata						
LV-SUV ^{EOT}	-14,5	4,58	-0,55	0,004	0,30	0,004
Multivariata						
LV-SUV ^{EOT}	-13,5	4,88	-0,50	0,01	0,37	0,039
durata follow-up (mesi)	-0,15	0,14	-0,19	0,30		
dose ANT (mg/mq)	0,024	0,02	0,19	0,29		
età (anni)	0,012	0,12	0,02	0,92		

analisi multivariata dei fattori associabili al calo di frazione di eiezione

Non vi era invece alcuna differenza nei diametri ventricolari, in particolare il LVEDD, tra i pazienti LV-SUV^{HIGH} e LV-SUV^{LOW} ad alcun momento di valutazione della PET (**tab.6**).

Tab.6	LV-SUV	EDD (mm)		
		media	DS	p
staging	alto	47,7	5,2	0,81
	basso	47,3	5,2	
interim	alto	48,7	5,2	0,11
	basso	46,1	4,9	
fine trattamento	alto	47,7	5,1	1,00
	basso	47,7	4,8	

diametro telediastolico (EDD) in pazienti con alta o bassa captazione miocardica del glucosio

Rispetto allo studio precedente non abbiamo evidenziato una associazione tra LVEF^{POST} e il valore di PET^{STAGING}.

DISCUSSIONE

Il lavoro qui presentato dimostra che l'esposizione ad ANT causa modificazioni del metabolismo miocardico in cuori altrimenti sani, sia in modello murino che in pazienti affetti da LH. L'effetto è ampiamente riproducibile nell'animale da esperimento, mentre il comportamento della LV-SUV nell'uomo è molto eterogeneo, con solo alcuni pazienti che mostrano un aumento marcato della captazione di FDG persistente almeno 6 mesi dopo la chemioterapia.

I nostri dati in una piccola corte di pazienti a basso rischio mostrano un'associazione di:

- basso valore di LV-SUV al basale
- incremento di LV-SUV dopo ANT
- alterazioni subcliniche di ECG ed ecocardiografiche nei pazienti con incremento di LV-SUV
- calo di LVEF modesto ma individuabile diversi mesi dopo esposizione ad ANT nei pazienti con valore assoluto di LV-SUV più elevato indotto da ANT.

LA PET CONFERMA LE MODIFICAZIONI DEL METABOLISMO MIOCARDICO NELLA CARDIOTOSSICITÀ DA ANT

I risultati del lavoro arricchiscono una recente letteratura che ha posto l'attenzione sulle alterazioni FDG-PET cardiache nella cardiotoxicità da antracicline, e ha posto le basi per un nuovo ambito di ricerca (Borde, Kand, e Basu 2012; Gorla et al. 2016; Kim et al. 2014).

Comprendere il meccanismo che provoca un incremento dell'LV-SUV nei miocardiociti esposti ad ANT potrebbe aiutare a comprendere meglio la fisiopatologia della cardiotoxicità da ANT a livello del miocardiocita (Groarke e Nohria 2015), una questione ancora irrisolta, e porre le basi per nuove strategie di cardioprotezione.

La cardiotoxicità da ANT causa un danno che si può assumere si verifichi, almeno a livello biomolecolare e cellulare, in tutti i pazienti esposti e al momento stesso dell'esposizione, costituito da una triade di:

- tossicità sulla topoisomerasi-2 β (Lyu et al. 2007),
- stress ossidativo(Tocchetti et al. 2017),
- dismutazione mitocondriale(Mercurio et al. 2016).

Le alterazioni cardiache rilevabili a livello istologico e macroscopico si manifestano quasi sempre con un ritardo temporale legato alla dose tanto nel modello murino quanto, nella maggior parte dei casi, nell'uomo(Lyu et al. 2007; Varricchi et al. 2018).

La cronologia della cardiotoxicità da ANT può pertanto essere schematizzata in due fasi, una prima cellulare e biochimica, che inizia immediatamente dopo la somministrazione di ANT, e una ritardata di mesi o più spesso anni, che interessa l'intero organo cardiaco determinandone alterazioni clinicamente rilevanti. Lo sviluppo di questa seconda fase può essere causato, secondo un'autorevole teoria, da un secondo stress cardiaco (ischemia, sovraccarico di pressione o di volume) che può interessare indipendentemente il paziente precedentemente esposto ad ANT(Suter e Ewer 2013). Potenziali spiegazioni fisiopatologiche per questo decorso a due fasi restano a livello di ipotesi, e chiamano in causa la "stalled autophagy"(Li et al. 2018) e la senescenza cellulare(Spallarossa et al. 2009).

In questo modello temporale di cardiotoxicità, le alterazioni PET che abbiamo evidenziato si collocano molto precocemente e sono in accordo con dati sperimentali già presenti in letteratura. Anormalità del metabolismo del miocardiocita potrebbero verificarsi sin dalle prime fasi della tossicità da ANT, non solo nelle fasi conclamate di insufficienza cardiaca, e le alterazioni PET potrebbero corrispondere, a livello cellulare, alla depressione della funzione mitocondriale con un incremento della glicolisi per produzione di lattato(Varricchi et al. 2018; Neubauer 2007). È già stato dimostrato sperimentalmente che una concentrazione 1 μ M di doxorubicina all'incirca raddoppia la captazione di 2-deossiglucosio (analogo dell'FDG) nei cardiomiociti neonatali di ratto, tramite un incremento dell'espressione di GLUT-1(Hrelia et al. 2002). Le ANT inibiscono inoltre la funzione mitocondriale e l'ossidazione degli acidi grassi, che potrebbe causare un aumento della captazione del glucosio attraverso la fosforilazione dell'AMPK (AMP-activated protein kinase)(Carvalho et al. 2010; Tokarska-Schlattner et al.

2005). Nel contesto di questa riorganizzazione del metabolismo cellulare, l'incremento dell'attività dell'esochinasi potrebbe avere un ruolo centrale (Zhang et al. 2012; Li et al. 2018; Carvalho et al. 2010; Berthiaume e Wallace 2007). Dal momento che l'attività di tale enzima è responsabile, tra l'altro, della fosforilazione del FDG e pertanto della ritenzione intracellulare del tracciante PET (Sokoloff et al. 1977), è ragionevole ipotizzare che proprio l'aumento dell'attività dell'esochinasi giustifichi l'aumento del LV-SUV indotto da ANT nella fase di tossicità cellulare, ben prima della disfunzione meccanica miocardica macroscopicamente rilevabile.

Una correlazione tra il cosiddetto "glucose-shift" e la disfunzione metabolica del miocardiocita rimane comunque tuttora elusiva: in alcuni studi l'incremento di captazione di glucosio è stata transitoria (Hrelia et al. 2002) e successivamente compensata da una riduzione della stessa. Si può speculare sul fatto che tale transitorietà sia stata evidenziata con dosi di ANT inferiori a quelle usate nel nostro modello (Wakasugi et al. 1993).

Indipendentemente dai meccanismi che causano il "glucose-shift" indotto da ANT, se fosse confermata la tesi che tale fluttuazione della captazione di glucosio rispecchi direttamente una tossicità sul metabolismo del cardiomiocita, il nostro e altri recenti studi potrebbero essere visti come la conferma indiretta che le alterazioni del metabolismo miocardico indotte da ANT avvengono nell'uomo proprio come nel modello sperimentale (Gorla et al. 2016; Kim et al. 2014), in cui è stato sinora più facile valutare direttamente il consumo di glucosio.

ALTERAZIONI CARDIACHE NEL PAZIENTE CON LH ASSOCIATE A LV-SUV

La LV-SUV nella corte di pazienti con LH ha mostrato un trend medio in incremento, seppur con una notevole disomogeneità di comportamento tra pazienti. La variabilità della captazione cardiaca di FDG alla valutazione basale era notevole e mentre alcuni pazienti hanno mostrato un aumento significativo dopo ANT, altri hanno mostrato una variazione trascurabile. Si potrebbe ipotizzare che l'effetto misurato sia attribuibile a regressione verso la media in un contesto di ampia variabilità, potenzialmente correlata al regime dietetico non controllato nello studio retrospettivo. Tuttavia la sostanziale unidirezionalità del comportamento temporale di LV-SUV

durante esposizione ad ANT e la persistenza di valori elevati di LV-SUV a distanza di 6 mesi dall'esposizione non possono essere spiegati dal caso. Il differente comportamento della captazione di FDG nel miocardio rispetto al muscolo scheletrico valutata nel nostro studio è inoltre in linea con l'andamento temporale e la selettività tissutale documentati nel modello murino (Gilliam et al. 2013; Lebrecht Dirk et al. 2003).

L'analisi caso-controllo eseguita sui pazienti che sono stati valutati a distanza ha mostrato un pattern LV-SUV in aumento durante l'esposizione ad ANT nei pazienti con alterazioni ECG/ECO subcliniche. Questo end-point aggregato ha incluso diverse alterazioni potenzialmente associate a tossicità da ANT, in particolare la disfunzione diastolica. Lo screening della cardiotoxicità da ANT prevede infatti una valutazione integrata di diversi strumenti diagnostici, come si evince dai documenti di consenso in materia (Plana et al. 2014; Spallarossa et al. 2016). La LVEF è risultata co-correlata alle alterazioni ECG/ECO ma non raggiungeva la significatività di associazione con LV-SUV^{STAGING}.

Sulla base di questi risultati abbiamo pertanto esteso il lavoro, rovesciando la prospettiva, e valutato LV-SUV e LVEF in uno studio dedicato, dal momento che un valore di LVEF precocemente ridotto, anche marginalmente (50-55%), è uno dei più importanti parametri predittivi di cardiotoxicità (Mousavi et al. 2015; Romond et al. 2012). Ampliando lievemente la corte di pazienti con i dati ottenibili da esami ecocardiografici in archivio e inviati dai pazienti, e con l'uso della formula di Teicholz per ottenere una variabile sistematicamente misurata e continua, è stato possibile dimostrare che valori assoluti elevati di LV-SUV dopo esposizione ad ANT si associano a un calo della LVEF. A rafforzare il rapporto di causalità con ANT, la differenza di LVEF tra i pazienti ad alto e basso LV-SUV era più consistente valutando LV-SUV^{EOT} rispetto a LV-SUV^{INTERIM}, in verosimile relazione alla maggiore dose cumulativa di ANT.

È da notare che la prima analisi multivariata per alterazioni ECG/ECO ha mostrato che il fattore con OR significativo era un basso valore di LV-SUV^{STAGING}, al basale, più che un valore elevato di LV-SUV^{EOT} finale. Quando l'analisi è stata ampliata ad altri pazienti per analizzare

LVEF, una correlazione in uni- e multivariata è stata trovata invece con il valore assoluto di LV-SUV^{EOT}.

Tale discrepanza dovrà essere chiarita con ulteriori indagini, in particolare volte a esplorare l'intrigante ipotesi che la cardiotoxicità cardiaca sia in qualche modo dipendente da fattori metabolici presenti "a priori".

POTENZIALI IMPLICAZIONI DELLO STUDIO

Indipendentemente da quale sia il meccanismo con cui le ANT determinano un incremento di captazione del glucosio a livello miocardico, tale incremento è compatibile con una perturbazione del metabolismo miocardico. Il nostro studio ha confermato in modo sistematico che tale effetto è esplorabile mediante FDG-PET anche in ambito clinico, con alterazioni che persistono almeno sino a 6 mesi dopo l'esposizione. Questa anomalia non si evidenzia omogeneamente in tutti i pazienti ma sembra associata allo sviluppo di alterazioni prevalentemente subcliniche di ECG/ECO e ad un valore più basso di LVEF dopo i trattamenti. È già stato dimostrato che tali alterazioni cardiache evidenziabili con esami convenzionali (ECG/ECO) sono marcatori di rischio di cardiotoxicità, ma LV-SUV potrebbe essere un marcatore molto più precoce.

Allo stato attuale della pratica clinica, lo screening della cardiotoxicità si basa principalmente sulla valutazione della LVEF con ecocardiografia convenzionale, ma tale strategia è in grado di catturare solo una fase già evoluta della cardiotoxicità, in cui si sviluppa disfunzione ventricolare macroscopica. È dimostrato che quanto prima vengono impiegati i farmaci cardioprotettivi, al limite anche in prevenzione primaria, tanto maggiore è il loro beneficio (D. Cardinale et al. 2015; Bosch et al. 2013). Tuttavia tale pratica è scarsamente applicata per il rischio di effetti avversi quali l'ipotensione (Spallarossa et al. 2013). La PET potrebbe permettere di selezionare i pazienti che meritano davvero l'impiego di beta-bloccanti e ACE-inibitori, evitando gli effetti indesiderati nei pazienti realmente a basso rischio.

Al momento i marker di cardiotossicità più precoci suggeriti dai documenti di consenso sono il global-longitudinal-strain (GLS) valutato con metodica ecocardiografica “speckle-tracking”, e il dosaggio seriato della troponina durante i cicli di trattamento (Plana et al. 2014; Zamorano et al. 2016). Tuttavia tali strumenti sono ampiamente inutilizzati a fini clinici, e ci si affida ancora alla sola valutazione della LVEF, per intuibili motivi pratici la cui discussione esula da questo lavoro. La valutazione dell’LV-SUV avrebbe i vantaggi di non determinare un peso aggiuntivo sui pazienti ematologici ed oncologici, che sono già sottoposti a un notevole numero di esami e procedure, e potenzialmente di ridurre i costi di monitoraggio richiesti da esami dedicati. La FDG-PET è infatti eseguita routinariamente per la diagnosi, la valutazione della risposta, e il follow-up di moltissime malattie ematologiche e oncologiche maligne che richiedono trattamenti con ANT, e nel linfoma di Hodgkin è ritenuta lo “standard-of-care” (Barrington et al. 2016; Cheson et al. 2014; Ansell 2014).

Se futuri studi confermassero che l’incremento dell’LV-SUV durante i trattamenti con ANT sia in grado di predire la cardiotossicità con una precocità almeno comparabile alla troponina e al GLS, la valutazione FDG-PET cardiaca potrebbe entrare rapidamente nella pratica clinica per l’identificazione dei pazienti a rischio di cardiotossicità.

LIMITAZIONI DELLO STUDIO

Un importante limitazione dello studio deriva dall’effetto del regime dietetico (lipidico vs glucidico) nei giorni precedenti la PET, che può aver significativamente influenzato la captazione cardiaca nonostante il digiuno prima dell’esame (Choi et al. 1993; Inglese et al. 2007). Lo studio del modello murino ha potuto ovviare a tale effetto sulla captazione PET, controllando la dieta degli animali da esperimento, come dimostrato dalla ridotta variabilità del risultato. Nella corte retrospettiva di pazienti con LH, invece, la dieta ha probabilmente avuto un ruolo non trascurabile nel determinare l’ampia variabilità della misura, non essendo stato possibile controllare il regime dietetico nei giorni precedenti l’esame. Tale maggior variabilità potrebbe addirittura aver ridotto la potenza dello studio nel rilevare l’associazione tra LV-SUV e le alterazioni cardiache. Inoltre

non si può escludere che il regime dietetico abbia influito sulla captazione LV-SUV^{STAGING}, un fattore che potrebbe essere predisponente alla cardi tossicità. Tale limitazione potrà essere superata solo con uno studio prospettico prevedendo un regime alimentare controllato con elevato rapporto grassi/carboidrati (Harisankar et al. 2011), oppure una preparazione farmacologica (Arumugam et al. 2016), per standardizzare la captazione di glucosio miocardica basale.

Nel presente lavoro l'animale da esperimento non è stato analizzato per lo sviluppo di cardi tossicità. Pertanto tale esperimento non fornisce informazioni su una correlazione tra le modificazioni metaboliche miocardiche rilevate alla microPET dinamica e l'eventuale comparsa di disfunzione miocardica. Tuttavia dosi di ANT utilizzate in questo esperimento hanno causato alterazioni elettrocardiografiche e disfunzione contrattile in uno studio precedentemente pubblicato (Fisher Patrick W. et al. 2005). Inoltre tutti i topi hanno mostrato alterazione della captazione di FDG e tale variazione era dose-dipendente rispetto ad ANT.

Anche nello studio sui pazienti la mancanza di un follow-up lungo non offre la possibilità di conferma di una cardi tossicità tardiva conclamata, che nei pazienti a basso rischio si verifica abitualmente anche molti anni dopo l'esposizione ad ANT (Groarke e Nohria 2015). Solo pochi pazienti hanno mostrato un calo della LVEF al di sotto del valore di normalità, e nessuno ha avuto scompenso cardiaco conclamato nel follow-up. Cionondimeno, nella corte studiata i pazienti erano prevalentemente giovani, senza cardiopatia, come prevedibile dall'epidemiologia del LH, e venivano esposti a dosi cumulative <350 mg/mq. Un valore ridotto di LVEF in tale corte, seppur silente e modesto, deve essere considerato biologicamente rilevante. Non dovrebbe infatti verificarsi in questi pazienti ritenuti a rischio molto basso di cardi tossicità, tanto che nella pratica clinica non vengono monitorati di routine dal punto di vista cardiologico.

La natura parzialmente retrospettiva dello studio, come discusso nei metodi, ha richiesto di confrontarsi con una realtà clinica di diversi laboratori di ecocardiografia, in cui la stima dell'LVEF è ancora prevalentemente visuale e introduce un notevole appiattimento dei valori nella norma, indotta dal concetto clinico dicotomico di "normalità" e "anormalità". Ciò non avrebbe permesso di valutare le piccole differenze, vicine all'intervallo di normalità, che si

possono attendere in una corte di pazienti a basso rischio, come quella dello studio. LVEF è stata pertanto valutata secondo formula di Teicholz, che si basa su assunti geometrici. L'ecocardiografia bi- e tridimensionale hanno soppiantato tale metodica e attualmente le raccomandazioni prevedono l'uso della metodica di Simpson biplana o ancor meglio dell'acquisizione volumetrica tridimensionale "single-beat"(Lang et al. 2006; Plana et al. 2014). Il limite più significativo di una valutazione lineare come la Teicholz sarebbe da considerare in presenza di alterazioni regionali della cinetica, che potrebbero essere catturate in maniera variabile. Nei nostri pazienti a basso rischio e senza cardiopatia, con scarsa probabilità di sviluppare asimmetrie regionali marcate, tale problema è verosimilmente trascurabile, come dimostrato da precedente letteratura(Hequet et al. 2004).

Infine, bisogna riconoscere che la valutazione del parametro LV-SUV deve ancora essere standardizzata. Nel nostro studio il valore di cut-off è stato arbitrario e non è verosimilmente riproducibile in diversi centri di medicina nucleare, per considerazioni inerenti la natura stessa dell'esame FDG-PET(Keyes 1995). Inoltre la stima di LV-SUV effettuata nel nostro laboratorio ha considerato la media della captazione nel volume di interesse, mentre non ha esplorato la regionalità della distribuzione nelle diverse regioni miocardiche che è stata descritta in altri studi(Harisankar et al. 2011; Gropler et al. 1990). Per una applicazione clinica bisognerà prevedere una metodologia specifica ancora da definire; il gruppo del nostro istituto si sta orientando verso una valutazione semi-quantitativa recentemente proposta in letteratura(Bauckneht et al. 2017), per limitare la variabilità intra- e inter-operatore.

RIFERIMENTI DELLE PUBBLICAZIONI

Bauckneht, Matteo, Giulia Ferrarazzo, Francesco Fiz, Silvia Morbelli, Matteo Sarocchi, Fabio Pastorino, Alberto Ghidella, et al. 2017. «Doxorubicin Effect on Myocardial Metabolism as a Pre-Requisite for Subsequent Development of Cardiac Toxicity: A Translational 18 F-FDG PET/CT Observation». *Journal of Nuclear Medicine*, giugno, jnumed.117.191122. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.191122>.

Sarocchi, Matteo, Matteo Bauckneht, Eleonora Arboscello, Selene Capitanio, Cecilia Marini, Silvia Morbelli, Maurizio Miglino, et al. 2018. «An Increase in Myocardial 18-Fluorodeoxyglucose Uptake Is Associated with Left Ventricular Ejection Fraction Decline in Hodgkin Lymphoma Patients Treated with Anthracycline». *Journal of Translational Medicine* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1670-9>.

BIBLIOGRAFIA

- Aleman, Berthe M.P., Alexandra W. van den Belt-Dusebout, Willem J. Klokman, Mars B. van't Veer, Harry Bartelink, e Flora E. van Leeuwen. 2003. «Long-Term Cause-Specific Mortality of Patients Treated for Hodgkin's Disease». *Journal of Clinical Oncology* 21 (18): 3431–39. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.07.131>.
- Ansell, Stephen M. 2014. «Hodgkin lymphoma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management». *American journal of hematology* 89 (7): 771–779.
- Arumugam, Somasundaram, Remya Sreedhar, Rajarajan A. Thandavarayan, Vengadeshprabhu Karuppagounder, e Kenichi Watanabe. 2016. «Targeting fatty acid metabolism in heart failure: is it a suitable therapeutic approach?» *Drug Discovery Today* 21 (6): 1003–8. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.010>.
- Barrington, Sally F., Amy A. Kirkwood, Antonella Franceschetto, Michael J. Fulham, Thomas H. Roberts, Helen Almquist, Eva Brun, et al. 2016. «PET-CT for Staging and Early Response: Results from the Response-Adapted Therapy in Advanced Hodgkin Lymphoma Study.» *Blood* 127 (12): 1531–38. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679407>.
- Bauckneht, Matteo, Silvia Morbelli, Francesco Fiz, Giulia Ferrarazzo, Roberta Piva, Alberto Nieri, Matteo Sarocchi, et al. 2017. «A Score-Based Approach to 18F-FDG PET Images as a Tool to Describe Metabolic Predictors of Myocardial Doxorubicin Susceptibility». *Diagnostics* 7 (4): 57. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7040057>.
- Berthiaume, Jessica M., e Kendall B. Wallace. 2007. «Persistent Alterations to the Gene Expression Profile of the Heart Subsequent to Chronic Doxorubicin Treatment». *Cardiovascular Toxicology* 7 (3): 178–91. <https://doi.org/10.1007/s12012-007-0026-0>.
- Bhakta, Nickhill, Qi Liu, Frederick Yeo, Malek Baassiri, Matthew J. Ehrhardt, Deo K. Srivastava, Monika L. Metzger, et al. 2016. «Cumulative burden of cardiovascular morbidity in paediatric, adolescent, and young adult survivors of Hodgkin's lymphoma: an analysis from the St Jude Lifetime Cohort Study». *The Lancet Oncology* 17 (9): 1325–1334.
- Borde, Chaitanya, Purushottam Kand, e Sandip Basu. 2012. «Enhanced myocardial fluorodeoxyglucose uptake following Adriamycin-based therapy: Evidence of early chemotherapeutic cardiotoxicity?» *World Journal of Radiology* 4 (5): 220–23. <https://doi.org/10.4329/wjr.v4.i5.220>.
- Bosch, Xavier, Montserrat Rovira, Marta Sitges, Ariadna Domènech, José T. Ortiz-Pérez, Teresa M. de Caralt, Manuel Morales-Ruiz, Rosario J. Perea, Mariano Monzó, e Jordi Esteve. 2013. «Enalapril and Carvedilol for Preventing Chemotherapy-Induced Left Ventricular Systolic Dysfunction in Patients With Malignant Hemopathies». *Journal of the American College of Cardiology* 61 (23): 2355–62. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.02.072>.
- Cardinale, D., A. Colombo, G. Bacchiani, I. Tedeschi, C. A. Meroni, F. Veglia, M. Civelli, et al. 2015. «Early Detection of Anthracycline Cardiotoxicity and Improvement With Heart Failure Therapy». *Circulation* 131 (22): 1981–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013777>.
- Cardinale, D., A. Colombo, M. T. Sandri, G. Lamantia, N. Colombo, M. Civelli, G. Martinelli, F. Veglia, C. Fiorentini, e C. M. Cipolla. 2006. «Prevention of High-Dose Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity in High-Risk Patients by Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition». *Circulation* 114 (23): 2474–81. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.635144>.
- Cardinale, Daniela, Alessandro Colombo, Giuseppina Lamantia, Nicola Colombo, Maurizio Civelli, Gaia De Giacomi, Mara Rubino, Fabrizio Veglia, Cesare Fiorentini, e Carlo M. Cipolla. 2010. «Anthracycline-Induced Cardiomyopathy». *Journal of the American College of Cardiology* 55 (3): 213–20. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.03.095>.

- Carvalho, Rui A., Rui P. B. Sousa, Virgilio J. J. Cadete, Gary D. Lopaschuk, Carlos M. M. Palmeira, James A. Bjork, e Kendall B. Wallace. 2010. «Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy». *Toxicology* 270 (2): 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.01.019>.
- Cheson, Bruce D., Richard I. Fisher, Sally F. Barrington, Franco Cavalli, Lawrence H. Schwartz, Emanuele Zucca, e T. Andrew Lister. 2014. «Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification». *Journal of Clinical Oncology* 32 (27): 3059–67. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.8800>.
- Choi, Yong, Richard C Brunken, Randall A Hawkins, Sung-Cheng Huang, Denis B Buxton, Carl K Hoh, Michael E Phelps, e Heinrich R Schelbert. 1993. «Factors Affecting Myocardial 2-[F-18]Fluoro-2-Deoxy-o-Glucose Uptake in Positron Emission Tomography Studies of Normal Humans» 20 (4): 11.
- Cossu, Irene, Gianluca Bottoni, Monica Loi, Laura Emionite, Alice Bartolini, Daniela Di Paolo, Chiara Brignole, et al. 2015. «Neuroblastoma-Targeted Nanocarriers Improve Drug Delivery and Penetration, Delay Tumor Growth and Abrogate Metastatic Diffusion». *Biomaterials* 68 (novembre): 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.054>.
- Dell'olio, Matteo, Rosario Potito scalzulli, Grazia Sanpaolo, Michele Nobile, Francesco Saverio mantuano, Antonio La sala, Giovanni D'arena, et al. 2011. «Non-Pegylated Liposomal Doxorubicin (Myocet®) in Patients with Poor-Risk Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma». *Leukemia & Lymphoma* 52 (7): 1222–29. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.572321>.
- Fisher Patrick W., Salloum Fadi, Das Anindita, Hyder Haroon, e Kukreja Rakesh C. 2005. «Phosphodiesterase-5 Inhibition With Sildenafil Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis and Left Ventricular Dysfunction in a Chronic Model of Doxorubicin Cardiotoxicity». *Circulation* 111 (13): 1601–10. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160359.49478.C2>.
- Gilliam, Laura A.A., Kelsey H. Fisher-Wellman, Chien-Te Lin, Jill M. Maples, Brook L. Cathey, e P. Darrell Neuffer. 2013. «The Anticancer Agent Doxorubicin Disrupts Mitochondrial Energy Metabolism and Redox Balance in Skeletal Muscle». *Free Radical Biology and Medicine* 65 (dicembre): 988–96. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.191>.
- Gorla, Arun Kumar Reddy, Ashwani Sood, Gaurav Prakash, Madan Parmar, e Bhagwant Rai Mittal. 2016. «Substantial Increase in Myocardial FDG Uptake on Interim PET/CT May Be an Early Sign of Adriamycin-Induced Cardiotoxicity». *Clinical Nuclear Medicine* 41 (6): 462. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000001194>.
- Groarke, John D., e Anju Nohria. 2015. «Anthracycline Cardiotoxicity: A New Paradigm for an Old Classic». *Circulation* 131 (22): 1946–49. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016704>.
- Gropler, Robert J., Barry A. Siegel, Kenneth J. Lee, Stephen M. Moerlein, David J. Perry, Steven R. Bergmann, e Edward M. Geltman. 1990. «Nonuniformity in Myocardial Accumulation of Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose in Normal Fasted Humans». *Journal of Nuclear Medicine* 31 (11): 1749–56.
- Harake, Danielle, Vivian I Franco, Jacqueline M Henkel, Tracie L Miller, e Steven E Lipshultz. 2012. «Cardiotoxicity in Childhood Cancer Survivors: Strategies for Prevention and Management». *Future Cardiology* 8 (4): 647–70. <https://doi.org/10.2217/fca.12.44>.
- Harisankar, Chidambaram Natrajan Balasubramanian, Bhagwant Rai Mittal, Kanhaiya Lal Agrawal, Mohammed Labeeb Abrar, e Anish Bhattacharya. 2011. «Utility of High Fat and Low Carbohydrate Diet in Suppressing Myocardial FDG Uptake». *Journal of Nuclear Cardiology* 18 (5): 926. <https://doi.org/10.1007/s12350-011-9422-8>.
- Hequet, O., Q.H. Le, I. Moullet, E. Pauli, G. Salles, D. Espinouse, C. Dumontet, et al. 2004. «Subclinical Late Cardiomyopathy After Doxorubicin Therapy for Lymphoma in Adults». *Journal of Clinical Oncology* 22 (10): 1864–71. <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.06.033>.
- Hrelia, Silvana, Diana Fiorentini, Tullia Maraldi, Cristina Angeloni, Alessandra Bordoni, Pier Luigi Biagi, e Gabriele Hakim. 2002. «Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in

- glucose transport in cultured cardiomyocytes». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1567 (dicembre): 150–56. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00612-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00612-0).
- Inglese, Eugenio, Lucia Leva, Roberta Matheoud, Gianmauro Sacchetti, Chiara Secco, Patrizia Gandolfo, Marco Brambilla, e Gianmario Sambuceti. 2007. «Spatial and Temporal Heterogeneity of Regional Myocardial Uptake in Patients Without Heart Disease Under Fasting Conditions on Repeated Whole-Body 18F-FDG PET/CT». *Journal of Nuclear Medicine* 48 (10): 1662–69. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.041574>.
- Keyes, John W. 1995. «SUV: Standard Uptake or Silly Useless Value?» *Journal of Nuclear Medicine* 36 (10): 1836–39.
- Kim, Jahae, Ki Seong Park, Geum-Cheol Jeong, Sang-Geon Cho, Sae-Ryung Kang, Keun Sam Jang, Seong Young Kwon, Jung-Joon Min, Ho-Chun Song, e Hee-Seung Bom. 2014. «Routine Oncologic FDG PET/CT May Be Useful for Evaluation of Cancer Therapy-Induced Cardiotoxicity». *Journal of Nuclear Medicine* 55 (supplement 1): 1549–1549.
- Lancellotti, Patrizio, Thomas M Suter, Teresa López-Fernández, Maurizio Galderisi, Alexander R Lyon, Peter Van der Meer, Alain Cohen Solal, et al. 2018. «Cardio-Oncology Services: Rationale, Organization, and Implementation». *European Heart Journal*, agosto. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy453>.
- Lang, R, M Bierig, R Devereux, F Flachskampf, E Foster, P Pellikka, M Picard, M Roman, J Seward, e J Shanewise. 2006. «Recommendations for Chamber Quantification☆». *European Journal of Echocardiography* 7 (2): 79–108. <https://doi.org/10.1016/j.euje.2005.12.014>.
- Lebrecht Dirk, Setzer Bernhard, Ketelsen Uwe-Peter, Haberstroh Jörg, e Walker Ulrich A. 2003. «Time-Dependent and Tissue-Specific Accumulation of mtDNA and Respiratory Chain Defects in Chronic Doxorubicin Cardiomyopathy». *Circulation* 108 (19): 2423–29. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093196.59829.DF>.
- Li, Mingchuan, Valentina Sala, Maria Chiara De Santis, James Cimino, Paola Cappello, Nicola Pianca, Anna Di Bona, et al. 2018. «Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects from Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth». *Circulation*, gennaio, CIRCULATIONAHA.117.030352. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030352>.
- Lyu, Y. L., J. E. Kerrigan, C.-P. Lin, A. M. Azarova, Y.-C. Tsai, Y. Ban, e L. F. Liu. 2007. «Topoisomerase II Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane». *Cancer Research* 67 (18): 8839–46. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1649>.
- Marini, Cecilia, Silvia Ravera, Ambra Buschiazzo, Giovanna Bianchi, Anna Maria Orengo, Silvia Bruno, Gianluca Bottoni, et al. 2016. «Discovery of a Novel Glucose Metabolism in Cancer: The Role of Endoplasmic Reticulum beyond Glycolysis and Pentose Phosphate Shunt». *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep25092>.
- Mercurio, Valentina, Flora Pirozzi, Edoardo Lazzarini, Giancarlo Marone, Paola Rizzo, Giulio Agnetti, Carlo G. Tocchetti, Alessandra Ghigo, e Pietro Ameri. 2016. «Models of Heart Failure Based on the Cardiotoxicity of Anticancer Drugs». *Journal of Cardiac Failure* 22 (6): 449–58. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2016.04.008>.
- Montemurro, F., V. Rossi, F. Nole, S. Redana, M. Donadio, R. Martinello, E. Verri, et al. 2010. «Underuse of Anthracyclines in Women with HER-2+ Advanced Breast Cancer». *The Oncologist* 15 (7): 665–72. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0016>.
- Mousavi, N., T. C. Tan, M. Ali, E. F. Halpern, L. Wang, e M. Scherrer-Crosbie. 2015. «Echocardiographic Parameters of Left Ventricular Size and Function as Predictors of Symptomatic Heart Failure in Patients with a Left Ventricular Ejection Fraction of 50-59% Treated with Anthracyclines». *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*, aprile. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jev113>.

- National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. The National Academies Collection: Reports Funded by National Institutes of Health. Washington (DC): National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>.
- Neubauer, Stefan. 2007. «The Failing Heart — An Engine Out of Fuel». *New England Journal of Medicine* 356 (11): 1140–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra063052>.
- Nimwegen, Frederika A. van, Michael Schaapveld, Cécile P. M. Janus, Augustinus D. G. Krol, Eefke J. Petersen, John M. M. Raemaekers, Wouter E. M. Kok, Berthe M. P. Aleman, e Flora E. van Leeuwen. 2015. «Cardiovascular Disease after Hodgkin Lymphoma Treatment: 40-Year Disease Risk». *JAMA Internal Medicine* 175 (6): 1007–17. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.1180>.
- Okwuosa, Tochi M., e Ana Barac. 2015. «Burgeoning Cardio-Oncology Programs». *Journal of the American College of Cardiology* 66 (10): 1193–97. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.07.033>.
- Olivieri, Jacopo, Gian Piero Perna, Caterina Bocci, Claudia Montevercchi, Attilio Olivieri, Pietro Leoni, e Guido Gini. 2017. «Modern Management of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Lymphoma Patients: Low Occurrence of Cardiotoxicity with Comprehensive Assessment and Tailored Substitution by Nonpegylated Liposomal Doxorubicin.» *The Oncologist* 22 (4): 422–31. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0289>.
- Plana, Juan Carlos, Maurizio Galderisi, Ana Barac, Michael S. Ewer, Bonnie Ky, Marielle Scherrer-Crosbie, Javier Ganame, et al. 2014. «Expert Consensus for Multimodality Imaging Evaluation of Adult Patients during and after Cancer Therapy: A Report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging». *Journal of the American Society of Echocardiography* 27 (9): 911–39. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2014.07.012>.
- Rohlfing, Sarah, Matthias Aurich, Tilman Schöning, Anthony D. Ho, e Mathias Witzens-Harig. 2015. «Nonpegylated Liposomal Doxorubicin as a Component of R-CHOP Is an Effective and Safe Alternative to Conventional Doxorubicin in the Treatment of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Preexisting Cardiac Diseases». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 15 (8): 458–63. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.03.008>.
- Romond, Edward H., Jong-Hyeon Jeong, Priya Rastogi, Sandra M. Swain, Charles E. Geyer, Michael S. Ewer, Vikas Rathi, et al. 2012. «Seven-Year Follow-Up Assessment of Cardiac Function in NSABP B-31, a Randomized Trial Comparing Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel (ACP) With ACP Plus Trastuzumab As Adjuvant Therapy for Patients With Node-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Positive Breast Cancer». *Journal of Clinical Oncology* 30 (31): 3792–99. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.0010>.
- Sokoloff, L., M. Reivich, C. Kennedy, M. H. Des Rosiers, C. S. Patlak, K. D. Pettigrew, O. Sakurada, e M. Shinohara. 1977. «The [14c]Deoxyglucose Method for the Measurement of Local Cerebral Glucose Utilization: Theory, Procedure, and Normal Values in the Conscious and Anesthetized Albino Rat1». *Journal of Neurochemistry* 28 (5): 897–916. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1977.tb10649.x>.
- Spallarossa, Paolo, Paola Altieri, Concetta Aloi, Silvano Garibaldi, Chiara Barisione, Giorgio Ghigliotti, Giuseppina Fugazza, Antonio Barsotti, e Claudio Brunelli. 2009. «Doxorubicin Induces Senescence or Apoptosis in Rat Neonatal Cardiomyocytes by Regulating the Expression Levels of the Telomere Binding Factors 1 and 2». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 297 (6): H2169–81. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00068.2009>.
- Spallarossa, Paolo, Marco Guerrini, Eleonora Arboscello, e Vera Sicbaldi. 2013. «Enalapril and Carvedilol for Preventing Chemotherapy-Induced Left Ventricular Systolic Dysfunction.» *Journal of the American College of Cardiology* 62 (25): 2451–52. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.07.077>.
- Spallarossa, Paolo, Nicola Maurea, Christian Cadeddu, Rosalinda Madonna, Donato Mele, Ines Monte, Giuseppina Novo, et al. 2016. «A Recommended Practical Approach to the Management of

- Anthracycline-Based Chemotherapy Cardiotoxicity: An Opinion Paper of the Working Group on Drug Cardiotoxicity and Cardioprotection, Italian Society of Cardiology.» *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.)* 17 Suppl 1 (maggio): S84-92. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000381>.
- Suter, T. M., e M. S. Ewer. 2013. «Cancer Drugs and the Heart: Importance and Management». *European Heart Journal* 34 (15): 1102–11. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs181>.
- Tocchetti, Carlo Gabriele, Christian Cadeddu, Daniela Di Lisi, Saveria Femminò, Rosalinda Madonna, Donato Mele, Ines Monte, et al. 2017. «From Molecular Mechanisms to Clinical Management of Antineoplastic Drug-Induced Cardiovascular Toxicity: A Translational Overview». *Antioxidants & Redox Signaling*, maggio. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6930>.
- Tokarska-Schlattner, Malgorzata, Theo Wallimann, e Uwe Schlattner. 2006. «Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin». *Comptes Rendus Biologies* 329 (9): 657–68. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2005.08.007>.
- Tokarska-Schlattner, Malgorzata, Michael Zaugg, Rafaela da Silva, Eliana Lucchinetti, Marcus C. Schaub, Theo Wallimann, e Uwe Schlattner. 2005. «Acute Toxicity of Doxorubicin on Isolated Perfused Heart: Response of Kinases Regulating Energy Supply». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 289 (1): H37–47. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01057.2004>.
- Varricchi, Gilda, Pietro Ameri, Christian Cadeddu, Alessandra Ghigo, Rosalinda Madonna, Giancarlo Marone, Valentina Mercurio, et al. 2018. «Antineoplastic Drug-Induced Cardiotoxicity: A Redox Perspective». *Frontiers in Physiology* 9 (marzo). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00167>.
- Wakasugi, Shigetoshi, Alan J. Fischman, John W. Babich, Ronald J. Callahan, David R. Elmaleh, Robert Wilkinson, e H. William Strauss. 1993. «Myocardial Substrate Utilization and Left Ventricular Function in Adriamycin Cardiomyopathy». *Journal of Nuclear Medicine* 34 (9): 1529–35.
- Zamorano, Jose Luis, Patrizio Lancellotti, Daniel Rodriguez Muñoz, Victor Aboyans, Riccardo Asteggiano, Maurizio Galderisi, Gilbert Habib, et al. 2016. «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)». *European Heart Journal* 37 (36): 2768–2801. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw211>.
- Zhang, Sui, Xiaobing Liu, Tasneem Bawa-Khalfe, Long-Sheng Lu, Yi Lisa Lyu, Leroy F Liu, e Edward T H Yeh. 2012. «Identification of the Molecular Basis of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity». *Nature Medicine* 18 (11): 1639–42. <https://doi.org/10.1038/nm.2919>.