



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Efecto de antioxidantes de origen natural sobre el daño cardiaco

Autor

Pablo Jurado Casado

Tutoras

María Luisa Nieto Callejo

Marita Hernández Garrido



Universidad de Valladolid

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La enfermedad. El Cáncer	1
1.2. El tratamiento. Doxorubicina	3
1.3. El efecto. Cardiotoxicidad	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 Materiales	8
2.1.1 Anticuerpos	8
2.1.2 Reactivos	8
2.1.3 Estímulos	9
2.1.4. Compuestos bioactivos	9
2.2. Métodos	9
2.2.1. Estudio <i>in vitro</i> : Modelo celular	9
2.2.2. Estudio de muerte celular por apoptosis mediante ensayo de unión de Anexina-V	9
2.2.3. Análisis de proteína. Western Blot	10
2.2.4. Ensayo de inmunofluorescencia	11
2.2.5. Análisis estadístico	11
3. RESULTADOS	12
3.1. Efecto de la DOXO sobre cardiomioblastos H9c2.	12
3.1.1. Apoptosis	12
3.1.2. Análisis de respuesta antioxidante: Expresión de la proteína HO-1	18
3.1.3. Análisis del Estrés de retículo	19
3.2. Efecto de la DOXO, Uvaol sobre la estructura del citoesqueleto	22
4. DISCUSIÓN	23
5. CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26

Abreviaturas

BSA	Albúmina de suero bovino, del inglés "Bovine Serum Albumin"
CAS-3	Caspasa 3
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco, del inglés "Dulbecco's Modified Eagle Media"
DNA	Ácido desoxirribonucleico, del inglés "DesoxirriboNucleic Acid"
DNAMt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DOXO	Doxorrubicina
DTT	Ditiotreitol
ECL	Quimioluminiscencia mejorada, del inglés "enhanced chemiluminescence"
ER	Estrés de Retículo
FBS	Suero bovino fetal, del inglés "Fetal Bovine Serum"
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína, del inglés "Fluorecein Isotiocyanate"
GRP78	Glucose-regulated protein 78
GRP94	Glucose-regulated protein 94
h	horas
HO-1	Hemo-oxigenasa 1, del inglés "Heme-oxygenase"
HRP	Peroxidasa de rábano, del inglés "Hoseradish Peroxidase"
LPS	Lipopolisacárido
MCP	Pectina Cítrica Modificada del inglés "Modified Citrus Pectin"
Min	Minutos
PBA	Ácido 4-fenilbutírico, del inglés "4-Phenylbutyric acid"
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés "Phosphate Buffered Saline"
PVDF	Polivinilideno difluoruro
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés "riboNucleic Acid"
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés "Reactive Oxygen Species"
SEM	Error estándar de la media, del inglés Standard Error of the Mean
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sodico, del inglés "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis"
TBS	Solución tamponada Tris-salino, del inglés "Tris-Buffered Saline"
TTBS	TBS-Tween-20
TUNI	Tunicamicina

u.a	Unidades arbitrarias
Uv	Uvaol
UPR	Respuesta a las proteínas no plegadas, del inglés "Unfolded Protein Response"
W-B	Western Blot
μM	MicroMolar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La enfermedad. El Cáncer

Aunque coloquialmente se habla del cáncer como una única enfermedad, la realidad es que el término cáncer hace referencia a un conjunto de más de 200 enfermedades con causas y consecuencias muy diferentes. Sin embargo, todas ellas comparten un denominador común, células que logran la capacidad de multiplicarse de manera descontrolada, y en determinadas ocasiones, de diseminarse a otras partes del organismo, lo que se conoce como metástasis.

La transformación de células normales a células cancerígenas, la tumorigénesis, requiere de la superación por parte de la célula de varios puntos de control, las características que adquiere una célula tumoral (Figura 1) son: Autosuficiencia de las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), angiogénesis sostenida y capacidad para invadir tejidos ajenos (1)

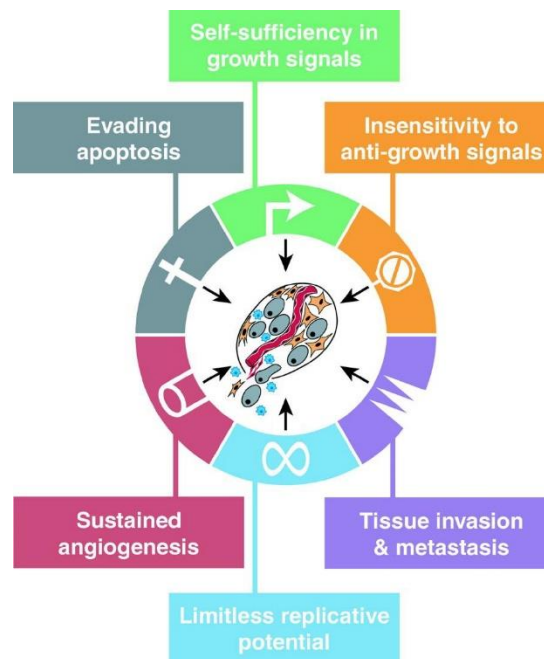


Figura 1. Capacidades adquiridas de una célula cancerígena.(1)

Raramente se encuentran signos de tumores malignos en la antigüedad, y aunque una de las causas puede ser el uso de técnicas inadecuados para el diagnóstico, se cree que el cáncer es una enfermedad de la era moderna, esto, podría estar relacionado con el estilo de vida actual y la presencia de carcinógenos propias de las sociedades modernas(2), ya que se estima que únicamente entre el 5-10%, las personas tienen una predisposición genética al desarrollo de tumores, en estas personas, debido a la alteración de algún oncogén, la probabilidad de padecer cáncer aumenta y es común que la enfermedad aparezca antes a cuando no se tiene esta predisposición.(3)

El cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo, sólo por detrás de la cardiopatía isquémica(4), con casi 10 millones de fallecimientos en 2020 (5). Además, es la primera o segunda causa de muerte prematura (en edades comprendidas entre 30 y 69 años) en 134 de 183 países de los que se tienen datos. En 2018, 18.1 millones de personas en el mundo tenían cáncer, de las cuales, 9,6 millones murieron a causa de la enfermedad. Se estima, que para 2040, estas cifras crecerán hasta casi duplicarse, y lo hará en mayor medida, en los países con bajos y medios ingresos.

El cáncer que con más frecuencia se diagnostica es el cáncer de pulmón (11,6% de todos los casos), seguido por el de mama (11,6%) y el cáncer colorrectal (6). (Figura 2)

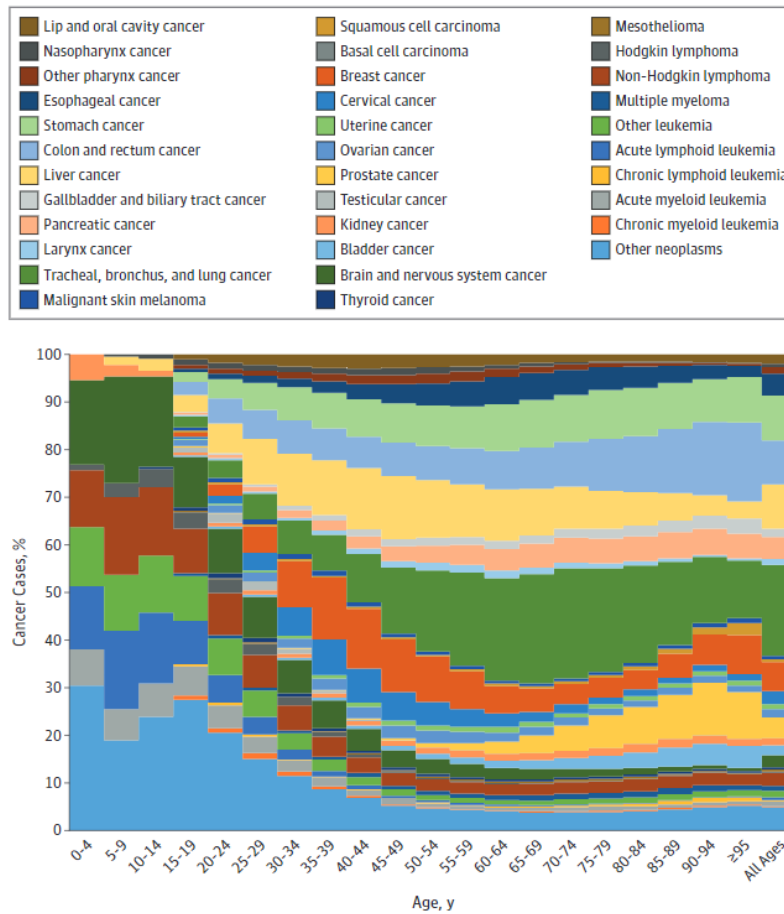


Figura 2. Contribuciones globales específicas por edad de los tipos de cáncer a la incidencia total del cáncer, ambos sexos, 2016(7).

En España, el cáncer fue la primera causa de muerte para los hombres y la segunda causa de muerte para las mujeres.(8)

1.2. El tratamiento. Doxorubicina

Todos estos datos han dado lugar a compromisos políticos mundiales reflejados en los Objetivos de Desarrollo Sostenible(9), así como en el Plan de Acción Mundial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre Enfermedades No Transmisibles (10).

Al principio, los tratamientos contra el cáncer estaban basados en atacar las células neoplásicas, pero tras ver que un tumor es mucho más complejo que únicamente un grupo de células en proliferación descontrolada, surgieron otras terapias dirigidas contra el microambiente tumoral, las células no cancerosas, moléculas y vasos sanguíneos. (11)

Actualmente, los diferentes tratamientos frente al cáncer se basan en la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia, la terapia hormonal y la terapia dirigida.(12)

La modalidad terapéutica en la que nos centraremos es la quimioterapia, se basa en el uso de drogas que matan las células cancerosas, interfiriendo en el crecimiento tumoral. Aunque la quimioterapia, generalmente, es un método eficaz de tratamiento frente al cáncer, puede causar severos efectos secundarios, ya que estos fármacos suelen llegar a la gran parte de los tejidos, no discriminando entre tejidos tumorales y tejidos sanos. Estos efectos secundarios dependen del tipo de fármaco utilizado, del tipo y localización del cáncer y de otros factores que pueden hacer variar la respuesta del individuo al tratamiento.(13)

Hay multitud de fármacos utilizados como quimioterapéuticos.(14)

- **Agentes alquilantes**

Dañan el DNA de las células, impidiendo que la célula se reproduzca, actúan en todas las fases del ciclo celular. Algunos de los tipos de cáncer para los que se utilizan son, de pulmón, de mama, ovario, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple o sarcoma. Aunque es raro, pueden dañar células de la médula, aumentando el riesgo de padecer leucemia.

Algunos ejemplos de agentes alquilantes son: Cisplatino, oxaliplatino, temozolomida, etc.

- **Nitrosoureas**

También son agentes alquilantes, pero tienen la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica, siendo útiles para tratar ciertos tumores cerebrales.

Algunos ejemplos de nitrosoureas son: Carmustina, lomustina, estreptozocina.

- **Antimetabolitos**

Actúan como sustituyentes de los componentes normales del RNA y DNA, impidiendo la replicación de la célula, se suelen utilizar para combatir leucemias, cánceres de mama, ovario, etc.

Algunos ejemplos son: Azacitidina, floxuridina, pentostatina, etc.

- **Antibióticos antitumorales**

Se consideran específicos al ciclo celular. Uno de los tipos de antibióticos antitumorales son las antraciclina, las cuales, interfieren con enzimas partícipes en la replicación del DNA, uniéndose a este para impedir la replicación. Se utilizan para una gran variedad de cánceres.

Uno de los problemas en la administración de este tipo de fármacos es que pueden generar daño cardíaco. La doxorubicina es un ejemplo de antraciclina.

La doxorubicina, junto con la daunorrubicina, la aclarrubicina y la carminamicina, es de los agentes antitumorales más utilizados clínicamente, son obtenidos a partir de cultivos de *Streptomyces* (15).

Hay varias propuestas para el mecanismo de acción por el que la doxorubicina induce la muerte celular. Una de las hipótesis que se ha planteado es que la doxorubicina actúa como inhibidor de la topoisomerasa II, impidiendo el desenrollamiento de la hebra de DNA, provocando la muerte celular(16). Otro mecanismo de daño, independiente de la topoisomerasa II, en el que la DOXO actúa intercalándose entre las hebras del DNA, en zonas ricas en pares de bases GC. (17)

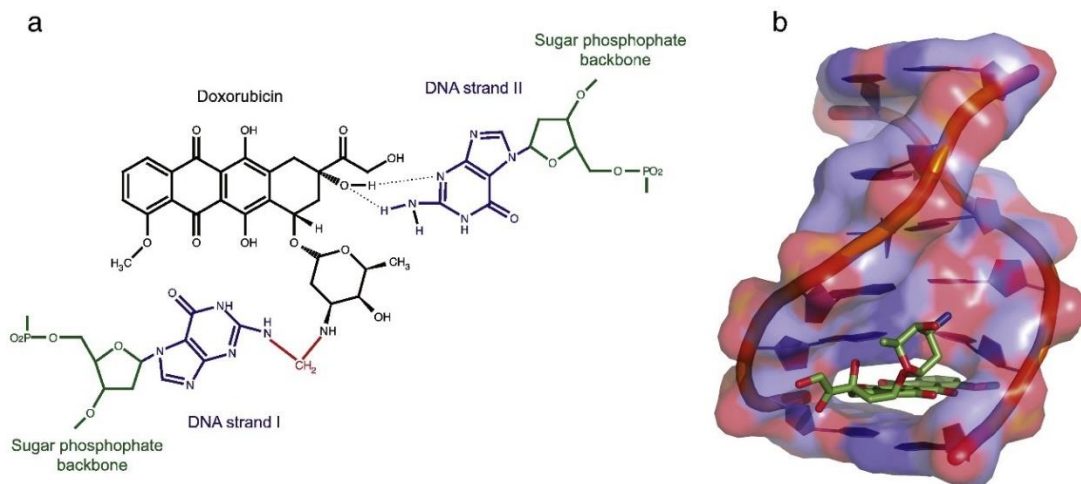


Figura 3. Formación de enlaces de hidrógeno entre la doxorubicina y la pentosa de la Guanina (18)

La interacción entre la doxorubicina y el DNA puede estabilizarse mediante enlace covalente mediado por el formaldehído celular generado en las reacciones de ROS a partir de fuentes de carbono como los lípidos. (19)

Otra opción, es causar estrés oxidativo, lo que provoca daños en el DNA y la muerte celular(20), la doxorubicina es oxidada a un radical semiquinona a través de la NAD(P)H oxidorreductasas. (21).

Otros estudios evidencian que el tratamiento con DOXO aumenta los niveles de ceramida (22) (23), una molécula lipídica constituida por un ácido graso y una esfingosina, la ceramida está involucrada en múltiples procesos celulares, como la apoptosis, la senescencia o inhibición de la replicación celular.(24)

1.3. El efecto. Cardiotoxicidad

La DOXO es un agente antitumoral con una alta eficacia para una gran variedad de cánceres, pero provoca efectos citotóxicos debido al ataque a tejidos no diana. En la literatura encontramos efectos citotóxicos de la DOXO en el corazón, músculo esquelético, hígado, riñones y cerebro (25) (26). La DOXO no cruza la barrera hematoencefálica, por lo que sus efectos sobre el cerebro deben ser provocados de manera indirecta, provocando un aumento de citoquinas inflamatorias circulantes capaz de estimular a las células microgliales, provocando una cascada de citoquinas proinflamatorias.(25)

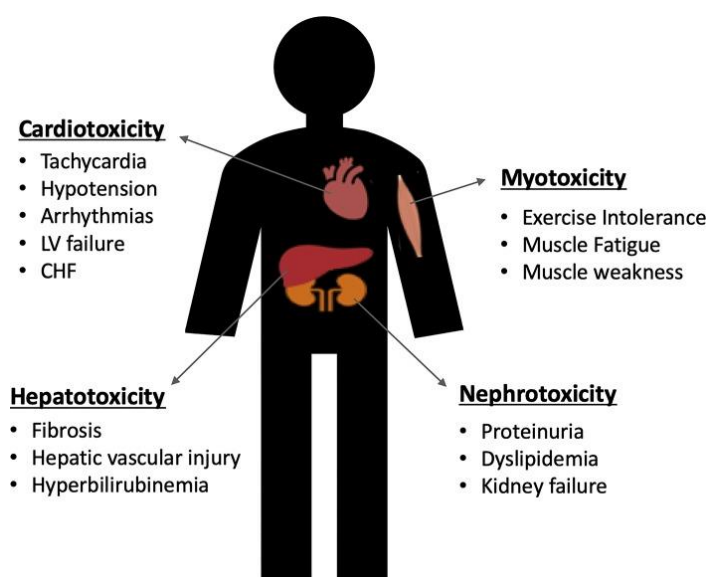


Figura 4: Posibles efectos secundarios de la quimioterapia con doxorubicina en el corazón, el músculo esquelético, el hígado y los riñones.(27)

La citotoxicidad que más atención ha recabado en la literatura, y en la que más esfuerzos se emplean para contrarrestarla es la que la DOXO somete al corazón. Hay diferentes mecanismos implicados en la cardiotoxicidad inducida por la DOXO. El mayor efecto nocivo de la DOXO es causado por el estrés oxidativo, un desequilibrio entre ROS y enzimas antioxidantes protectoras frente a ese estrés (28).

Los cardiomiocitos, son un tipo celular con una alta concentración de mitocondrias, en comparación con otros tejidos (29). Las mitocondrias son los orgánulos en los cuales se produce la gran mayoría de las ROS, la DOXO puede ser oxidada a semiquinona, esta puede reaccionar con O₂ y formarse aniones superóxido O₂⁻, esta cadena redox puede desencadenar en la formación de especies como radicales hidroxilo (-OH), altamente tóxicos(30).

Otro componente clave para el daño cardíaco producido por la DOXO, es el hierro, la DOXO se compleja al Fe libre, el cual reacciona con oxígeno catalizando la reacción de Fenton (31).

El estrés oxidativo provocado por la DOXO en el corazón, ocurre tanto de forma aguda como crónica. En la forma aguda la principal fuente de ROS es la NADH deshidrogenasa de la cadena respiratoria mitocondrial, en cambio, el estrés oxidativo crónico o persistente es el resultado de alteraciones a nivel de DNAm y disminución de la funcionalidad de la citocromo c oxidasa (32).

Además de la generación de ROS, y el daño al DNA, la DOXO produce una alteración de los flujos de autofagia/mitofagia. La autofagia es el principal sistema de degradación intracelular por el cual, materiales citoplásmicos son degradados en el lisosoma, pero no es la simple eliminación de materiales, la autofagia sirve como un sistema de reciclaje dinámico que produce bloques de construcción y energía para la renovación celular y la homeostasis.(33) La inhibición de la autofagia produce acumulación de estructuras dañadas, lo que termina provocando la muerte de la célula, por el contrario, una hiperactivación de la autofagia elimina estructuras esenciales, provocando, también la muerte de la célula (34). La autofagia de las mitocondrias (mitofagia) puede causar un déficit de energía en el cardiomiocito y conducir a la insuficiencia celular.(25)

También hay indicios de que la DOXO puede inducir a la acumulación de proteínas proapoptóticas en células cardíacas (35). Debido al daño en el DNA, se sobre expresa la proteína p53. Esta funciona como un factor proapoptótico, translocándose a la membrana mitocondrial, promoviendo la disfunción mitocondrial y la liberación de factores apoptóticos retenidos entre las membranas mitocondriales, como el citocromo c, activando la vía apoptótica dependiente de la mitocondria.(36)

Estudios en la línea celular inmortalizada de cardiomioblastos H9c2, han demostrado que el tratamiento con DOXO, además de la vía de las caspasas, desencadena la activación de una vía apoptótica independiente de las caspasas y que implica la liberación de AIF (factor inductor de la apoptosis) mitocondrial. (36,37)

Otro mecanismo de toxicidad que puede ser inducido por fármacos es el estrés de retículo (38), evento que inhibe la capacidad de la célula de plegar y modificar postraduccionalmente las proteínas en el retículo endoplasmático (RE), lo que conlleva a una acumulación de proteínas mal plegadas (39). Cuando aumentan los niveles de las proteínas mal plegadas, se inicia la respuesta a las proteínas no plegadas (UPR), activando eventos como el aumento de tamaño del RE mediante el aumento de la biogénesis de componentes que intentan restaurar la homeostasis del RE, la regulación de la síntesis de las chaperonas GRP 78 y GRP 94 del RE, así como el aumento de la síntesis de enzimas y componentes involucrados en la degradación de proteínas mal plegadas. Si el estrés de retículo persiste, se activa un programa terminal de la UPR que induce la autodestrucción de la célula (40).

En este trabajo, para analizar el estrés de retículo hemos utilizado como control positivo la tunicamicina, un antibiótico producido por *Streptomyces lysosuperificus* que contiene glucosamina y es activo contra varios microorganismos como hongos, levaduras, bacterias grampositivas y virus (38). La tunicamicina impide la glicosilación de las proteínas, lo que impide el correcto plegamiento de estas (41). La TUNI puede utilizarse para acabar con células cancerígenas mediante mecanismos de estrés de retículo, llevando a la célula a una muerte programada, pero ello es un arma de doble filo para tejidos sanos, por ello analizamos en cardiomioblastos el ya más que estudiado ER, midiendo por W-B la expresión de GRP78 y GRP94, y además el entorno oxidativo generado a través de la medida de la expresión de HO-1. también hay estudios que indican que puede ayudar a reducir procesos inflamatorios (42)

Como hemos visto, la cardiotoxicidad inducida por DOXO es un proceso multifactorial, viéndose afectadas diferentes vías de señalización y pudiendo estar interconectadas entre ellas, factor que delimita su uso como quimioterapéutico, por lo que encontrar un tratamiento que redujera el daño provocado, podría permitir aumentar su uso, aumentando las posibilidades de éxito frente al tumor y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

El compuesto bioactivo de origen natural utilizado ha sido el Uvaol, un triterpeno pentacíclico presente en el alperujo, subproducto obtenido durante la extracción del aceite de oliva, que tiene propiedades antioxidantes y antiaterogénico (43). En la literatura encontramos muestras de compuestos bioactivos que modulan la acción de la DOXO. Un ejemplo es el resveratrol, una fitoalexina polifenólica que previene la toxicidad cardíaca inducida por la DOXO (44). Respecto al Uvaol, también hay indicios de que pueda reducir la inflamación y muerte celular inducida por fármacos (45).

Dado que:

- El daño cardíaco inducido por antraciclinas como la Doxorubicina se asocia con la producción de especies reactivas de oxígeno, estas moléculas dañan el DNA, las proteínas y los lípidos, provocando la disfunción y muerte de los cardiomiocitos.
- EL Uvaol es un triterpeno presente en las aceitunas y el aceite de oliva virgen, que ha demostrado potentes efectos antioxidantes, en estudios tanto in vivo como in vitro.

Nuestra hipótesis es que, el triterpeno Uvaol, puede atenuar los daños provocados por la Doxorubicina en los cardiomiocitos.

Los objetivos de este estudio son:

- Analizar el potencial efecto protector del Uvaol sobre la cardiotoxicidad inducida por la Doxorubicina.
- Valorar el efecto del Uvaol sobre la apoptosis inducida por la Doxorubicina en cardiomiocitos, mediante estudios de los indicadores: unión de Anexina-V, expresión de Caspasa-3 activa y fosforilación de la proteína H2AX
- Valorar el efecto del Uvaol sobre el estrés oxidativo inducido por la Doxorubicina en cardiomiocitos, mediante estudios de expresión de proteínas del sistema antioxidante como la Hemoxigenasa-1 (HO-1)
- Valorar el efecto del Uvaol sobre la respuesta del estrés oxidativo inducido por la Doxorubicina en cardiomiocitos, mediante estudios de expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94.
- Valorar el efecto del Uvaol sobre las alteraciones del citoesqueleto de F-actina inducido por la Doxorubicina en cardiomiocitos, mediante estudios de microscopía de fluorescencia.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Anticuerpos

Anticuerpo 1º	Referencia	Casa Comercial
HO-1	SPC-112D	StressMarq
Cleaved Caspase 3	9664S	Cell Signalling
GRP 78 (76-E6)	sc-13539	Santa Cruz
GRP 94	GTX103232	GeneTex
P-Histona H2A.X (Ser 139)	sc-517348	Santa Cruz
β-Actina	A5441	Sigma

Como norma general los Ab 1º han sido utilizados en una concentración 1:1000, excepto la β-Actina que ha sido utilizada en una concentración 1:30.000 y el GRP 78 en una 1: 500.

Anticuerpo 2º	Referencia	Casa Comercial
Anti Mouse	9410	GE Healthcare
Anti Rabbit	9340	GE Healthcare
Anti Rat	HAF005	RyD Systems

2.1.2 Reactivos

Reactivos	Referencia	Casa Comercial	Técnica
Faloidina FITC	D5282	Sigma-Aldrich	Inmunofluorescencia
DAPI	D9542	Sigma-Aldrich	Inmunofluorescencia
Anexina V	ANXVF-200T	Inmunostep	Citometría (Apoptosis)
Binding Buffer	BB10X-50ML	Inmunostep	Citometría (Apoptosis)
DMEM (4,5 g/L Glucosa) 10% STF	12-614F	Lonza	Cultivos celulares
Tripsina 0,25%	25200-072	Gibco	Cultivos celulares
FBS		Gibco	Cultivos celulares
H2O2 (30% v/v)		Merk Millipore	Western Blot
BlueStar Prestained Protein Marker	MWP03	Nippon Genetics Europe	Western Blot
Buffer Laemmli			Extracción proteica
BSA	A3059	Sigma-Aldrich	Bloqueo

Otros químicos utilizados, no especificados en la lista, se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

2.1.3 Estímulos

Estímulo	Referencia	Casa Comercial	Técnica
Doxorrubicina	T1020	TargetMol	Cultivos celulares
Tunicamicina	T7765	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
LPS	L-2630	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
4-PBA	P21005	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares

2.1.4. Compuestos bioactivos

Compuesto bioactivo	Referencia	Casa Comercial	Técnica
MCP		Sigma-Aldrich	Cultivos celulares
Uvaol	U6628	Sigma-Aldrich	Cultivos celulares

Para el desarrollo del trabajo se ha utilizado el Uvaol, un compuesto de naturaleza triterpénica pentacíclica de origen natural, obtenido a partir del alperujo, el principal subproducto generado en el proceso de obtención de aceite de oliva.

Otro compuesto utilizado en los experimentos, es la pectina cítrica modificada (MCP) un polisacárido complejo rico en restos de galactósidos, soluble en agua e indigerible obtenido a partir de ciertas partes de los cítricos como, la cáscara y la pulpa.

2.2. Métodos

2.2.1. Estudio *in vitro*: Modelo celular

La línea celular utilizada para llevar a cabo el trabajo de investigación ha sido H9c2, mioblastos de miocardio de rata. La línea celular procede de células de ventrículo cardíaco de embrión de rata que fue establecida por Kimes y Brandt (1976). Es una línea celular de tipo adherente, que se ha despegado con tripsina 0,25%/EDTA. Se cultivaron en Flask T75 tratados con polilisina, en medio DMEM con glucosa (4,5 g/L), suplementado al 10% de FBS, Penicilina-Estreptomicina (P/S) al 1% y L-Glutamina al 1%. Los experimentos se realizaron entre los pases 12-20. Durante el trabajo la línea celular se mantuvo en un incubador a 37 °C en atmósfera al 5% en CO₂.

2.2.2. Estudio de muerte celular por apoptosis mediante ensayo de unión de Anexina-V

La muerte celular programada o apoptosis fue estudiada mediante citometría de flujo. Se utilizó Anexina V conjugada con el fluorocromo FITC. La Anexina V es una proteína que tiene una gran afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido que transloca del interior al exterior de la membrana lipídica cuando la célula inicia el proceso de apoptosis.

Las células H9c2 se cultivaron en Flask de 25cm² (250.000 células/frasco), en medio de cultivo completo, cuando alcanzaron la confluencia aproximada del 70% - 80%, entonces se incubaron con los compuestos bio-activos como el Uvaol (5 µM, 10 µM, 20 µM y 40 µM) o MCP (0,05%, 0,1 y 0,2%), durante hora y media, transcurrido ese tiempo, fueron estimulados con DOXO (2µM y 5µM) y tunicamicina (5 µM) durante 24h. Tras ello, las células fueron lavadas con PBS frío y despegadas con Tripsina 0,25%, se centrifugaron durante 7' a 1200 rpm. Las células fueron incubadas con 2 µL/muestra de Anexina V-FITC en un tampón rico en sales ricas en calcio, "Binding Buffer" (10mM HEPES/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂), durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y con agitación, posteriormente, se añadieron 400 µL más de Binding Buffer. Las células fluorescentes (Anexina V-FITC positivas) se identificaron por citometría de flujo (Citómetro Gallios, Beckman Coulter).

2.2.3. Análisis de proteína. Western Blot

Las células H9c2 se cultivaron en placas de 35 mm con una concentración de 200.000 células/P35 en medio completo. Se incubaron hasta una confluencia aproximada del 70% - 80%, entonces, se incubaron con los compuestos bio-activos (5 µM, 10 µM, 20 µM y 40 µM del Uvaol o al 0,05%, 0,1 y 0,2% del MCP) durante 45', a continuación, se estimularon con DOXO (2µM y 5µM) y tunicamicina (1 µM y 5 µM). A las 24 horas se lavaron con PBS frío, y recogimos el extracto total de proteína en 75 µL Buffer de Laemmli 3X (0,5 M Tris y pH 6,8, 35% (v/v) glicerol, 0,006% (p/v) azul de bromofenol, 6% (p/v) SDS y 1M DTT).

La separación proteica se llevó a cabo mediante electroforesis vertical (SDS-PAGE), se cargaron entre 15 µL y 25 µL de proteínas con tampón de Laemmli 3X en un gel de poliacrilamida al 12% para la identificación de las proteínas de alto peso molecular (GRP 78, GRP 94 y HO-1) y al 15% para las proteínas de bajo peso molecular (Caspasa-3, P-Histona H2AX y también la Hemo Oxigenasa 1), la electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 140V. Como marcador de proteínas se cargaron 5 µL de BlueStar Prestained Protein Marker. Al finalizar, se llevó a cabo la transferencia a una membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF). Previamente, la membrana fue tratada en metanol 100% y activada en un sistema húmedo de metanol y tris-Glicina 1X. La transferencia se realizó durante 1 hora a 350 V en un baño de hielo. Para los estudios de la P-Histona, los experimentos se realizaron a 100 V durante 1 hora a 4 °C. Tras ello, la membrana se bloqueó durante 1 hora a RT o 4 horas a 4°C, en una solución de TBS-Tween-20 al 1% v/v (TTBS) de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) para bloquear uniones inespecíficas. Cuando las proteínas de interés tenían fosforilaciones, la solución de bloqueo fue TBS-Tween-20 al 1% v/v (TTBS) con BSA al 2% (p/v) libre de fosfatasas. A continuación, se incubó con los anticuerpos específicos para las proteínas de interés a 4°C durante toda la noche. Después se lavó con TTBS (3 x10 min) y la membrana se incubó con el Ab secundario, conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), en TTBS durante 1 h a 4°C. Después, se volvió a lavar la membrana con TTBS (3 x 10 min). Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente con la solución de revelado: 5 mL de ECL (0,5% luminol + 0,22% ácido cumárico + 10% 1M Tris pH 8,5) + 5 µL de H₂O₂, que permite la detección quimio luminiscente de los anticuerpos conjugados a la peroxidasa cuando se expone una película fotográfica Super RX-N (FujiFilm). Para el revelado se utilizó el sistema Curix 60, AGFA-Gevaert.

Finalmente se realizó una densitometría cuantitativa de las bandas por análisis de imagen con el software *Fiji/Image J* (Wayne Rasband, NIH, USA), normalizando la densidad de la banda correspondiente a la proteína de interés con la densidad de la banda correspondiente a una proteína constitutiva de referencia, en este caso, la β -Actina.

2.2.4. Ensayo de inmunofluorescencia

Para observar si los estímulos produjeron cambios estructurales en el citoesqueleto, se empleó el compuesto faloidina, una toxina del hongo *Amanita Phalloides* que, debido a su unión selectiva a microfilamentos, derivados de faloidina conjugados a fluoróforos, se usan en microscopía para visualizar F-actina en células fijadas. Se sembraron 2500 células sobre cristales tratados con polilisina y se trataron con el compuesto bio-activo de interés (20 μ M de Uvaol (Uv) y con MCP al 0,1%) durante 1 hora, después se les estimuló con DOXO (5 μ M) durante 24 horas. Tras ello, se lavaron con PBS 3 veces, se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS durante 5 minutos, se volvieron a lavar con PBS, y se permeabilizaban con Tritón X-100 0,1% en PBS, tras otro lavado con PBS, se incubaban con faloidina (5 μ g / mL), , durante 40 minutos en oscuridad, se lavaron con PBS y se incubaron con DAPI (0,3 μ g / mL) durante 10 minutos en oscuridad, para visualizar los núcleos. Se lavaron por última vez con PBS dos veces. Por último, se montaron en portaobjetos con Gelvatol, y se observaron con un Microscopio de Fluorescencia NIKON Eclipse 90i equipado con cámara DS-Ri1.

2.2.5. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron en su mayoría, al menos tres veces, se representaron como la media \pm SEM y se analizaron con el software GraphPad Prism versión 9 (La Jolla, CA, USA), mediante un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido del test de Bonferroni. Los P- valores inferiores a 0,05 fueron considerados como significativos.

3. RESULTADOS

En este estudio analizamos el daño que la DOXO puede producir en células cardíacas y su posible modulación por un triterpeno natural como es el Uvaol. Realizamos estudios in vitro en una línea celular de cardiomioblastos de rata, H9c2. Analizamos la inducción de apoptosis y de la Caspasa-3 activa, y el daño producido en el DNA, para el cual se ha estudiado la fosforilación la Histona H2AX. También exploramos la posibilidad de que DOXO estuviera activando vías de estrés de retículo para la cual se ha analizado las chaperonas GRP78 y GRP94. Por último, estudiamos la protección frente al estrés oxidativo mediante el análisis de HO-1. También estudiamos cambios en el citoesqueleto mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos se presentan en los siguientes apartados.

3.1. Efecto de la DOXO sobre cardiomioblastos H9c2.

Los siguientes experimentos demuestran como la DOXO produce daño en el DNA y estimula vías apoptóticas.

3.1.1. Apoptosis

Primero, para el estudio de apoptosis se utilizó la sonda Anexina V conjugada con FITC. Se une a la fosfatidilserina externalizada, que en situación fisiológica se encuentra localizada exclusivamente en la capa interna de la membrana plasmática, pero al inicio de la apoptosis este fosfolípido se externaliza y se hace accesible para la Anexina V. La fluorescencia emitida por la Anexina V-FITC se cuantificó, como medida de células apoptóticas positivas mediante un citómetro de flujo.

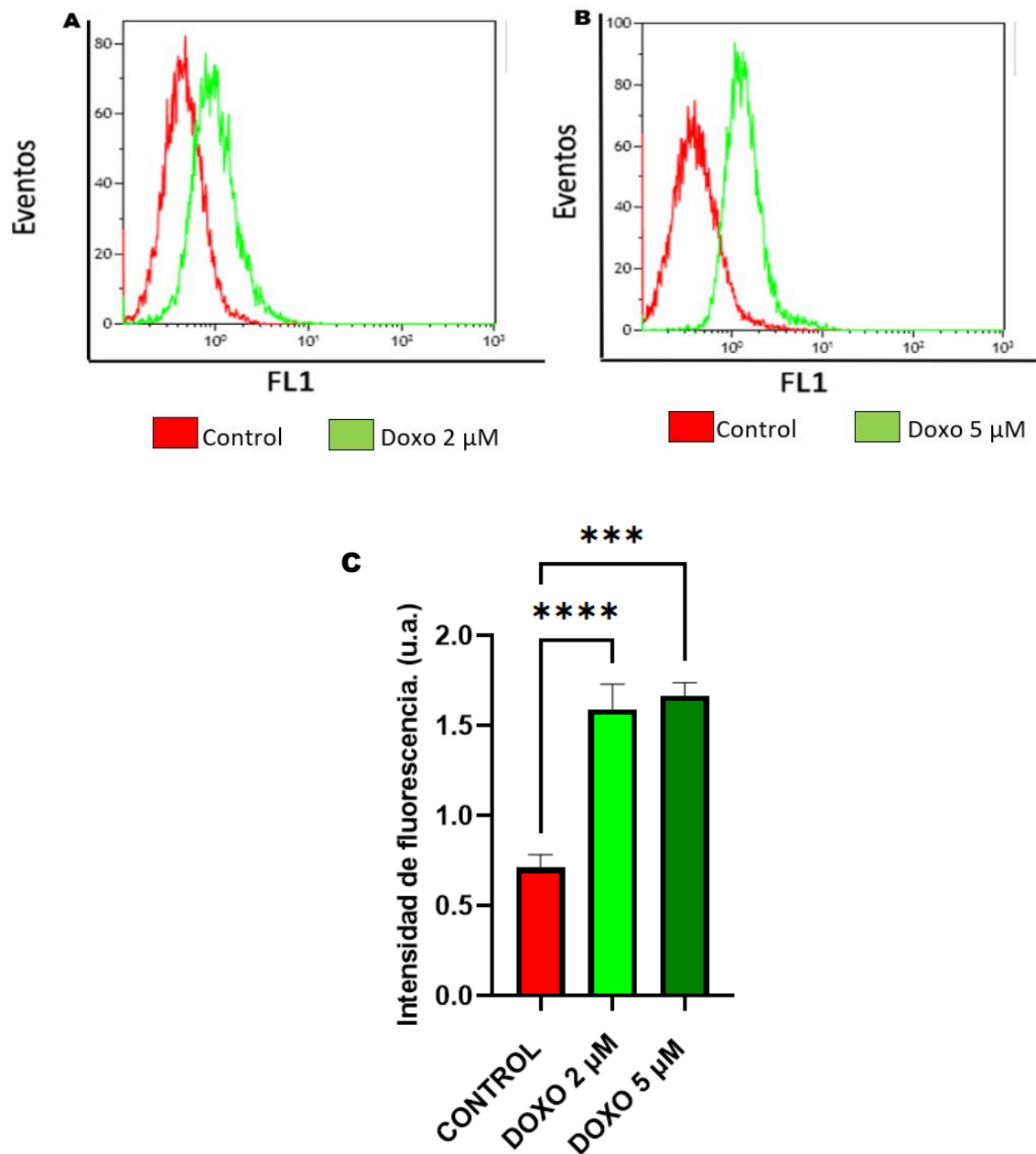


Figura 5: Apoptosis de la línea celular H9c2 estimuladas con DOXO. A) y B) Curva de fluorescencia de citometría de flujo. Las células se incubaron durante 24 h con DOXO 2 μ M (A) y DOXO 5 μ M (B) y se marcaron con Anexina V-FITC, cuya fluorescencia se analizó por citometría de flujo. **C)** Representación gráfica de las medidas de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.), n=8

En la figura 5 se observa como la DOXO, a las dos dosis utilizadas, aumenta de forma estadísticamente significativa, el número de células en apoptosis respecto al control, P-valor <0,0001.

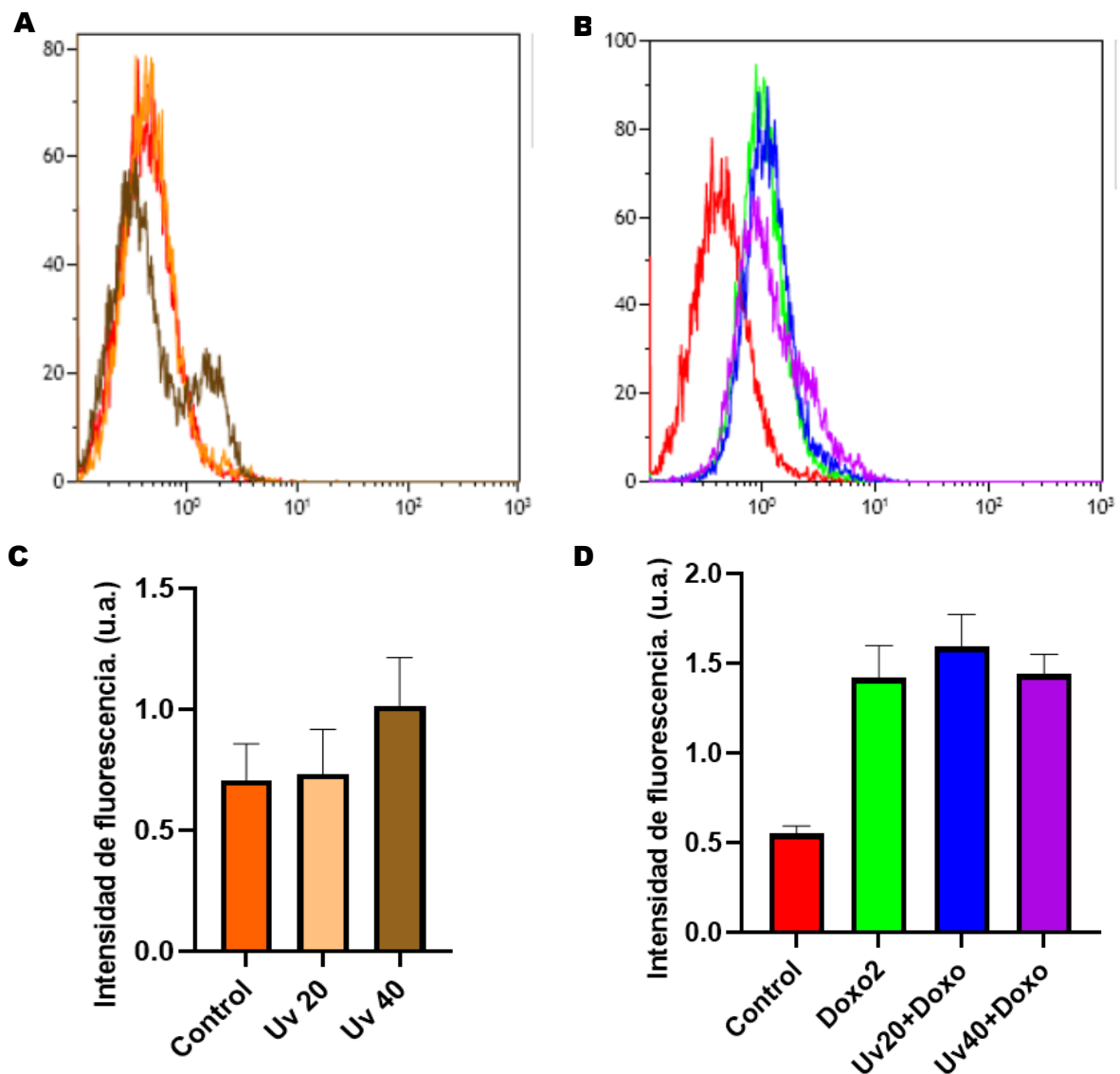


Figura 6: Apoptosis de la línea celular H9c2 incubadas en Uvaol o DOXO en presencia o ausencia de Uvaol. A) y B) Curva de fluorescencia de citometría de flujo. Las células se incubaron durante 24 h con Uvaol (20 μ M y 40 μ M) (A) y en DOXO (2 μ M) en ausencia o presencia de Uvaol (20 μ M y 40 μ M) (B) y se marcaron con Anexina V-FITC, cuya fluorescencia se analizó por citometría de flujo. C) y D) Representación gráfica de las medidas de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.) de A) y B) respectivamente., n=3

No se observa que el Uvaol sea capaz de modular la respuesta apoptótica producida por la DOXO.

Para comprobar que la apoptosis provocada por la DOXO es modulable en los cardiomioblastos, realizamos los siguientes experimentos con MCP, una pectina cítrica modificada, un polisacárido complejo rico en restos de galactósidos obtenido a partir de ciertas partes de los cítricos como, la cáscara y la pulpa, con efectos pleiotrópicos, entre otros, implicados en procesos anticancerígenos (46) (47).

Del MCP encontramos diferentes efectos, relacionados con la protección frente a fibrosis, la insuficiencia cardíaca, la aterosclerosis y la diabetes mellitus, por ejemplo inhibiendo la expresión de la Galectina-3 (48,49)

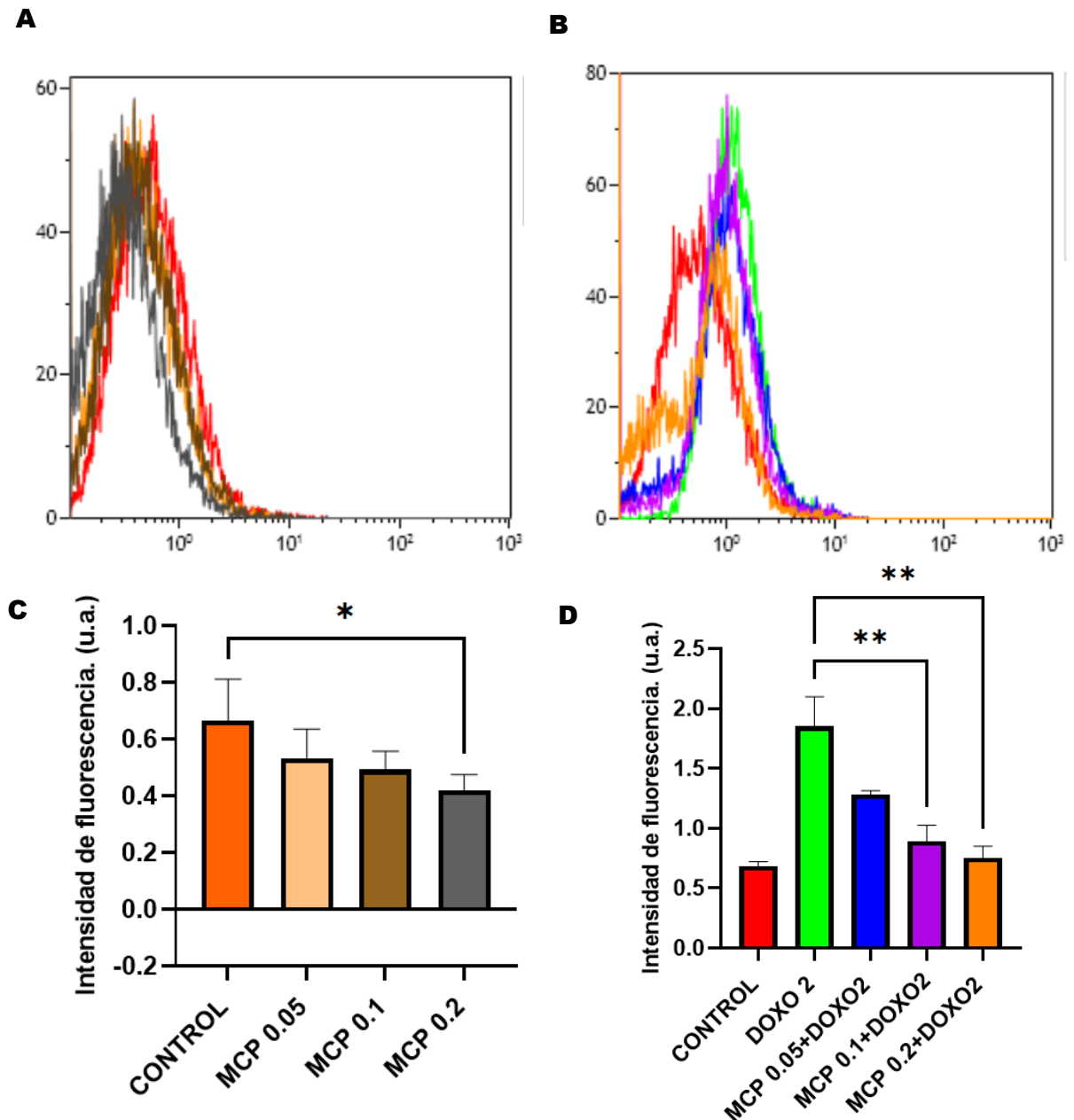


Figura 6: Apoptosis de la línea celular H9c2 incubadas en MCP o DOXO en presencia o ausencia de MCP. A) y B) Curva de fluorescencia de citometría de flujo. Las células se incubaron durante 24 h con Uvaol (20 μ M y 40 μ M) (A) y en DOXO (2 μ M) en ausencia o presencia de Uvaol (20 μ M y 40 μ M) (B) y se marcaron con Anexina V-FITC, cuya fluorescencia se analizó por citometría de flujo. **C) y D)** Representación gráfica de las medidas de fluorescencia en unidades arbitrarias (u.a.) de A) y B) respectivamente., n=3

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el control y el grupo incubado con MCP al 0,2%, P-valor < 0,05, el MCP reduce la apoptosis respecto al grupo control, siendo mayor el efecto a dosis mayores. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo estimulado con DOXO y el grupo estimulado y tratado con MCP al 0,1% y 0,2%, P-valor < 0,005.

Con estos experimentos comprobamos que la apoptosis generada por DOXO sí es modulable.

Viendo que la DOXO producía apoptosis, se estudió la expresión de un marcador apoptótico, la Caspasa-3 activa (Cas-3), y el efecto que tenía el Uvaol sobre dicho efecto.

En la Cas-3 confluyen vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas, siendo el principal ejecutor de la apoptosis o muerte celular programada (50). Por ello, analizamos por Western-Blot la expresión de la Cas-3 (Figura 8) en lisados celulares de cultivos incubados durante 24 h. con diferentes dosis de Uvaol (5 μ M, 10 μ M y 20 μ M) en presencia o ausencia de Doxo (2 μ M).

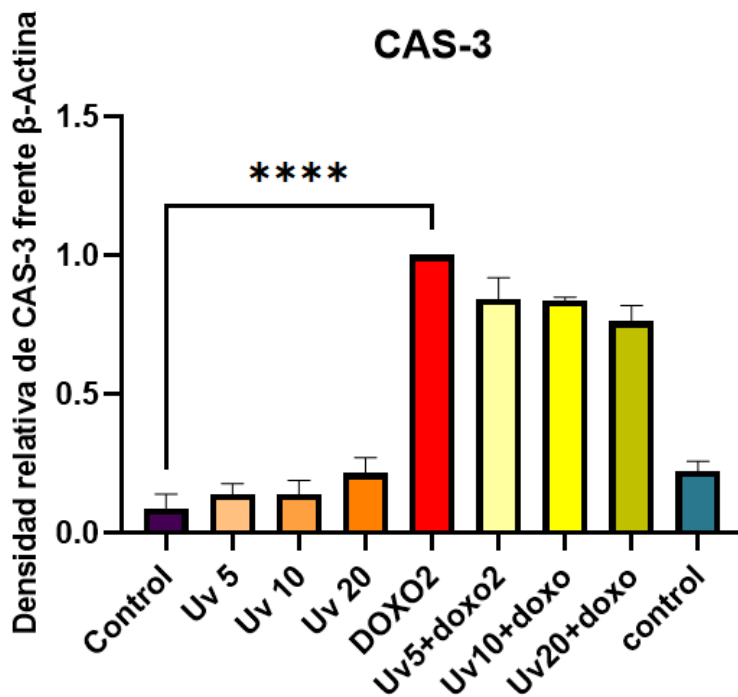
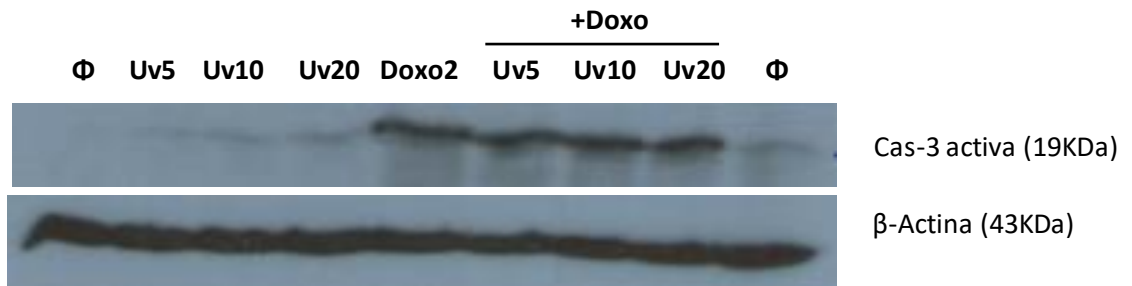


Figura 8: Expresión de la Caspasa-3 en H9c2. Las células se incubaron con diferentes dosis de Uvaol (5 μ M ,10 μ M y 20 μ M) y con Doxo (2 μ M) y se midió la expresión a las 24 h. mediante Western Blot. Se utilizó como control de carga y para la cuantificación de la expresión de la proteína, la β -Actina. Los datos están expresados como densidad relativa de la proteína de interés frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM, n=3.

La inducción de Cas-3 por DOXO es estadísticamente significativa, P-valor <0,0001. Al igual que en los experimentos de Anexina V, no hay modulación observable por parte del Uvaol.

También estudiamos el daño provocado en el DNA por el efecto de la DOXO. Para ello analizamos los cambios que se producía a nivel de fosforilación de histonas, y si Uv tenía algún efecto modulador.

La fosforilación de la histona γ -H2AX indica roturas de doble cadena (DSB) del DNA (51). Por ello analizamos por W-B la expresión de γ -H2AX (Figura 9), en lisados celulares de cultivos que se incubaron durante 24 h. con diferentes dosis de Uvaol (5 μ M, 10 μ M y 20 μ M) en presencia o ausencia de DOXO (2 μ M).

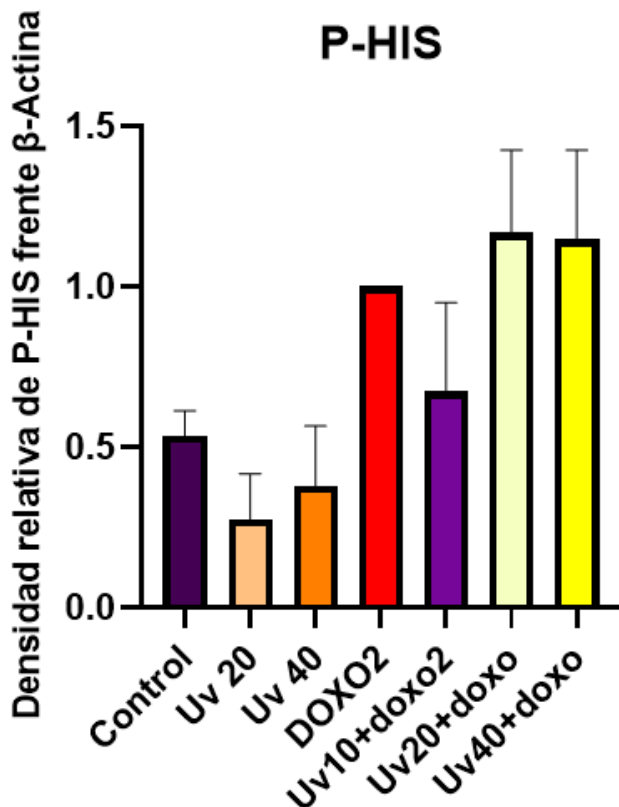
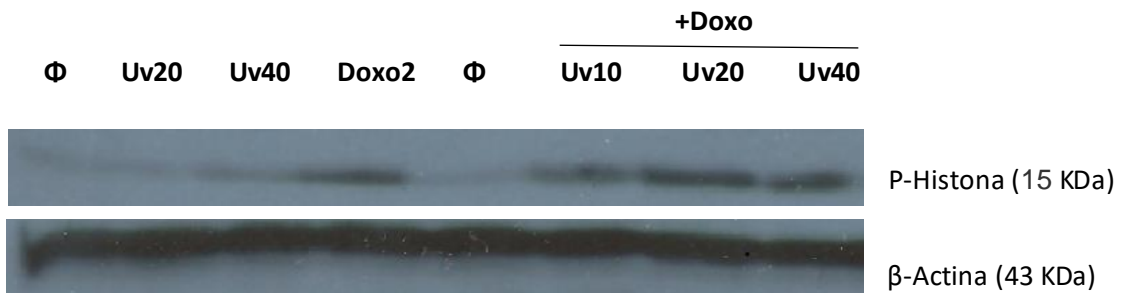


Figura 9: Expresión de P-Histona (γ -H2AX) en H9c2. Las células se incubaron con diferentes dosis de Uvaol (20 μ M y 40 μ M), con Doxorubicina (2 μ M) y se midió la expresión a las 24 h. mediante Western Blot. Se utilizó como control de carga y para la cuantificación de la expresión de la proteína, la β -Actina. Los datos están expresados como densidad relativa de la proteína de interés frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM, n=3.

Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas, P-valor > 0,05, sí podemos apreciar una tendencia de aumento de P-Histona cuando se estimulan con DOXO, un aumento que el Uvaol no parece inhibir.

3.1.2. Análisis de respuesta antioxidante: Expresión de la proteína HO-1

Otra causa del daño ocasionado por la DOXO es el entorno oxidativo que se genera en la célula, para su análisis, estudiamos los cambios de expresión en HO-1, una enzima protectora frente al estrés oxidativo y si el Uvaol tiene algún efecto modulador.

La HO-1 es una enzima que desempeña un papel fundamental en defensa frente al estrés oxidativo, interviene en procesos como la relajación de los vasos sanguíneos, atenuante de la respuesta inflamatoria en la pared de los vasos y en procesos de angiogénesis y vasculogénesis (52). Por ello analizamos por W-B la expresión de HO-1 (Figura 10), en lisados celulares de cultivos que se incubaron durante 24 h. con diferentes dosis de Uvaol (5 μ M, 10 μ M y 20 μ M) en presencia o ausencia de DOXO (2 μ M).

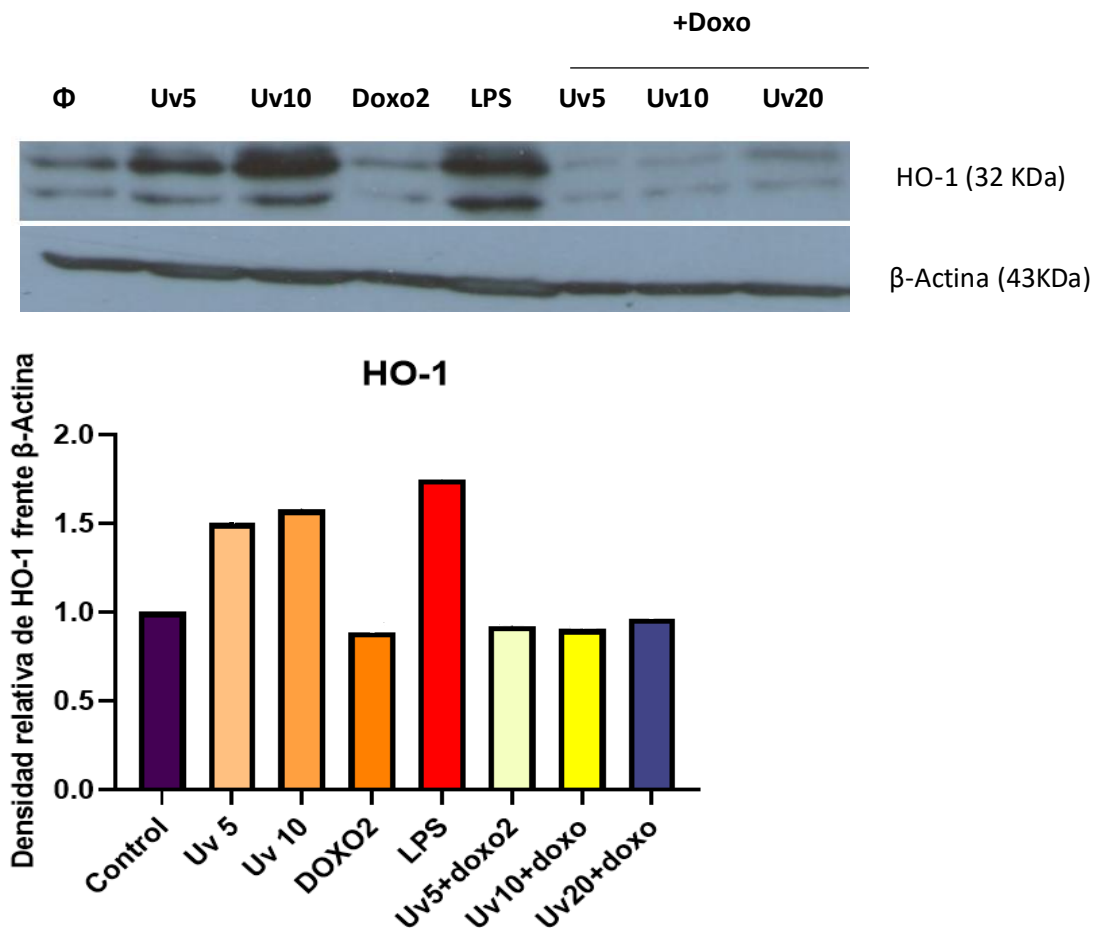


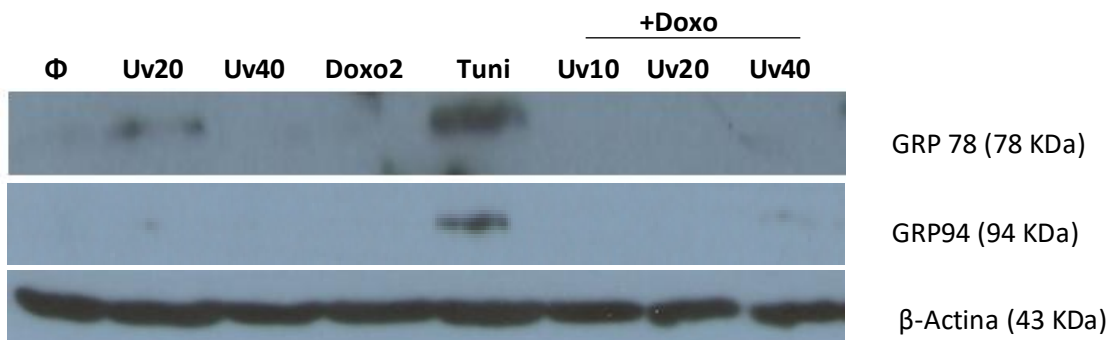
Figura 10: Expresión de HO-1 en H9c2. Las células se incubaron con diferentes dosis de Uvaol (5 μ M ,10 μ M y 20 μ M) y con Doxo (2 μ M) y se midió la expresión a las 24 h. mediante Western Blot. Como control positivo utilizamos LPS (10 μ g/mL). Se utilizó como control de carga y para la cuantificación de la expresión de la proteína, la β -Actina. Los datos están expresados como densidad relativa de la proteína de interés frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media, n=2

Aunque no observamos diferencias estadísticamente significativas, P-valor > 0,05. Vemos como el Uv induce la expresión de HO-1 respecto al control. También se puede apreciar una disminución de la expresión de HO-1 en células estimuladas con DOXO, una disminución que no parece revertir ninguna de las dosis probadas de Uv. Necesitamos más experimentos para poder confirmarlo estadísticamente.

3.1.3. Análisis del Estrés de retículo

Otra vía posible por la que la DOXO puede dañar los cardiomioblastos es a través del estrés de retículo, para su estudio analizamos los cambios de expresión en GRP 78 y GRP 94.

Las chaperonas GRP 78 y GRP 94 son proteínas que se sintetizan como respuesta a proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE), obligan a las proteínas no plegadas a replegarse o a degradarse a través de mecanismos de degradación celular. Por ello analizamos por W-B la expresión de GRP 78 y GRP 94 (Figura 11 y 12 respectivamente), en lisados celulares de cultivos que se incubaron durante 24 h. con diferentes dosis de Uvaol (5 μ M, 10 μ M y 20 μ M) en presencia o ausencia de DOXO (2 μ M). Como se muestra en la figura, utilizamos como control positivo células estimuladas con Tunicamicina (5 μ M).



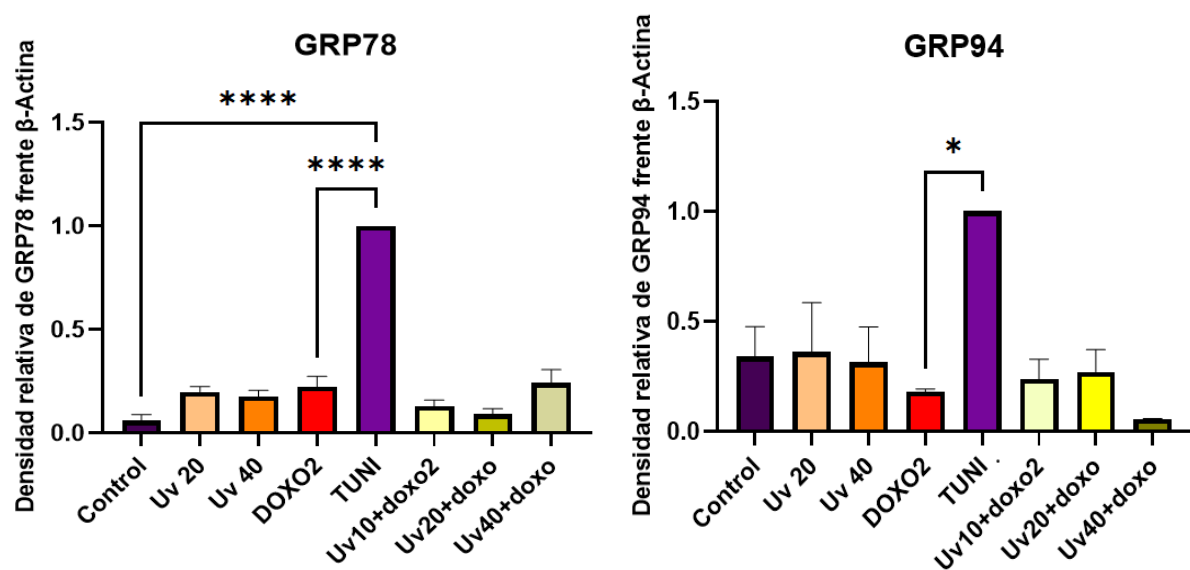


Figura 11: Expresión de GRP78 (Izqd) y GRP94 (dcha) en H9c2. Las células se incubaron con diferentes dosis de Uvaol (20 μ M y 40 μ M), con DOXO (2 μ M), como control positivo se utilizaron células estimuladas con Tunicamicina (5 μ M) y se midió la expresión a las 24 h. mediante Western Blot. Se utilizó como control de carga y para la cuantificación de la expresión de la proteína, la β -Actina. Los datos están expresados como densidad relativa de la proteína de interés frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM, n=2.

No se produce activación ni en la expresión de GRP 78 ni GRP 94 en células estimuladas con DOXO, P-valor $>0,05$. Sí hay diferencias con el control positivo, células estimuladas con TUNI, P-valor $< 0,0001$.

Como comprobamos que DOXO no activa las vías de estrés de retículo analizadas, para determinar si el UV es capaz de modular la activación de vías de ER, utilizamos la TUNI, que sabemos que sí activa dichas vías.

También mediante W-B analizamos la expresión de GRP 94 (Figura 14), en lisados celulares de cultivos que se incubaron durante 24 h. con diferentes dosis de Uvaol (5 μ M, 10 μ M y 20 μ M) en presencia o ausencia de TUNI (1 μ M) y utilizando PBA, que está descrito que disminuye el estrés de retículo (53,54).

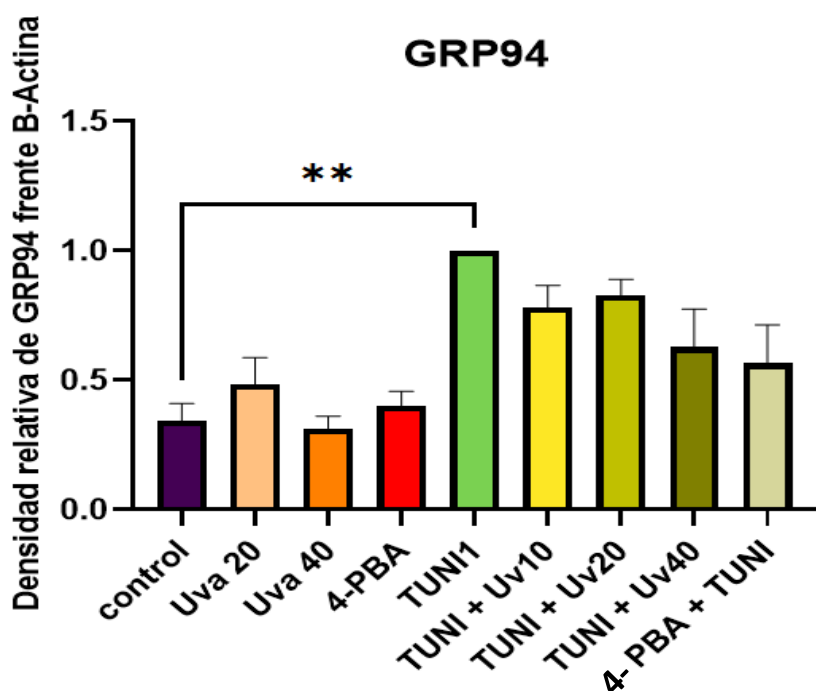
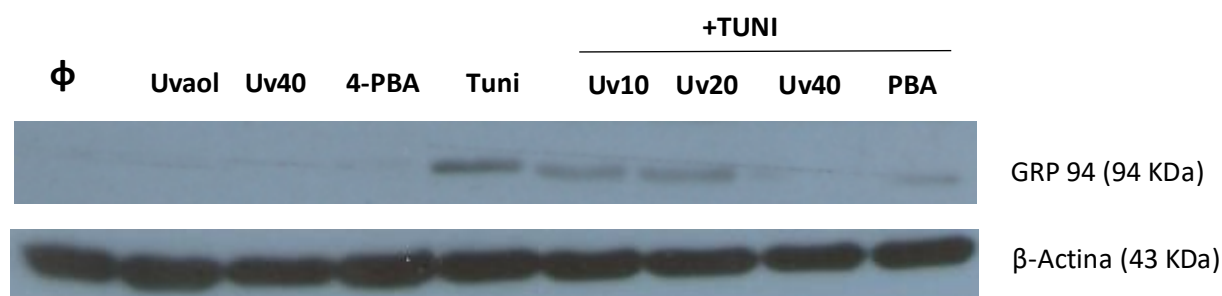
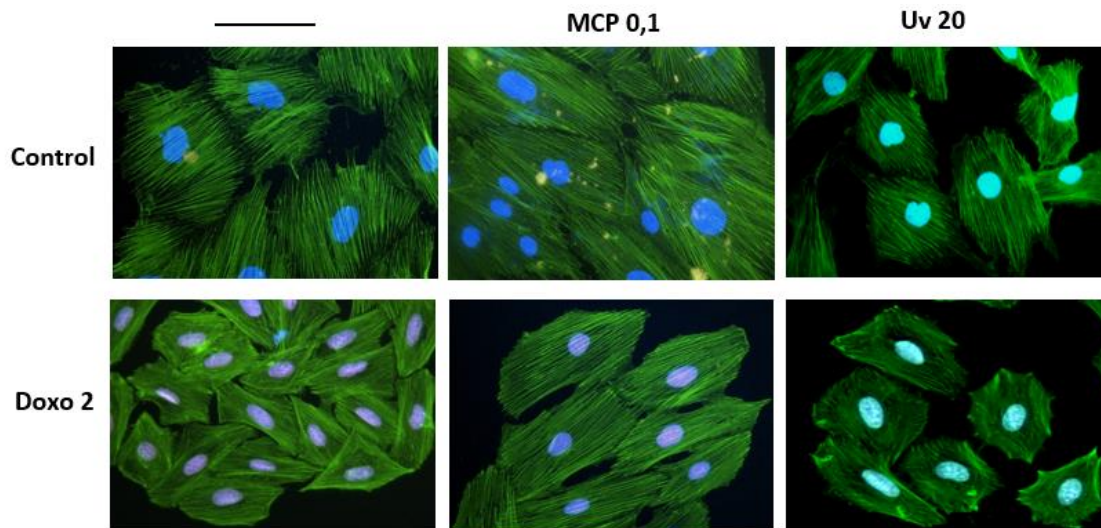


Figura 12: Expresión de GRP94 en H9c2. Las células se incubaron con diferentes dosis de Uvaol 10 μ M, 20 μ M y 40 μ M) y con Tunicamicina (1 μ M), utilizamos como control positivo de tratamiento ante el ER 4-PBA, y se midió la expresión a las 24 h. mediante Western Blot. Se utilizó como control de carga y para la cuantificación de la expresión de la proteína, la β -Actina. Los datos están expresados como densidad relativa de la proteína de interés frente a la β -Actina. Los resultados se muestran como la media \pm SEM, n=3.

Aunque se observa una tendencia, no hay diferencias estadísticamente significativas en la expresión de GRP 94 entre las células únicamente estimuladas con TUNI y las estimuladas + tratadas con Uvaol, P-valor >0,05.

3.2. Efecto de la DOXO, Uvaol sobre la estructura del citoesqueleto

Para observar si los estímulos produjeron cambios estructurales en el citoesqueleto, se incubaban con Phalloidina, la cual se une a los microfilamentos o actina F, esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción celular, y con DAPI para visualizar los núcleos. Las células se observaron bajo un Microscopio de Fluorescencia.



La fluorescencia verde muestra la actina polimerizada, F-Actina. En los cardiomioblastos estimulados con DOXO, aumenta la presencia de actina reticular, en la cual, los filamentos de actina se desplazan hacia la pared celular. No se aprecia que el Uvaol sea capaz prevenir este cambio estructural en el citoesqueleto provocado por la DOXO, algo que sí se observa cuando las células son estimuladas en presencia de MCP. Además, se observa como las células incubadas en presencia de Uvaol, disminuye la intensidad de la fluorescencia respecto al control.

4. DISCUSIÓN

El cáncer, un conjunto de enfermedades cuya consecuencia común es la proliferación celular descontrolada, es una patología que cada año tiene más incidencia, siendo ya, la segunda causa de muerte más común en todo el mundo (5). Hay diferentes tratamientos para combatir el cáncer (12), entre ellos se encuentran los fármacos quimioterapéuticos, grupo al que pertenece la Doxorubicina, un antibiótico antitumoral.

Como encontramos en la literatura, la Doxorubicina, aun siendo un fármaco eficaz como tratamiento antitumoral, tiene numerosos efectos secundarios, pudiendo afectar al cerebro, provocando una disminución de la función cognitiva (56), a los riñones, al hígado o al corazón (25) (26).

El estudio lo centramos en el daño cardíaco provocado por la DOXO, por ello todos los estudios se han realizado en la línea celular de cardiomioblastos de embrión de rata H9c2, una línea celular validada como modelo in vitro de célula cardíaca (57)

En primer lugar, estudiamos los efectos que produce la DOXO sobre células cardíacas H9c2. Observamos, tal como indica la literatura (58), como la DOXO provoca daño cardíaco induciendo apoptosis, utilizando Anexina V, la cual se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido que transloca al exterior de la membrana lipídica cuando la célula inicia el proceso de apoptosis, activando la vía dependiente de caspasa, ya que vemos aumentada de forma significativa la expresión de Cas-3. También comprobamos que se produce daño a nivel del DNA, vemos como DOXO aumenta fosforilación de la histona (H2AX), marcador de dobles roturas en el DNA, efecto que ya citan otros estudios (59,60).

Además de caracterizar la respuesta de la Doxorubicina en los cardiomioblastos, analizamos el potencial de modulación por parte de un compuesto bioactivo como el Uvaol, un triterpeno obtenido a partir del alperujo del aceite de Oliva y del cual se le ha descrito propiedades antioxidantes y antiaterogénico (43).

Una de las principales vías por las que la doxorubicina produce daño, es a través del estrés oxidativo (28). En nuestro trabajo comprobamos que la DOXO, no sólo no aumenta la respuesta antioxidante, sino que reduce la expresión de HO-1 inducida por el terpeno Uvaol, HO-1 representa un indicador de la maquinaria de protección frente a la agresión oxidativa, tal como se presentaba en otros trabajos previos (61). Esta disminución puede dejar a la célula más susceptible de ataques oxidativos.

No vemos que DOXO active vías de estrés de retículo, otra posible vía de daño, en los cardiomioblastos estudiados, midiendo la expresión de las chaperonas GRP78 y GRP94, teniendo como referencia positiva, la TUNI, un antibiótico que provoca estrés de retículo(38). Aunque sí encontramos estudios que evidencian una activación en la expresión de la chaperona GRP 78 inducida por DOXO (62), en nuestros estudios no, luego no es relevante el efecto del Uvaol, aunque sí vemos que el Uvaol es capaz de disminuir el estrés de retículo producido por la tunicamicina en estas células, al igual que otros compuestos triterpénicos (63,64)

Observamos que el Uvaol no revierte los daños provocados por la DOXO. Ni disminuye el efecto apoptótico generado, una respuesta modulable, que comprobamos con el MCP, un polisacárido complejo rico en restos de galactósidos con efectos pleiotrópicos (46) (47), sí consigue aplacar el efecto apoptótico de la DOXO, además,

también es un efecto dependiente de dosis, siendo mayor el efecto protector a mayores dosis de MCP. El Uvaol tampoco disminuye la expresión de la Caspasa-3 ni la fosforilación de Histona H2AX. Aunque el Uvaol no consiga revertir tampoco los efectos de la DOXO en la expresión de la Hemo Oxigenasa 1, sí que se observa que aumenta su expresión respecto a un grupo control.

Como con la DOXO no activábamos vías de ER, para analizar el posible efecto del Uv sobre esta vía, realizamos un estudio donde utilizamos TUNI, compuesto que sí activa vías de ER. Observamos que el Uv no modula la expresión de las chaperonas analizadas, GRP 78 y GRP 94.

Por último, se realizó un estudio sobre los cambios estructurales del citoesqueleto celular que provoca la DOXO. Sí, observamos cambios estructurales en el citoesqueleto cuando las células se estimulan con DOXO, los filamentos de actina se desplazan hacia la pared celular (actina reticular o periférica), No se aprecia que el Uvaol sea capaz de revertir este cambio estructural en el citoesqueleto provocado por la DOXO, algo que el MCP sí parece que contrarreste este efecto. Además, se observa como en las células incubadas con Uvaol, el número de fibras de actina disminuye respecto al grupo control.,

Los experimentos de microscopía han sido realizados una única vez, por lo que no podemos sacar conclusiones precisas, se necesita realizar un mayor número de experimentos para poder obtener una estadística.

Como resumen, el daño cardíaco provocado por la doxorubicina podría estar relacionado con la inducción, en cardiomioblastos, de fenómenos de apoptosis, daños en el DNA, el bloqueo de agentes antioxidantes y modulación estructural del citoesqueleto, pero no, según nuestros resultados, a través de vías de estrés de retículo. Por otra parte, el Uvaol, aun siendo un compuesto interesante por sus propiedades descritas, no parece revertir el daño provocado, teniendo siempre presente, que se debe seguir llevando a cabo experimentos para cerciorarse de sus efectos.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones alcanzadas a partir de los resultados obtenidos en este trabajo son las siguientes:

- El Uvaol no es capaz de modular la Apoptosis inducida por la Doxorubicina en los cardiomiocitos H9c2.
- La Doxorubicina no aumenta la expresión de las chaperonas GRP 78 y GRP 94, relacionadas con el estrés de retículo, en los cardiomiocitos H9c2.
- El Uvaol parece aumentar la expresión de la proteína HO-1, un importante mecanismo de defensa antioxidante, en los cardiomiocitos H9c2
- El Uvaol no es capaz de inducir la expresión de la proteína HO-1 en presencia de Doxorubicina, en los cardiomiocitos H9c2.
- La Doxorubicina provoca un posible cambio estructural en el citoesqueleto en los cardiomiocitos las H9c2 que el Uvaol no consigue prevenir.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
2. Rosalie David A, Zimmerman MR. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Publ Gr*. 2010;
3. Garber JE, Offit K. Hereditary Cancer Predisposition Syndromes. <https://doi.org/101200/JCO200510042>. 2016 Sep 21;23(2):276–92.
4. Hulvat MC. Cancer Incidence and Trends. *Surg Clin North Am*. 2020 Jun 1;100(3):469–81.
5. Cáncer [Internet]. [cited 2021 Jul 29]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
6. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Vol. 199, Cancer Control. 2020.
7. Fitzmaurice C. Supplemental content. *JAMA Oncol* [Internet]. 2018;4(11):1553–68. Available from: <https://jamanetwork.com/>
8. Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf.
9. The Sustainable Development Goals. In 2015.
10. A/66/L.1 - E - A/66/L.1 -Desktop. In [cited 2021 Jul 29]. Available from: <https://undocs.org/en/A/66/L.1>
11. Definición de microambiente tumoral - Diccionario de cáncer del NCI - Instituto Nacional del Cáncer [Internet]. [cited 2021 Jul 29]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/microambiente-tumoral>
12. Wang J-J, Lei K-F, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments.
13. Lawrence J, Cameron D, Argyle D. Species differences in tumour responses to cancer chemotherapy. *R Soc* [Internet]. 2015 [cited 2021 Jul 30]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0233>
14. How-Chemotherapy-Drugs-Work @ Www.Cancer.Org [Internet]. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>
15. Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2021 Jul 29];4(6):687–99. Available from: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>
16. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy.

17. Kutsch O, Levy DN, Bates PJ, Decker J, Kosloff BR, Shaw GM, et al. Bis-Anthracycline Antibiotics Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2004 May [cited 2021 Jul 30];48(5):1652–63. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
18. Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2014 Jan 1;1845(1):84–9.
19. Taatjes DJ, Gaudio G, Resing K, Koch TH. Communications to the Editor Alkylation of DNA by the Anthracycline, Antitumor Drugs Adriamycin and Daunomycin [Internet]. 1996. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
20. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jul 30];21(7):440–6. Available from: https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/Fulltext/2011/07000/Doxorubicin_pathways__pharmacodynamics_and_adverse.11.aspx
21. Berlin V, Haseltine WA. Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P-450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen. *J Biol Chem*. 1981 May 25;256(10):4747–56.
22. Lucci A, Han T-Y, Liu Y-Y, Giuliano AE, Cabot MC. Multidrug Resistance Modulators and Doxorubicin Synergize to Elevate Ceramide Levels and Elicit Apoptosis in Drug-Resistant Cancer Cells.
23. Delpy E, Hatem SN, Andrieu N, de Vaumas C, Henaff M, Rücker-Martin C, et al. Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* [Internet]. 1999 Aug 1 [cited 2021 Jul 30];43(2):398–407. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovasces/article/43/2/398/332561>
24. Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting Ceramide Metabolism—a Strategy for Overcoming Drug Resistance. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2001 Mar 7 [cited 2021 Jul 30];93(5):347–57. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/93/5/347/2906481>
25. C C, RX S, S C, S C, PJ O, MS S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* [Internet]. 2009 Jul 22 [cited 2021 Jul 30];16(25):3267–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19548866/>
26. XL Y, CH F, HS Z. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C(60)]fullerene derivatives and its mechanism. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jul 30];16(1):41–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11812638/>
27. Smuder AJ. Exercise stimulates beneficial adaptations to diminish doxorubicin-induced cellular toxicity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2019;317:662–72. Available from: www.ajpregu.org
28. Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Lett*. 2019 Jun 1;307:41–8.

29. Goffart S, von Kleist-Retzow J-C, Wiesner RJ. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2021 Jul 30];64(2):198–207. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/64/2/198/321063>
30. Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, et al. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: A common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
31. Šimůnek T, Štěřba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gerši V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Reports*. 2009 Jan 1;61(1):154–71.
32. Doxorubicin Inactivates Myocardial Cytochrome c Oxidase in Rats: Cardioprotection by Mito-Q | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cited 2021 Aug 3]. Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006349508001288?token=FFF5125B01386D6B83984173CC772632A3C80078621B44673416141E684F3C22DA3C56DF9E9DDA34DC5264BFA14384AE&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210803110149>
33. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues | Elsevier Enhanced Reader. [cited 2021 Aug 3]; Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867411012761?token=F19A471A30E35F744C93805EAE3082E52DA7B1B43FCA194394723DC4FE23BB76C1E71C2BECFA3707D268F5F5AA1A34DE&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210803134412>
34. Oliveira PJ, Wallace KB, Sardão VA. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. 2020; Available from: www.ahajournals.org/journal/res
35. Zhang C, Feng Y, Qu S, Wei X, Zhu H, Luo Q, et al. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. Available from: <https://academic.oup.com/cardiovascres/article/90/3/538/275212>
36. Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB. Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 cardiomyoblasts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;64:811–27.
37. S B, PM S, S C, Q K, JH C, YY K, et al. Delayed activation of caspase-independent apoptosis during heart failure in transgenic mice overexpressing caspase inhibitor CrmA. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2021 Aug 3];299(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833960/>
38. Foufelle F, Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharma Res Per*. 2016;4(1):211.
39. Oakes SA, Papa FR. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human

Pathology.

40. P W, D R. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* [Internet]. 2011 Nov 25 [cited 2021 Aug 4];334(6059):1081–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22116877/>
41. AH S. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica (Cairo)* [Internet]. 2012 [cited 2021 Aug 4];2012:1–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24278747/>
42. Kim SY, Hwang JS, Han IO. Tunicamycin inhibits Toll-like receptor-activated inflammation in RAW264.7 cells by suppression of NF- κ B and c-Jun activity via a mechanism that is independent of ER-stress and N-glycosylation. *Eur J Pharmacol*. 2013 Dec 5;721(1–3):294–300.
43. Allouche Y, Beltrán G, Gaforio JJ, Uceda M, Mesa MD. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food Chem Toxicol*. 2010 Oct 1;48(10):2885–90.
44. Gu J, Hu W, Zhang D-D. Resveratrol, a polyphenol phytoalexin, protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity.
45. Biomechanical and functional properties of trophoblast cells exposed to Group B Streptococcus in vitro and the beneficial effects of uvaol treatment | Elsevier Enhanced Reader. [cited 2021 Aug 28]; Available from: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0304416519301618?token=895DDE8C7395D7F2C3979FE9E08F5489E68D307530360735AD668F7B1CA8BA824849ABD85B21CDFE811F8C6DBC739319&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210828074152>
46. Niture SK, Refai L. Plant Pectin: A Potential Source for Cancer Suppression. *Am J Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2013 Apr 18 [cited 2021 Aug 28];8(1):9–19. Available from: <https://thescipub.com/abstract/ajptsp.2013.9.19>
47. Eliaz I, Raz A. Pleiotropic Effects of Modified Citrus Pectin. Available from: www.mdpi.com/journal/nutrients
48. Suthahar N, Meijers WC, Silljé HHW, Ho JE, Liu F-T, De Boer RA. Galectin-3 Activation and Inhibition in Heart Failure and Cardiovascular Disease: An Update. *Theranostics* [Internet]. 2018;8(3):593–609. Available from: <http://www.thno.org>
49. Gao X, Zhi Y, Zhang T, Xue H, Wang X, Foday AD, et al. Analysis of the neutral polysaccharide fraction of MCP and its inhibitory activity on galectin-3.
50. Lossi L, Castagna C, Merighi A. Molecular Sciences Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
51. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. *Methods Mol Biol*. 920.
52. A L, A J, A G-P, AJ R, J C, A A, et al. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2008 Oct [cited 2021 Aug 23];10(10):1767–812. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18576916/>

53. Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 1996 [cited 2021 Sep 1];1(2):109. Available from: [/pmc/articles/PMC248462/](#)
54. Choi S-E, Lee Y-J, Jang H-J, Lee K-W, Kim Y-S, Jun H-S, et al. A chemical chaperone 4-PBA ameliorates palmitate-induced inhibition of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). 2008;
55. JJ W, KF L, F H. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jul 12];22(12):3855–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29949179/>
56. Eide S, Feng ZP. Doxorubicin chemotherapy-induced “chemo-brain”: Meta-analysis. *Eur J Pharmacol*. 2020 Aug 15;881:173078.
57. SJ W, GM B, HM A. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* [Internet]. 2011 Feb [cited 2021 Sep 2];47(2):125–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21082279/>
58. Feng J, Xu W, Guo R, Wu K, Chen J, Mo L, et al. Exogenous Hydrogen Sulfide Protects against Doxorubicin-Induced Inflammation and Cytotoxicity by Inhibiting p38MAPK/ NFκB Pathway in H9c2 Cardiac Cells Key Words Hydrogen sulfide • Doxorubicin • Cardiotoxicity • Inflammation • p38 mitogen-activated protei. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2013;32:1668–80. Available from: www.karger.com/cpb1668www.karger.com/cpb
59. Döhrmann M, Schorr A, Hülsenbeck J, Rasmussen TL, Issinger OG, Fritz G. Comparative analysis of stress responses of H9c2 rat cardiomyoblasts following treatment with doxorubicin and tBOOH. *Exp Cell Res*. 2012 Apr 1;318(6):779–88.
60. Hanf A, Oelze M, Manea A, Li H, Münzel T, Daiber A. The anti-cancer drug doxorubicin induces substantial epigenetic changes in cultured cardiomyocytes. *Chem Biol Interact*. 2019 Nov 1;313:108834.
61. Bernuzzi F, Recalcati S, Alberghini A, Cairo G. Reactive oxygen species-independent apoptosis in doxorubicin-treated H9c2 cardiomyocytes: Role for heme oxygenase-1 down-modulation. *Chem Biol Interact*. 2009 Jan 15;177(1):12–20.
62. Lou Y, Wang Z, Xu Y, Zhou P, Cao J, Li Y, et al. Resveratrol prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in H9c2 cells through the inhibition of endoplasmic reticulum stress and the activation of the Sirt1 pathway. *Int J Mol Med* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2021 Sep 2];36(3):873–80. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2015.2291/abstract>
63. Lai T, Shen Y, Chen C, Huang B, Deng T, Zhao Z, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Eur J Pharmacol*. 2021 Oct 5;908:174353.
64. de Seabra Rodrigues Dias IR, Lo HH, Zhang K, Law BYK, Nasim AA, Chung SK, et al. Potential therapeutic compounds from traditional Chinese medicine

targeting endoplasmic reticulum stress to alleviate rheumatoid arthritis.
Pharmacol Res. 2021 Aug 1;170:105696.