

**Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería**

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería



**Evaluación del Uso de (-)-Epicatequina en la Prevención de la Cardiotoxicidad
Causada por Doxorrubicina en Ratones**

**Tesis que presenta
QFB Mariana Martínez Olvera**

**Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

Tijuana, Baja California

Noviembre 2016

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 183

Tijuana, B. C., a 11 de octubre de 2016

C. Mariana Martínez Olvera
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Diego Romero Pérez

Quien será la responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema Evaluación del Uso de (-)-Epicatequina en la Prevención de la
Cardiotoxicidad Causada por Doxorrubicina en Ratones.

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCION
- II.- MARCO TEORICO
- III.- MATERIALES Y METODOS
- IV.- RESULTADOS
- V.- DISCUSION Y RESULTADOS
- VI.- CONCLUSIONES

Dr. José Luis González Vázquez
Secretario

UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

Dr. Diego Romero Pérez
Director de Tesis

Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Dedicatoria

El presente trabajo tiene una especial dedicatoria a mis padres, que me han apoyado toda mi vida y que han sido la mejor guía y motivación, sin quienes hubiera resultado muy difícil estudiar un Posgrado.

Lo dedico también a toda mi familia y amigos que estuvieron acompañándome a lo largo de este proceso.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por permitirme llegar al término de este proyecto.

A mis padres y familia por brindarme su apoyo.

A mi tutor por guiarme en todas las actividades experimentales y académicas que formaron parte de este Posgrado.

A los Doctores Francisco Villarreal y Guillermo Ceballos por su disposición para apoyarnos incondicionalmente en el proceso experimental y de formación académica, y sin quienes este proyecto no hubiera sido posible.

Quiero agradecer especialmente a mi compañera QFB Danaé Correa que realizó un excelente trabajo de equipo ayudando de manera importante a la realización de este proyecto.

Al Doctor Israel Ramírez y la Maestra Viviana Sarmiento por su participación en el proyecto y su contribución con mi formación académica,

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por permitirme ser alumna del Programa de Posgrado Maestría en Ciencias e Ingeniería, y a la Facultad de Medicina y Psicología de esta misma Universidad por permitirnos utilizar sus instalaciones.

A la University of California San Diego por permitirnos utilizar sus instalaciones y al Instituto Politécnico Nacional por su colaboración.

A los Doctores y Maestros que me impartieron clases durante mi estudio de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca de tiempo completo para poder realizar este proyecto.

Resumen

La Doxorubicina (DOX) es un antibiótico de la familia de las antraciclinas utilizado como agente de quimioterapia en niños y adultos, que por su actividad antitumoral es administrado en el tratamiento de distintas neoplasias malignas. Las antraciclinas incluyendo DOX, representan unos de los agentes de quimioterapia con mayor incidencia de cardiotoxicidad entre los pacientes que las reciben como parte de su tratamiento. Los flavonoides son sustancias de origen vegetal que muestran propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales y han sido propuestos como potenciales agentes protectores de los efectos tóxicos inducidos por DOX. En este proyecto desarrollamos un modelo de cardiotoxicidad en ratones para evaluar los efectos cardioprotectores de la administración previa y simultánea de (-)-Epicatequina durante el tratamiento con este agente.

Ratones CD1 machos de 6 semanas fueron tratados con DOX 5 mg/kg los días 5, 8, 11, 14 y 17 del tratamiento (dosis acumulada de 25 mg/kg) o solución salina vía intraperitoneal y recibieron Epi en una dosis de 1 mg/kg por día o agua destilada vía oral, para obtener 4 grupos (Ctrl, n=10; Epi, n=9; DOX, n=10; DOX+Epi, n=10) tratados durante 21 días.

Se determinó en miocardio los niveles de expresión de las proteínas SOD2 y CAT (sistema de defensa antioxidante), así como de las proteínas mitofilina y complejo V (proteínas mitocondriales). Las proteínas carboniladas en plasma también fueron determinadas.

Los resultados de este proyecto no permitieron observar un efecto de Epi en la concentración de 1 mg/kg por día debido a que el modelo de cardiotoxicidad no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos para los marcadores de daño a miocardio seleccionados.

Contenido

Agradecimientos	ii
Resumen	iii
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas.....	7
Índice de abreviaturas.....	8
1. Introducción	10
1.1 Planteamiento del Problema.....	12
1.2 Justificación.....	13
1.3 Razonamiento del proyecto	14
1.4 Pregunta de Investigación	14
1.5 Hipótesis.....	14
1.6 Objetivo	14
1.6.1 Objetivo General	14
1.6.2 Objetivos específicos	14
2. Marco Teórico.....	16
2.1 Definición del cáncer y su incidencia	16
2.2 Quimioterapia	16
2.3 Antraciclinas	17
2.4 Doxorrubicina	18
2.4.1 Historia y caracterización de Doxorrubicina.....	18
2.4.2 Administración y metabolismo de Doxorrubicina	19
2.4.3 Mecanismo de acción de Doxorrubicina como agente quimioterapéutico.....	19
2.4.4 Límites en el uso clínico de Doxorrubicina	20
2.5 Cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina.....	20
2.5.1 Clasificación de la Cardiotoxicidad inducida por las Antraciclinas	20
2.5.2 Manifestaciones clínicas de la cardiotoxicidad inducida por las Antraciclinas.....	21
2.5.3 Cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina dependiente de la dosis	22
2.5.4 Monitoreo de la cardiotoxicidad durante el tratamiento con Doxorrubicina	23
2.5.5 Análisis microscópico del daño en miocardio inducido por Doxorrubicina	24
2.5.6 Factores de riesgo para el desarrollo de cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina	24

2.5.7 Tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina.....	24
2.5.8 Patofisiología de la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina	25
2.6 Mecanismo molecular de la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina.....	25
2.6.1 Hipótesis de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno inducida por Doxorubicina.....	25
2.6.2 Hipótesis de Daño Mitocondrial inducido por Doxorubicina	29
2.6.3 Posibles vías de muerte celular inducidas por Doxorubicina.....	31
2.7 Estrategias para prevenir la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina.....	32
2.8 Flavonoides	34
2.8.1 Historia y estructura química de los Flavonoides.....	34
2.8.2 Clasificación de los Flavonoides	34
2.8.3 Funciones de los Flavonoides en las plantas	35
2.8.4 Fuentes de Flavonoides y su ingesta en la dieta	35
2.8.5 Beneficios a la salud por el consumo de Flavonoides	35
2.9 Flavonoides como estrategia contra la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina	36
2.10 Cacao como fuente importante de Flavonoides	37
2.10.1 Beneficios a la salud por consumo de productos derivados del Cacao	38
2.10.2 Flavonoides en la mediación de los beneficios a la salud por el consumo de productos derivados del Cacao.....	39
2.10.3 Flavanoles del Cacao.....	39
2.11 (-)-Epicatequina	40
2.11.1 Beneficios de (-)-Epicatequina en el Sistema Cardiovascular.....	41
2.11.2 Beneficios de (-)-Epicatequina en la mitocondria.....	42
2.11.3 Beneficios de (-)-Epicatequina en el Sistema Antioxidante Celular.....	43
3. Materiales y Métodos	44
3.1 Tratamiento de los Animales.	44
3.2 Recolección de muestras	44
3.3 Anticuerpos	44
3.4 Homogenización de tejidos y obtención de proteína total	45
3.5 Método de Bradford.....	45
3.6 Western Blot.....	45
3.7 Determinación de Proteína Carbonilada	46
3.8 Análisis Resultados.	47
4. Resultados.....	48

4.1 Tasa de Supervivencia	48
4.2 Aspecto y comportamiento de los ratones	48
4.3 Expresión de GAPDH en Miocardio.....	50
4.4 Moduladores de la Defensa Antioxidante en Miocardio: SOD2 y Catalasa	51
4.5 Proteínas Mitocondriales en Miocardio: Mitofilina y Complejo V	54
4.6 Proteínas carboniladas en plasma.....	56
5. Discusión de Resultados.....	57
5.1 Supervivencia, comportamiento, peso corporal y peso del corazón de los ratones.....	57
5.2 Moduladores del Sistema Antioxidante en Miocardio: SOD2 y Catalasa	58
5.3 Proteínas Mitocondriales en Miocardio: Mitofilina y Complejo V	60
5.4 Carbonilación de Proteínas en plasma	61
5.5 Evaluación del modelo de cardiotoxicidad inducida por DOX	62
5.6 Cardioprotección de (-)-Epicatequina en la cardiotoxicidad inducida por DOX	62
6. Conclusiones	65
7. Referencias.....	66

Índice de figuras

Figura	Página
1. Estructura química de la Daunorrubicina	18
2. Estructura química de la Doxorrubicina	19
3. Ciclo de óxido reducción, formación del complejo DOX-Fe y producción de especies reactivas de oxígeno mediado por Doxorrubicina	29
4. Estructura química general de los flavonoides	34
5. Estructura química de a) (+)-Catequina y b) (-)-Epicatequina	40
6. Peso corporal correspondiente a cada día del tratamiento	49
7. Porcentaje de ganancia de peso corporal durante el tratamiento	50
8. Expresión de GAPDH	51
9. Expresión de SOD2 y CAT	52
10. Expresión de SOD2 y CAT normalizada	53
11. Expresión de mitofilina y complejo V	54
12. Expresión de mitofilina y complejo V normalizada	55
13. Proteínas carboniladas	56

Índice de tablas

Tabla	Página
1. Pesos corporales y de corazón	49
2. Expresión de GAPDH	50
3. Expresión de SOD2 y CAT	52
4. Expresión de SOD2 y CAT normalizada	53
5. Expresión de mitofilina y complejo V	55
6. Expresión de mitofilina y complejo V normalizada	55
7. Proteínas carboniladas	56

Índice de abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza de una Vía
ATP	Adenosín Trifosfato
C-	Carbón
CAT	Catalasa
Crtl	Control
DNP	Dinitrofenilo
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DOX	Doxorrubicina
DOX + Epi	Doxorrubicina mas (-)-Epicatequina
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EEM	Error Estandar de la Media
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa endotelial
Epi	(-)-Epicatequina
et al	Y otros
FDA	Food and Drug Administration
FEVI	Fracción de Eyección Ventricular Izquierda
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato
h	Horas
IC	Insuficiencia Cardiaca
IGEPAL	Octilfenoxi poli(etileneoxi)etanol
kDa	Kilodaltons
kg	Kilogramos
L	Litros
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
n	Tamaño de la muestra
Na ₃ VO ₄	Orto vanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NaF	Fluoruro de sodio
NO	Óxido Nítrico
NOS	Oxido Nítrico Sintasa
P	Valor p
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
sGC	Guanilato ciclasa soluble
SOD	Superóxido Dismutasa
SOD1	Superóxido Dismutasa 1
SOD2	Superóxido Dismutasa 2

SOD3
TBST
TCA
UI
μg
μL
μm

Superóxido Dismutasa 3
Tris Buffer Saline con Tween 20
Acido Tricloroacetico
Unidades internacionales
Microgramos
Microgramos
Micrómetros

1. Introducción

La Doxorubicina (DOX) es un antibiótico de la familia de las antraciclinas utilizado como agente de quimioterapia en niños y adultos que gracias a su actividad antitumoral es administrado en el tratamiento de distintas neoplasias malignas incluyendo tumores sólidos, leucemias, linfomas y cáncer de mama (Yanti Octavia, 2012).

Desde su aprobación como agente antitumoral, DOX ha contribuido en el incremento de la tasa de supervivencia de la población con cáncer, principalmente la población pediátrica, donde se observó un incremento en la supervivencia de 5 años o más de un 30% durante los años sesentas a un 70% para principios del 2000 (Wouters, 2005).

Los buenos resultados del uso de DOX en el tratamiento contra el cáncer, han sido afectados por el riesgo de inducir cardiotoxicidad en los pacientes, lo que representa uno de los efectos adversos más importantes reportado durante su uso clínico (Shashi Raj, 2014). Las manifestaciones más severas de esta cardiotoxicidad incluyen la cardiomiopatía dilatada y la falla cardíaca; una vez que los pacientes desarrollan estos problemas de cardiotoxicidad es difícil ofrecer un tratamiento efectivo que les asegure calidad de vida, y su salud se ve afectada con el paso del tiempo debido a que se trata de padecimientos crónicos.

Es por esto que la búsqueda de estrategias que disminuyan la cardiotoxicidad inducida por DOX ha sido tema de gran interés. Pese a los esfuerzos realizados, ninguna solución definitiva ha sido encontrada. Parte del problema radica en que no se ha logrado comprender completamente el mecanismo de acción antitumoral de DOX ni el mecanismo por el cual provoca cardiotoxicidad. Sin embargo, la formación de especies reactivas y el daño mitocondrial inducidos por DOX, representan los mecanismos más aceptados para explicar su cardiotoxicidad.

En base a estas hipótesis, el uso de compuestos naturales ha sido considerado como estrategia de cardioprotección durante el tratamiento con DOX, ya que algunos de estos compuestos muestran propiedades benéficas en el sistema antioxidante celular y en la mitocondria. Como ejemplo se encuentran los flavonoides, los cuales son

sustancias de origen vegetal que muestran propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (Shashank Kumar, 2013) y han sido propuestos como potenciales agentes protectores de los efectos tóxicos inducidos por DOX (Mohamed, 2011).

En este proyecto evaluamos la actividad cardioprotectora del flavonoide derivado del cacao (-)-Epicatequina con el propósito de aportar información al desarrollo de estrategias para la protección de la cardiotoxicidad inducida por DOX en los pacientes.

1.1 Planteamiento del Problema

Un número cada vez más grande de sobrevivientes del cáncer permitió identificar problemas cardiovasculares desarrollados como consecuencia de la quimioterapia, lo que hizo necesario el surgimiento de la cardiooncología, la cual tiene el propósito de estudiar la prevención, diagnóstico y tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por la terapia empleada contra el cáncer.

Un metaanálisis realizado por Marzia Lotrionte, et al. reportó una incidencia del 17.9% de cardiotoxicidad subclínica y una incidencia del 6.3% de cardiotoxicidad con manifestaciones clínicas en pacientes 9 años después de haber concluido la quimioterapia (Lotrionte, 2013).

Las enfermedades cardíacas representan un serio problema, ya que comprometen la calidad de vida de los pacientes incapacitándolos para realizar sus actividades normales, afectando directamente su situación en la casa y el trabajo. Los pacientes con problemas cardíacos no sólo disminuyen su desempeño laboral, sino que además representan un gasto para el sector de Salud Pública debido a la atención médica requerida (Serna, 2010).

Por su parte las antraciclinas, incluyendo DOX, forman parte de los agentes de quimioterapia con mayor incidencia de cardiotoxicidad contribuyendo a este problema de salud.

En un estudio se muestra que más del 65% de los pacientes pediátricos tratados con DOX desarrollan alteraciones en las mediciones de contractibilidad del ventrículo izquierdo empleando técnicas de ecocardiografía (Volkova, 2011).

En nuestro país sólo se han realizado algunos trabajos estadísticos en relación a la cardiotoxicidad inducida por las antraciclinas, y fue reportado un 3% de incidencia de daño al miocardio por uso de antraciclinas en la población pediátrica en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (Elsy Navarrete-Rodriguez, 2013).

1.2 Justificación

El uso clínico de las antraciclinas, particularmente DOX, no ha podido ser sustituido en el tratamiento de diferentes neoplasias malignas, que incluyen el cáncer de mama y el cáncer infantil, debido a su eficaz actividad antineoplásica (Carvalho C, 2009).

Sin embargo, existen efectos adversos implicados en el uso de DOX que limitan su administración, siendo la cardiotoxicidad considerada el efecto adverso crónico más importante atribuido a este agente antineoplásico (Giorgio Minotti, 2004).

Hasta el momento no existe una estrategia que elimine el riesgo de desarrollar cardiotoxicidad inducida por DOX en forma definitiva, lo que explica la necesidad de continuar realizando investigaciones en torno a este tema.

Desarrollamos este proyecto con la finalidad de aportar información para generar nuevas estrategias cardioprotectoras que puedan utilizarse en pacientes tratados con DOX.

1.3 Razonamiento del proyecto

Puesto que las hipótesis más aceptadas para explicar la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina son la generación de especies reactivas de oxígeno y el daño mitocondrial, consideramos que la (-)-Epicatequina es un agente cardioprotector potencial al mostrar efectos positivos en el sistema de defensa antioxidante y en la mitocondria en los cardiomiocitos en estudios previos (Aldo Moreno-Ulloa, 2013) (Aldo Moreno-Ulloa, 2014).

1.4 Pregunta de Investigación

¿La administración previa y simultánea (-)-Epicatequina será capaz de disminuir o evitar la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina en ratones tratados con este agente antitumoral?.

1.5 Hipótesis

La administración previa y simultánea de (-)-Epicatequina en ratones es capaz de disminuir el daño cardíaco derivado del tratamiento con Doxorubicina.

1.6 Objetivo

1.6.1 Objetivo General

Evaluar los efectos de la administración previa y simultánea de (-)-Epicatequina en el corazón de ratones tratados con Doxorubicina.

1.6.2 Objetivos específicos

Evaluar los efectos protectores de (-)-Epicatequina sobre los ratones tratados con Doxorubicina.

- Determinación el peso corporal y el comportamiento de los ratones.

Evaluar los efectos protectores de (-)-Epicatequina en la estructura del corazón de los ratones tratados con Doxorubicina.

- Determinación del peso del corazón.

Evaluar los efectos protectores de (-)-Epicatequina en la estructura y función mitocondrial de miocardio de ratones tratados con Doxorubicina.

- Determinación de los niveles proteicos de mitofilina y complejo V.

Evaluar los efectos protectores de (-)-Epicatequina en el sistema de defensa antioxidante de los ratones tratados con Doxorubicina.

- Determinación de los niveles proteicos de catalasa y superóxido dismutasa 2 en miocardio.
- Determinación de niveles de proteína carbonilada en muestras de plasma.

2. Marco Teórico

2.1 Definición del cáncer y su incidencia

El cáncer puede definirse como un grupo de enfermedades las cuales tienen manifestaciones diversas de acuerdo al tipo de tejido afectado. En el inicio del cáncer, un pequeño grupo de células sufre modificaciones en su material genético, lo que puede dar lugar a la activación de oncogenes, la inhibición de tumores supresores de tumor y/o la inhibición de genes reparadores de ADN, permitiéndoles un crecimiento y reproducción sin control (National Cancer Institute, 2015). Además de estas características, las células de cáncer siguen alterando su material genético llegando a adquirir nuevas habilidades que les confieren ventajas frente a las células normales, lo que incrementa su proliferación, incluso en condiciones poco favorables. Estas características reciben el nombre de marcas del cáncer e incluyen la evasión de señales celulares supresoras, evasión de la apoptosis, inmortalidad, angiogénesis e invasión a otros tejidos (metástasis) (Douglas Hanahan, 2011).

El cáncer se ha convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población de todos los países. En el año 2012, aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8 millones de muertes por cáncer fueron reportados a nivel mundial. En general, los cinco tipos más comunes de cáncer son el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata y cáncer de estómago. En población de niños menores de 15 años, las neoplasias hematológicas, como la leucemia linfocítica, representan tipo de cáncer más frecuente (Organization, 2014).

2.2 Quimioterapia

La cirugía, la radiación y la quimioterapia representan las estrategias más utilizadas en el tratamiento del cáncer (National Cancer Institute, 2015). Sin embargo, el empleo de la cirugía y la radiación se ve limitado por el hecho de que no todos los tumores pueden ser extirpados con cirugía (no todos los tumores están bien delimitados y/o encapsulados) y a que la radiación en sí misma es carcinogénica, favoreciendo el surgimiento de neoplasias secundarias. Debido a esto, la quimioterapia es utilizada en el tratamiento de la mayoría de los pacientes con cáncer. La quimioterapia consiste en el empleo de fármacos (agentes quimioterapéuticos) con la capacidad de detener o

frenar el crecimiento de células cancerígenas y es utilizada en diferentes tipos de cáncer (National Cancer Institute, 2015).

Los agentes quimioterapéuticos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción y estructura química, e incluyen principalmente a los agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos, inhibidores de la Topoisomerasa, inhibidores mitóticos y corticoesteroides. Estas moléculas afectan principalmente a células con una alta tasa de reproducción, una característica importante de las células de cáncer, sin embargo las células normales no son excluidas de este daño. Por tanto, los efectos adversos de la quimioterapia son prácticamente inevitables y son una causa importante para su limitación terapéutica (Biplob Bhattacharya, 2015).

2.3 Antraciclinas

Las Antraciclinas son productos naturales que forman parte del grupo de los policétidos aromáticos. La mayoría de ellas fueron aisladas de bacterias pertenecientes al Orden *Streptocetales*. Las Antraciclinas fueron reconocidas como antibióticos desde 1939, pero su caracterización química adquirió relevancia cuando se descubrió su actividad antitumoral a principios de los años sesenta (Fotso, 2008) (Azra Rabbani, 2005).

Las Antraciclinas son moléculas compuestas por una parte aglicona, que consiste en una estructura tetracíclica con dos unidades de benceno (Anillo A y C). El patrón de sustitución del anillo A es responsable de muchas de las propiedades de estas moléculas, ya que está unido a un 2,6-dideoxi monosacárido por medio de un enlace glucosídico, muy importante en la actividad biológica de las mismas (Giorgio Minotti, 2004).

La Daunorrubicina fue el primer miembro de esta clase de compuestos en ser descubierto y fue aislada a partir de un pigmento producido por la bacteria *Streptomyces peucetius*, durante un trabajo realizado por el grupo de Brockmann en 1963 (Ho LK, 2016). Su descubrimiento fue el inicio de la búsqueda de nuevas antraciclinas que fueran superiores en términos de actividad antitumoral; sin embargo, sólo algunos análogos han sido aprobados para usarse clínicamente y entre ellos se encuentran la doxorubicina, idarrubicina y epirubicina (Giorgio Minotti, 2004) Las

antraciclinas son utilizadas ampliamente en el tratamiento de linfomas, sarcomas, cáncer de mama y leucemia pediátrica (Pimprapa Vejpongsa, 2014).

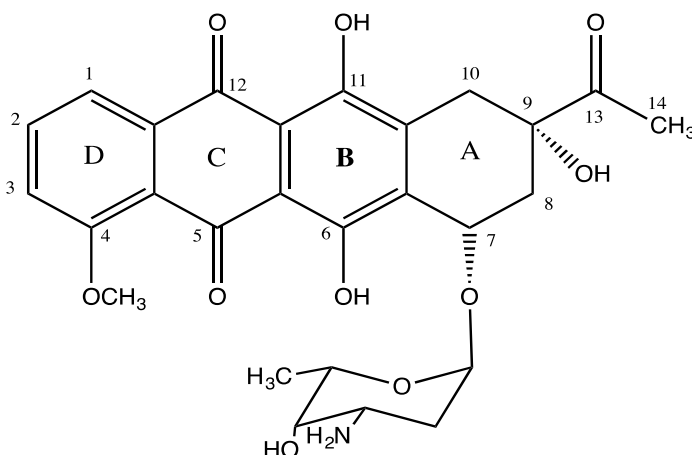


Figura 1. Estructura química de la Daunorrubicina

2.4 Doxorubicina

2.4.1 Historia y caracterización de Doxorubicina

La Doxorubicina (DOX), también conocida como Adriamicina, es una antraciclina de primera generación y representa uno de los agentes quimioterapéuticos más potentes que han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA). Aislada por primera vez a partir de una variante del microorganismo *Streptomyces peucetius* denominada *caesius* (por su color azul verde) por el grupo de Di Marco y Arcamone en el año de 1968 (Weiss RB, 1986) (Bhave, 2014) (Carvalho C, 2009).

DOX consiste químicamente en la estructura aglicona descrita previamente, con grupos quinona-hidroquinona adyacentes en los anillos B y C, un grupo metoxi en el C-4 del anillo D, una cadena lateral de dos carbonos en el C-9 del anillo A, un grupo carbonilo en el C-13 y un grupo alcohol en el C-14 de la cadena lateral. El monosacárido, unido mediante un enlace glucosídico al C-7 del anillo A, es una molécula de 3-amino-2,3,6-trideoxi-L-fucasil denominada daunosamina. La única diferencia entre DOX y Daunorrubicina es el grupo alcohol en la posición C-14 que se encuentra en la molécula de DOX (Giorgio Minotti, 2004).

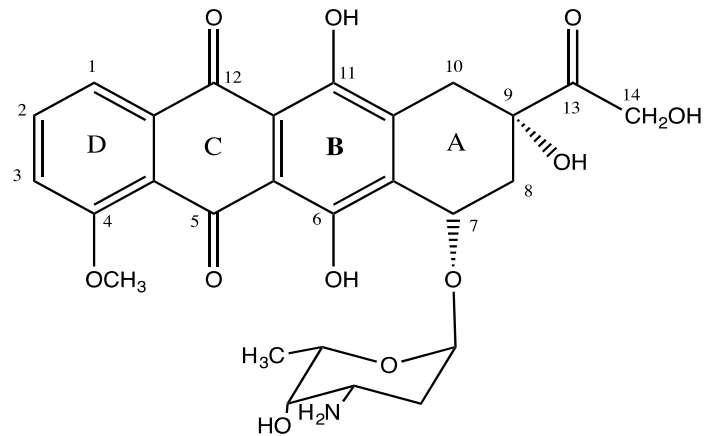


Figura 2. Estructura química de la Doxorubicina

2.4.2 Administración y metabolismo de Doxorubicina

La forma más común en que DOX se administra es como infusión intravenosa en una dosis de 40 a 75 mg/m² cada tres o cuatro semanas (Wallace, 2003). DOX se une a las proteínas plasmáticas y se caracteriza por penetrar rápida y efectivamente en los tejidos (gran volumen de distribución). Dentro de la célula, DOX se concentra en el núcleo debido a su carácter lipofílico.

A nivel sistémico DOX se acumula mayormente en el hígado donde, junto con su principal metabolito Doxorubicinol, sufre modificaciones químicas a través de las enzimas carbonil reductasas y del citocromo P-450 para ser eliminada por la bilis, su principal vía de excreción. DOX tiene un tiempo de vida media aproximada de 20 a 25 horas (Oktay Tacar, 2013) (Yik Hoe Ngan, 2016).

2.4.3 Mecanismo de acción de Doxorubicina como agente quimioterapéutico

Desde su aprobación por la FDA en 1974 (Weiss RB, 1986), DOX ha sido uno de los agentes quimioterapéuticos más potentes para el tratamiento de niños y adultos contra una gran variedad de neoplasias malignas, incluyendo cáncer de mama y tumores sólidos infantiles (Giorgio Minotti, 2004).

El mecanismo de acción de DOX como agente antitumoral no está completamente definido, pero han surgido propuestas que incluyen la intercalación en el ADN, la interacción con las membranas de organelos como núcleo y mitocondrias, la inhibición de la enzima Topoisomerasa II (que favorece la inhibición de la síntesis de ácidos

nucleicos) y la generación de radicales libres en las células como posibles mecanismos de citotoxicidad (Donato Mele, 2016).

2.4.4 Límites en el uso clínico de Doxorrubicina

Durante las pruebas clínicas de fase II y III en los años setentas, el uso de DOX comenzó a mostrar efectos secundarios como son vómito y náuseas, problemas gastrointestinales, alopecia, mielosupresión y problemas en el sistema nervioso (alucinaciones y mareo). La severidad de estos efectos se ha relacionado tanto con la dosis de DOX administrada como con la resistencia del paciente, ya que, como se mencionó previamente, DOX no actúa específicamente en células tumorales (Oktay Tacar, 2013).

Además de estos efectos adversos agudos, DOX puede llegar a provocar una cardiotoxicidad aguda o crónica en los pacientes así como toxicidad hepatorenal. Los altos niveles de toxicidad no específica sobre tejidos y órganos, limitan el uso clínico de DOX y explica su estrecha ventana terapéutica (Fan Yang, 2016).

2.5 Cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina

La cardiotoxicidad representa el efecto adverso más importante implicado con el uso de las antraciclinas (Axel Schlit, 2014). Desde que DOX fue aprobada como agente quimioterapéutico, la toxicidad cardíaca ha sido observada y reportada (Antonella De Angelis, 2016) .

2.5.1 Clasificación de la Cardiotoxicidad inducida por las Antraciclinas

De acuerdo con el tiempo de manifestación, tres tipos de de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas han sido reconocidas:

1. Aguda, la cual aparece después de una dosis única o después de un ciclo de tratamiento, con el inicio de las manifestaciones clínicas dos semanas después de haber comenzado el tratamiento. Normalmente las manifestaciones son reversibles con la suspensión del tratamiento.
2. Manifestación crónica temprana, la cual se desarrolla en un periodo de un año. Esta es la forma de cardiotoxicidad más frecuente y clínicamente relevante, y se

presenta comúnmente como cardiomiopatía dilatada e hipocinética que desencadena en insuficiencia cardiaca (IC).

3. Manifestación crónica tardía, desarrollada años después de haber concluido la quimioterapia. El paciente pasa un periodo de latencia en el cual la función cardiaca parece normal y se muestra asintomático, pero años después del tratamiento comienza a manifestar una disfunción del ventrículo izquierdo progresiva llevando a una IC irreversible. (Chengqun Huang, 2010) (Daniela Cardinale, 2015).

2.5.2 Manifestaciones clínicas de la cardiotoxicidad inducida por las Antraciclinas

Las manifestaciones clínicas del daño al músculo cardiaco provocado por el uso de antraciclinas son principalmente anomalías en el ecocardiograma en paciente asintomático, hipotensión moderada, arritmias cardiacas, disfunción de la conductividad eléctrica, miocarditis, pericarditis, infarto del miocardio agudo, IC y cardiomiopatía crónica dilatada o restrictiva (Sadurska, 2015), siendo la IC y la cardiomiopatía dilatada las manifestaciones más graves de cardiotoxicidad (Delgado-Roche L, 2014) (Schlitt A, 2014).

2.5.2.1 Cardiomiopatía Dilatada Crónica

La cardiomiopatía dilatada, es una de las causas más comunes de IC, y se caracteriza por un alargamiento del corazón que afecta todas sus partes, especialmente cuando el padecimiento se encuentra más avanzado. La IC está relacionada con una disminución en la función del ventrículo izquierdo o una reducción de la función sistólica, y pese a que en un inicio la disminución en la función puede ser mínima, el tejido ya se encuentra dilatado (Elizabeth M. McNally, 2013).

Debido a que la cardiomiopatía dilatada lleva a un alargamiento del ventrículo izquierdo afectando su contractibilidad, la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) disminuida es un factor pronóstico importante del estado de este padecimiento (Ankur Gulati, 2013).

La FEVI se define como el volumen de eyección (volumen de sangre en el ventrículo al final de la diástole menos volumen al final de la sístole) dividido entre el volumen de

sangre al final de la diástole. En pacientes con una contracción y capacidad de vaciado del ventrículo izquierdo reducida, el volumen de sangre de eyección se puede mantener a expensas de un incremento en el volumen al final de la diástole; es decir el corazón tiene que bombear una menor parte de un volumen más grande de sangre. Pero conforme el padecimiento progresa el volumen al final de la sístole también incrementa reduciendo el valor de volumen eyección (John J.V. Chairperson, 2012).

2.5.2.2 Insuficiencia Cardíaca

La IC puede ser definida como una anormalidad de la estructura o función cardíaca llevando a que el corazón sea incapaz de distribuir oxígeno en una frecuencia adecuada para los requerimientos de los tejidos. La IC es definida clínicamente como un síndrome en el cual comúnmente los pacientes presentan síntomas como disnea, hinchazón de los tobillos y fatiga, y signos como presión yugular venosa elevada, pulmones crepitantes y un tercer sonido cardíaco. Sin embargo, estos signos y síntomas son poco específicos y tienen un valor diagnóstico limitado. La FEVI también representa un factor pronóstico importante en la IC (John J.V. Chairperson, 2012).

2.5.3 Cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina dependiente de la dosis

Los resultados del análisis retrospectivo realizado por Von Hoff et al en 1979 mostraron que existe un incremento en el riesgo de desarrollar cardiotoxicidad relacionado al aumento de la dosis total de antraciclina administrada a los pacientes: el porcentaje estimado de pacientes que desarrollan IC a una dosis acumulada de 400mg/m² de DOX fue del 3%, incrementando al 7% y 18% para las dosis de 550 mg/m² y 700 mg/m² respectivamente.

Este y otros estudios dieron pauta a determinar un límite máximo de 550 mg/m² para la dosis acumulada de antraciclinas que debía ser administrada en los pacientes (Sandra M Swain, 2013) (Pimprapa Vejpongsa, 2014).

En un estudio realizado en 2003 por Swain et al se volvió a evaluar la relación entre la dosis acumulada de antraciclinas y el riesgo de desarrollar cardiotoxicidad y se encontró que en los estudios anteriores los resultados habían sido subestimados, mostrando que el porcentaje de pacientes con IC inducida por DOX es del 5, 26 y 48%

para las dosis acumuladas de 400, 550 y 700 mg/m² respectivamente. Esto ha llevado a una disminución en el límite máximo para la dosis de anteciclina total administrada de 550 a entre 400 y 450 mg/m² (Pimprapa Vejpongsa, 2014) (Swain SM, 2003).

2.5.4 Monitoreo de la cardiotoxicidad durante el tratamiento con Doxorubicina

El Colegio Americano de Cardiología/Asociación Americana del Corazón ha recomendado una revisión y monitoreo periódico como práctica de rutina a cualquier paciente que esté recibiendo un agente quimioterapéutico cardiotoxico (Ronny S. Jiji, 2012).

La guía actual para el monitoreo de pacientes que están recibiendo antraciclinas fue propuesta por Schwartz et al en 1987 y recomienda obtener la fracción de eyección basal por imagen de radionúclidos en equilibrio y otros estudios de imagen antes de la administración de cualquier dosis adicional de antraciclina y especifica los criterios para discontinuar el tratamiento basados en el cambio de la función del ventrículo izquierdo del corazón.

Para mediciones seguidas de la FEVI, la cuantificación por angiocardiografía con radionúclidos en reposo es más reproducible que una prueba visual por ecocardiograma, por lo que ha sido considerada el estándar de oro en el monitoreo de la cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia. Sin embargo, el ecocardiograma provee de información adicional como es la detección de problemas en los parámetros de contracción (Ronny S. Jiji, 2012). Desafortunadamente la detección de problemas en la FEVI por herramientas de imagen sólo se puede hacer cuando existe un daño importante en el miocardio.

La biopsia de miocardio también ha sido utilizada como estándar en el diagnóstico de cardiotoxicidad inducida por la quimioterapia, pero tiene la desventaja de ser un método invasivo. (F. J. F. Broeyer, 2008).

Debido a esta baja sensibilidad de las técnicas de imagen en la detección temprana de disfunción de miocardio y al método invasivo que representa la biopsia de miocardio, existe un profundo interés en encontrar nuevas herramientas de diagnóstico por lo que están evaluando marcadores bioquímicos de daño en miocardio y disfunción ventricular

como las troponinas y péptido natriurético para su empleo en el diagnóstico de cardiotoxicidad inducida por antraciclinas (Michela Salvatici, 2015). Hasta el momento no hay resultados concluyentes.

2.5.5 Análisis microscópico del daño en miocardio inducido por Doxorrubicina

Los análisis histológicos en humanos y en animales que han desarrollado cardiotoxicidad inducida por DOX incluyen vacuolización citoplasmática, pérdida de las fibrillas musculares, desorganización del retículo sarcoplásmico, alteraciones en núcleo y mitocondrias. (Olli J. Arola, 2000) (Lefrak Edward, 1973).

2.5.6 Factores de riesgo para el desarrollo de cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina

Como se mencionó anteriormente, la probabilidad de desarrollar una cardiopatía debido a la administración de antraciclinas está altamente relacionada a la dosis, representando el factor más importante a considerar durante su administración (Helena J. van der Pal, 2012). Sin embargo, la cardiotoxicidad inducida por DOX se puede presentar incluso a dosis acumuladas bajas, y se piensa que es debido a una mayor susceptibilidad individual (Yanti Octavia, 2012).

Diferentes estudios se han realizado para poder identificar aquellos factores significativos en el desarrollo de cardiotoxicidad. Un meta-análisis realizado en el año 2013 que comprendía 18 estudios independientes, mostró que la radiación pectoral, el pertenecer a una etnia africana, una edad corta o avanzada, un peso corporal bajo o alto y otras comorbilidades representan factores de riesgo significativos para el desarrollo de cardiotoxicidad inducida por las antraciclinas. (Marzia Lotrionte, 2103) (Bhave, 2014). Además, otros estudios sugieren que el sexo femenino tiene una mayor tendencia a desarrollar cardiotoxicidad durante su tratamiento con antraciclinas (Lipshultz SE, 1995).

2.5.7 Tratamiento de la cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina

No existe un tratamiento específico para la cardiotoxicidad inducida por DOX. Los pacientes con cardiomiopatía inducida por la administración de DOX generalmente son tratados con β -bloqueadores e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina,

los cuales son fármacos incluidos en tratamiento para la IC (Giorgio Minotti, 2004) (Carine E. Hamo, 2016). El trasplante de corazón sigue representando una opción para los casos más severos.

2.5.8 Patofisiología de la cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina

El daño que puede generarse por la administración de antraciclinas en el sistema cardiovascular, se ha caracterizado por la pérdida directa de los cardiomiocitos, la disminución en la contractibilidad del tejido cardíaco y el daño de la microvasculatura; además se piensa que existe daño en las células madre cardíacas y un incremento de fibroblastos en el tejido, lo que hace más difícil que el corazón se recupere, perdiendo su capacidad de contracción (Chen MH, 2011).

2.6 Mecanismo molecular de la cardiotoxicidad inducida por Doxorrubicina

El mecanismo molecular por el cual DOX induce cardiotoxicidad no ha podido ser definido hasta el momento, lo que lo ha convertido en un tema controversial de investigación a lo largo de los años. Diferentes modelos animales que incluyen al conejo, perro, rata y ratón, además de cultivos celulares han sido empleados para poder estudiar la cardiotoxicidad inducida por DOX. Gracias a estos estudios han surgido diferentes propuestas para tratar de explicar el mecanismo molecular por el cual DOX induce cardiotoxicidad.

La hipótesis más estudiada y propuesta con mayor frecuencia es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediada por DOX. (Lei Wei, 2015) (Tomas Simunek, 2009). Otros estudios sugieren que la mitocondria es pieza clave en el desarrollo de la cardiotoxicidad inducida por DOX.

2.6.1 Hipótesis de la generación de Especies Reactivas de Oxígeno inducida por Doxorrubicina

2.6.1.1 Especies Reactivas de Oxígeno

Las ERO incluyen moléculas radicales y no radicales que se forman a partir de una reducción parcial de moléculas de oxígeno. Las principales ERO son el anión Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Paul D. Ray, 2012). En presencia de metales como el hierro y cobre, el peróxido de hidrógeno

puede generar el radical hidroxilo (reacción de Fenton); incluso, el anión superóxido también puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para producir radicales hidroxilo, que representa la ERO más reactiva (Esra Birben, 2012). Además de reaccionar con el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido puede reaccionar con especies reactivas de nitrógeno, como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), dando como resultado la producción de peroxinitrito (ONOO^-).

Estas moléculas son producidas por el metabolismo celular normal pero pueden reaccionar con otras moléculas dentro de la célula, causando la pérdida de su estructura y función (Adelheid Weidinger, 2015) (Esra Birben, 2012). Se piensa que son las especies reactivas secundarias (peroxinitrito y radical hidroxilo) las que causan mayor daño a la célula.

2.6.1.2 Sistema Antioxidante Celular

Dentro de la célula existen dos herramientas que permiten contrarrestar el efecto de las moléculas oxidantes. Una son las enzimas antioxidantes y la otra, las moléculas no enzimáticas (Esra Birben, 2012).

2.6.1.3 Enzimas Antioxidantes

La célula contiene enzimas que le permiten catalizar reacciones para convertir especies oxidantes en moléculas menos reactivas, por lo que son conocidas como enzimas antioxidantes y se encargan de mantener el balance del estado óxido-reducción celular.

La superóxido dismutasa (SOD) fue la primera de este grupo de enzimas en ser descubierta y debido a que el anión superóxido representa la ERO más abundante, la actividad de SOD es muy importante (Esra Birben, 2012). Tres distintas isoformas de SOD han sido identificadas en células de mamífero:

- SOD1 se caracteriza por tener un átomo de cobre y zinc en su centro catalítico y por encontrarse en compartimentos citoplasmáticos. Su peso molecular es de alrededor de 32 kDa.
- SOD2 contiene manganeso como cofactor y se localiza en la mitocondria. Existe como tetrámero con un peso molecular aproximado de 23 kDa por subunidad.

- SOD3 también contiene un átomo de cobre y zinc en su sitio catalítico y es una enzima extracelular. Funciona como un homotetrámero de 135 kDa por subunidad (Igor N. Zelko, 2002).

La catalasa es la enzima que se encarga de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, lo cual es necesario debido a que el peróxido de hidrógeno en altas concentraciones puede causar daños a la célula. La catalasa humana se encuentra como un homotetrámero con un grupo hemo en cada subunidad y tiene un peso molecular total aproximado de 240 kDa (Laszlo Goth, 2004) (Henry N. Kirman, 1984).

La glutatión peroxidasa también contribuye con la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y reduciendo a los lípidos peroxidados utilizando al glutatión como agente reductor. Es una enzima dependiente de selenio que funciona como tetrámero y tiene un peso molecular aproximado de 95 kDa (Yogesh C. Awasti, 1975).

2.6.1.4 Antioxidantes no enzimáticos

Las moléculas antioxidantes actúan como secuestradores directos de ERO, ya que su estructura química les permite ser oxidadas con cierta facilidad interrumpiendo la reacción de las ERO con otras moléculas celulares. Vitaminas como el ácido ascórbico y la vitamina E, glutatión y compuestos derivados de plantas (flavonoides y carotenoides) forman parte del sistema antioxidante celular no enzimático (Flora, 2009) (Esra Birben, 2012).

2.6.1.5 Estrés Oxidativo Celular

El estrés oxidativo celular (EO) ocurre cuando hay un incremento de ERO o una disminución en los miembros del sistema antioxidante. La célula buscará contrarrestar el daño oxidante incrementando la expresión genética de sus enzimas antioxidantes y proteínas estructurales, mediante la activación de factores de transcripción de respuesta al estrés, ya que las ERO pueden reaccionar con biomoléculas de gran importancia, como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas, afectando su estructura y función (Esra Birben, 2012).

2.6.1.6 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno por Doxorrubicina

Durante la administración de DOX ocurre un aumento en la producción de ERO, el cual ha podido ser medido a través de marcadores de estrés oxidativo como la determinación de peroxidación de lípidos o proteínas carboniladas.

El incremento de ERO puede explicarse a partir de la estructura química de DOX la cual tiene dos grupos quinona adyacentes, como se mencionó anteriormente. Estos grupos quinona pueden ser reducidos por enzimas como las reductasas citocromo P-450, xantina oxidasa o NADH deshidrogenasa (complejo I de la cadena respiratoria en la mitocondria) generando el radical libre semiquinona, que en presencia de oxígeno produce ERO al perder un electrón y regresando a su estado de quinona original (Genzou Takemura, 2007) (Alberts, 2014).

Otro mecanismo propuesto para explicar la formación de ERO es la formación de un complejo entre DOX y moléculas de hierro. Este complejo se reduce y oxida, y en presencia de oxígeno genera anión superóxido. Por otra parte, la presencia de hierro favorece la formación de anión hidroxilo a través de una reacción tipo Fenton. (P Vejpongsa, 2014).

Estrés Oxidativo en el cardiomiocito

Es importante mencionar que los cardiomiocitos expresan relativamente una menor cantidad de enzimas antioxidantes en comparación con tejidos como el hígado, provocando una mayor susceptibilidad del cardiomiocito ante el estrés oxidativo. (Michael S. Ewer, 2010) (Joel Salazar-Mendiguchia, 2013).

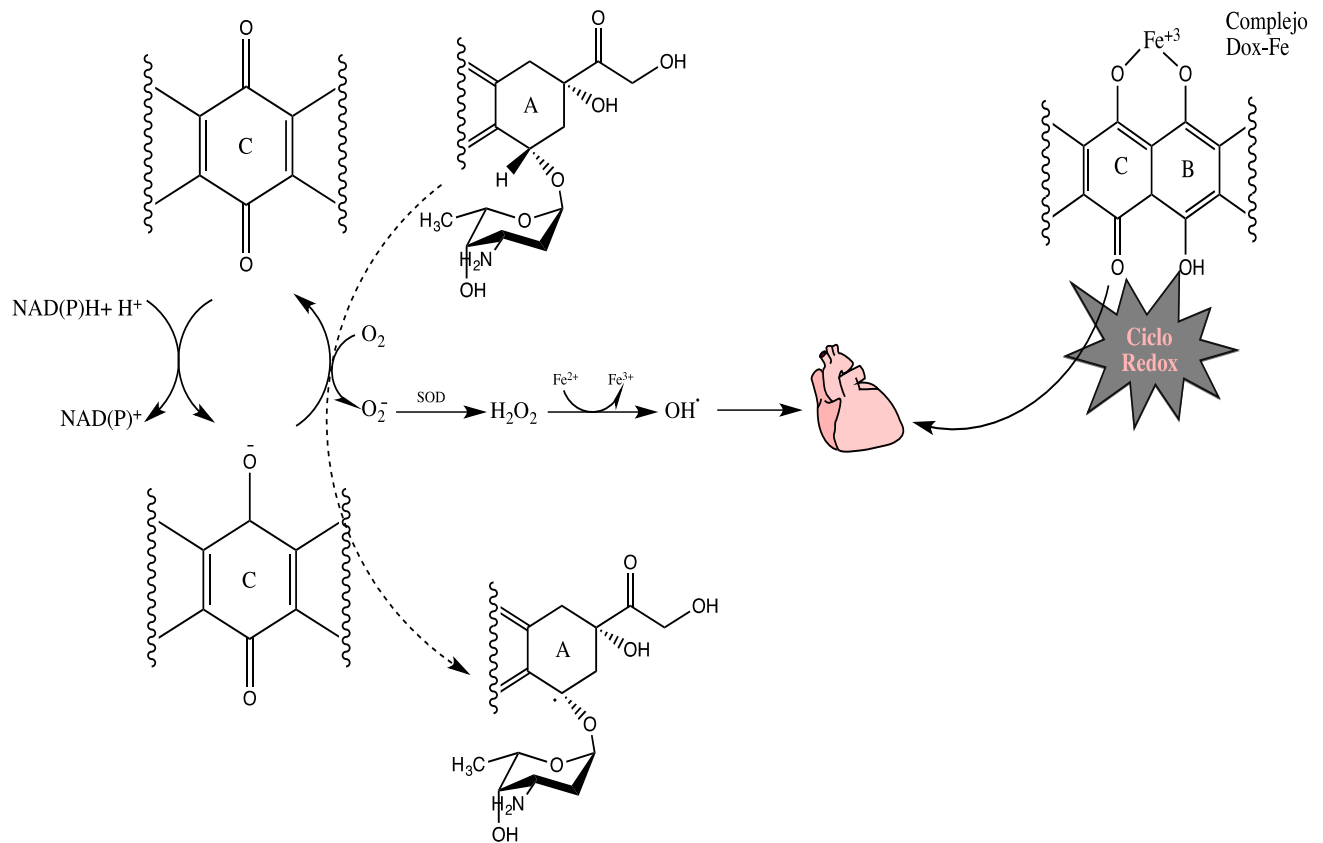


Figura 3. Ciclo de óxido reducción, formación del complejo DOX-Fe y producción de especies reactivas de oxígeno mediado por Doxorubicina

2.6.2 Hipótesis de Daño Mitocondrial inducido por Doxorubicina

2.6.2.1 La mitocondria: estructura y función

La mitocondria es un organelo que funciona como convertidor de energía y provee la mayor parte del ATP utilizado en las células eucariotas. Se describe como un cuerpo pequeño con forma de bacteria y con un diámetro entre 0.5-1 μm , pero extremadamente dinámico y plástico, cambiando de lugar y forma, dividiéndose y fusionándose. La mitocondria consta de dos membranas: la membrana interna contiene las proteínas que conforman la cadena respiratoria y está dispuesta en forma de crestas; la membrana externa encierra las crestas y es mucho más permeable que la membrana interna. La matriz mitocondrial es el espacio contenido por la membrana interna y es donde ocurre el ciclo de Krebs, que es parte del metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Además de su importante papel bioenergético, la mitocondria cumple otras importantes funciones dentro de la célula. Es un amortiguador del potencial redox del citosol al regenerar las moléculas de NAD⁺ que han sido reducidas a NADH, y a su vez generando más NADH para la biosíntesis de moléculas; sintetiza lípidos, incluso para otros organelos, y actúa como un amortiguador de calcio en la célula (Alberts, 2014).

2.6.2.2 Importancia de la mitocondria en el cardiomiocito

El corazón tiene como función principal distribuir la sangre a todos los tejidos del organismo, la cual contiene oxígeno y nutrientes necesarios para las células y también se encarga de recoger los desechos del metabolismo celular para su eliminación. Para cumplir esta función, el músculo cardíaco requiere grandes cantidades de energía que le permitan sostener su continua contracción. El 90% de esta energía proviene del ATP generado mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que explica por qué el 30% del peso del cardiomiocito está representado por mitocondrias y que cualquier alteración en la estructura y metabolismo de este organelo afecta directamente la función del cardiomiocito (Malgorzata Tokarska-Schlattner, 2006).

2.6.2.3 Daño en la mitocondria como factor en el desarrollo de cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina

El mecanismo por el cual DOX afecta el funcionamiento de la mitocondria ha sido estudiado profundamente, llevando al desarrollo de diferentes hipótesis que incluyen la alteración de la membrana mitocondrial interna y la toxicidad por estrés oxidativo. Estas hipótesis hacen referencia a la formación de un complejo entre DOX y la cardiolipina como parte de la explicación de estos mecanismos (Malgorzata Tokarska-Schlattner, 2006) (E. Goormaghtigh, 1990).

La cardiolipina es un fosfolípido que se encuentra específicamente en la membrana interna mitocondrial, que además de su función estructural, contribuye a que las proteínas transportadoras y los complejos que conforman la cadena respiratoria funcionen adecuadamente (E. Goormaghtigh, 1990) (Wallace, 2003). Estudios relacionan la alta afinidad de DOX por la cardiolipina con su mayor efecto cardiotóxico, esto en base a que otros agentes menos cardiotóxicos también tienen una menor afinidad por este fosfolípido.

Se considera que el complejo formado por DOX y cardiolipina lleva a una disminución en la actividad de la cadena respiratoria al interferir con el funcionamiento de sus complejos (O Marcillat, 1989). Esto afecta considerablemente el estado bioenergético del cardiomiocito. El transporte de moléculas que van hacia dentro o hacia afuera de la mitocondria también es interferido por este complejo (Wallace, 2003).

Como se mencionó anteriormente, DOX es metabolizada por enzimas carbonil reductasas y del citocromo P-450, las cuales son muy abundantes en el retículo endoplásmico de los hepatocitos. El cardiomiocito contiene una cantidad limitada de estas enzimas, sin embargo contiene grandes cantidades de mitocondrias. El complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (NADH deshidrogenasa) tiene la capacidad de reducir a DOX, generando su radical semiquinona, el cual entra a un ciclo redox que en presencia de oxígeno incrementa las concentraciones del anión superóxido provocando un estado EO en el cardiomiocito (J. M. Berthiaume, 2007).

Otro fenómeno que ha sido observado en la mitocondria durante la administración de DOX es la llamada permeabilidad transitoria mitocondrial (PTM), caracterizada por una pérdida de la permeabilidad selectiva, responsable de mantener el potencial de membrana y regular la concentración de calcio en la mitocondria. Se ha observado que la PTM está mediada por un poro. Este poro contiene residuos tiol sensibles al estado redox, que al oxidarse permiten la apertura del mismo. Se piensa que es el estado de EO generado por DOX la causa de este fenómeno y que finaliza con la hinchazón mitocondrial y con la despolarización y pérdida de la regulación bioenergética y del calcio (Wallace, 2003).

2.6.3 Posibles vías de muerte celular inducidas por Doxorrubicina

La mayoría de las hipótesis que buscan explicar el mecanismo de cardiotoxicidad inducida por DOX llegan a la conclusión que el EO generado en el cardiomiocito tiene como consecuencia la muerte celular. Las vías de apoptosis que han sido sugeridas son la activación de p53 mediada por el anión superóxido y peróxido de hidrógeno, que a su vez activa al gen Bax, el cual induce la apoptosis. Además se considera que el EO puede activar a la cinasa de señal regulatoria de la apoptosis 1 (ASK1), enzima que

participa en la vía de muerte celular de las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) y la vía de las cinasas MAP p38 (MAPK) (Genzou Takemura, 2007).

2.7 Estrategias para prevenir la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina

Como parte de las estrategias que han sido desarrolladas para prevenir la cardiotoxicidad inducida por DOX, su administración como una infusión continua de 48 a 96 horas y no como un bolo intravenoso ha resultado la manera más efectiva para prevenir las manifestaciones agudas de cardiotoxicidad al mantener niveles plasmáticos bajos de esta antraciclina (Sewa S. Legha, 1982) (Giorgio Minotti, 2004). A pesar de que la disminución de la cardiotoxicidad aguda en adultos se disminuyó considerablemente al implementar esta medida de seguridad, los estudios realizados en niños no han sido concluyentes para asegurar que las infusiones de DOX pueden disminuir la incidencia de IC en la población pediátrica (Giorgio Minotti, 2004) (Steven E. Lipshultz, 2013).

La búsqueda de análogos de antraciclinas no sólo se ha dirigido a encontrar análogos con una mejor actividad antitumoral, sino en encontrar análogos que no presenten o disminuyan este efecto secundario. Ninguno de los análogos desarrollados, como lo son epirrubicina o idarrubicina, han demostrado eliminar completamente el desarrollo de la cardiotoxicidad, por lo que no se ha logrado sustituir el uso de DOX en la clínica. (Giorgio Minotti, 2004) (Steven E. Lipshultz, 2013)

El dexrazoxano (DXZ) es el único fármaco aprobado por la FDA para utilizarse como agente cardioprotector durante el tratamiento con antraciclinas desde 1995. Comenzó a utilizarse en pacientes de cáncer de mama avanzado a las que se les administraba más de 300 mg/m² como una medida para disminuir la incidencia y severidad de cardiotoxicidad en esta población. El DXZ es un derivado del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se piensa que provee cardioprotección gracias a las propiedades quelantes que poseen sus productos al ser hidrolizado. Al quelar el hierro evitaría que se formara el complejo DOX-hierro, el cual es una fuente importante de ERO (Cvetković RS, 2005) (Robert C. Kane, 2008). El uso de este agente sigue siendo controversial debido a que estudios han relacionado su uso con el desarrollo de

neoplasias malignas secundarias en pacientes pediátricos (Dana M. Walker, 2013) (Cameron K. Tebbi, 2007).

La cardioprotección se ha buscado a través del desarrollo de sistemas de liberación que aseguren que DOX llegue específicamente al tejido tumoral, evitando o disminuyendo sus efectos secundarios en los que se encuentra la cardiotoxicidad. La FDA ha aprobado el uso de DOX liposomal para el tratamiento de cánceres específicos, como el cáncer de mama avanzado, cáncer de ovario, sarcoma de Kaposi por Síndrome Inmunodeficiencia Adquirido y mieloma múltiple refractario o recurrente. A pesar que estudios han demostrado que DOX liposomal disminuye la incidencia de cardiotoxicidad, no se ha logrado demostrar que los beneficios sean lo suficientemente significativos para justificar el costo 100 veces mayor respecto a DOX convencional puesto que la eficacia de las dos formulaciones es prácticamente la misma, sobre todo en países no desarrollados en los que su uso resulta poco viable (Yik Hoe Ngan, 2016).

Incluso se ha evaluado la actividad cardioprotectora de β -bloqueadores y de Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, los cuales son utilizados para tratar la cardiomiopatía derivada por DOX, sin embargo los estudios no han mostrado resultados claros. (Peter Georgakopoulos, 2010) .

La búsqueda de nuevas medidas cardioprotectoras para el uso de DOX sigue siendo un tema de interés, ya que hasta el momento ninguna de las estrategias desarrolladas ha logrado disminuir la incidencia de este efecto adverso en forma significativa. Debido a que el estado de EO generado por DOX en el cardiomiocito es una de las hipótesis más aceptadas para explicar la cardiotoxicidad, el uso de compuestos antioxidantes para contrarrestar este efecto ha sido de mucho interés.

Diferentes compuestos con propiedades antioxidantes, como la vitamina E y la N-acetilcisteína, han sido probadas en la búsqueda de disminuir o evitar la cardiotoxicidad inducida por DOX. Sin embargo, no han logrado mostrar un efecto cardioprotector significativo durante las pruebas clínicas (Giorgio Minotti, 2004).

A estos estudios se han sumado el uso de otros compuestos naturales que también muestran una actividad antioxidante, incluyendo compuestos derivados de plantas como son los flavonoides.

2.8 Flavonoides

2.8.1 Historia y estructura química de los Flavonoides

Los flavonoides son compuestos naturales sintetizados por las plantas que se caracterizan por tener estructuras fenólicas variables. En 1930 la rutina fue aislada a partir de la naranja, y aunque en un principio se pensó que se trataba de una vitamina (vitamina P), tiempo después se determinó que se trataba de un flavonoide. A partir de entonces miles de flavonoides han sido identificados. La estructura química de los flavonoides comparte un esqueleto de 15 carbonos que consiste en dos anillo de benceno unidos mediante un anillo de pirano (Pandey, 2013).

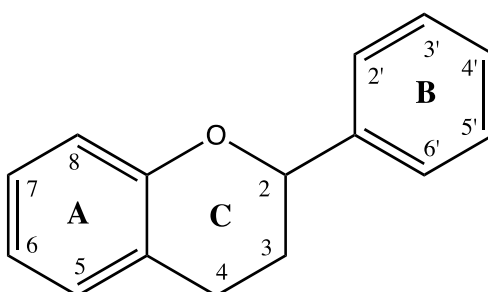


Figura 4. Estructura química general de los flavonoides

2.8.2 Clasificación de los Flavonoides

La estructura base que comparten los flavonoides presenta diferentes sustituciones químicas las cuales han permitido su clasificación. Las diferentes clases de flavonoides varían en su grado de oxidación y en el patrón de sustitución del anillo C, mientras que compuestos que pertenecen a la misma clase difieren en el patrón de sustitución de los anillos A y B. En los flavonoides el anillo B se encuentra unido a la posición 2 del anillo C, mientras que en los isoflavonoides, a la posición 3. Las hidroxilaciones se presentan por lo general en las posiciones 3, 5, 7, 2, 3', 4' y 5', y los sustituyentes glucosídicos generalmente se encuentran en las posiciones 3 o 7 (Shashank Kumar, 2013).

Basados en sus estructuras químicas, podemos identificar a seis clases de flavonoides particularmente abundantes en la naturaleza: flavonoles, flavanones, flavones, isoflavones, flavanoles y antocianidinas (Patel, 2008).

Los flavonoides pueden existir como monómeros, dímeros o polímeros. Los polímeros de flavonoides son llamados taninos y según su composición son divididos en taninos condensados, cuando sólo están formados por monómeros de flavonoides, y en taninos hidrolizables, cuando contienen ácido gálico o una molécula similar esterificada a un carbohidrato (N.C. Cook, 1996).

2.8.3 Funciones de los Flavonoides en las plantas

La síntesis de flavonoides en las plantas ha evolucionado como mecanismo de defensa que les confiere protección contra daños ocasionados por parásitos, herbívoros, patógenos, luz ultravioleta y EO, además de ayudar en procesos como la polinización y guía de insectos hacia su fuente de alimentación, por ejemplo confiriéndoles color a flores y frutos (N.C. Cook, 1996) (Pietta, 2000).

2.8.4 Fuentes de Flavonoides y su ingesta en la dieta

Los flavonoides son los compuestos polifenólicos más comunes y ampliamente distribuidos en las plantas y se encuentran en casi cualquier parte de ellas. Los flavonoides son fitoquímicos por lo que no pueden ser sintetizados por los animales pero forman parte de los nutrientes consumidos por el humano. Los podemos encontrar en frutas, vegetales, semillas y productos derivados de estos como jugos, té y vino. Los flavonoles son la clase de flavonoides más abundante de la dieta, siendo la quercetina el flavonoide más consumido por el humano. Debido a la diferencia que existe en la dieta de las personas y a que los flavonoides están ampliamente distribuidos en los vegetales, resulta difícil determinar una ingesta promedio de flavonoides en la población (Shashank Kumar, 2013) (N.C. Cook, 1996).

2.8.5 Beneficios a la salud por el consumo de Flavonoides

El interés en las plantas medicinales con potencial terapéutico ha llevado a determinar su contenido de flavonoides y conocer su actividad biológica. Entre las propiedades atribuidas a los flavonoides se encuentran su actividad antioxidante, antibacterial,

antiinflamatoria, antiviral y antitumoral; además se les ha considerado agentes cardioprotectores y hepatoprotectores (Shashank Kumar, 2013) (N.C. Cook, 1996).

2.8.6 Flavonoides como agentes antioxidantes

El mecanismo por el cual los flavonoides confieren protección antioxidante podría involucrar la inhibición de la formación de ERO mediada por una disminución de la actividad de las enzimas responsables de su generación, como la xantina oxidasa o NADH oxidasa, o por medio de la quelación de metales que promueven la formación de ERO a través de reacciones tipo Fenton, como se explicó anteriormente. Otra de las propiedades antioxidantes de los flavonoides, la cual depende de su estructura química, es la secuestración directa de ERO como lo son el anión superóxido, los radicales peroxilo, alcoxilo e hidroxilo, reduciendo su concentración. Finalmente, se piensa que los flavonoides incrementan la expresión de enzimas antioxidantes.

Los flavonoides actúan combinando estas propiedades antioxidantes y protegen al organismo del daño ocasionado por el EO (Pietta, 2000).

2.8.7 Flavonoides en la protección del Sistema Cardiovascular

Se ha observado que la ingesta de flavonoides tiene relación con una menor mortalidad debida a problemas cardiacos coronarios entre los países. Algunos de los mecanismos propuestos para explicar la protección cardiaca por el consumo de flavonoides indican que se debe a su habilidad para prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, la cual favorece la aterogénesis. A los flavonoides también se les atribuyen propiedades de antiagregación plaquetaria y vasodilatación que ayudan en la prevención de enfermedades cardiacas (L. H. YAO, 2004).

2.9 Flavonoides como estrategia contra la cardiotoxicidad inducida por Doxorubicina

En un estudio realizado en células de miocardio, se observó que el flavonoide epigallocatequin-3-galato, encontrado en el té verde, puede reducir el daño ocasionado por DOX al revertir la depleción de calcio en el retículo endoplásmico y neutralizar las ERO que se observa en el tratamiento con DOX (Jin Zheng, 2011).

Otro estudio realizado en ratas tratadas con DOX en una dosis acumulada de 15 mg/kg (3 dosis no consecutivas de 5 mg/kg) mostró que la administración diaria de procianidinas, flavonoide obtenido de las semillas de uva, en una dosis de 150 mg/kg protegió a las ratas de la cardiotoxicidad inducida por DOX mostrando mejor función cardiaca y una menor vacualización de los cardiomiocitos en comparación con ratas tratadas únicamente con DOX. Además la administración de procianidinas resultó en una menor cantidad de creatin cinasa, aspartato y alanino transferasa en suero (biomarcadores de daño cardiaco) y una mayor actividad antioxidante en el miocardio de las ratas tratadas con DOX (Sabry M. Attia, 2010).

2.10 Cacao como fuente importante de Flavonoides

El cacao, principalmente sus semillas, es una fuente importante de flavonoides representando alrededor del 7% de su peso. Los favanoles también conocidos como flavan-3-oles son la clase de flavonoides más abundante en el cacao. Los flavanoles del cacao son principalmente catequinas que se encuentran como monómeros o formando polímeros conocidos como procianidinas (Kris Etherton, 2002).

También han sido identificados otras clases de flavonoides en el cacao como las antocinidinas, que representan un 4% del contenido total de polifenoles, así como algunos flavonoles y flavones (C. Andres-Lacueva, 2008).

Es importante mencionar que el contenido de flavonoides en los productos derivados del cacao depende del lugar de cultivo y el procesamiento de las semillas. Las semillas son fermentadas y secadas, después se tuestan y muelen para obtener el licor del cacao utilizado para la producción de chocolate. El polvo de cacao se obtiene al extraer el aceite al licor de cacao. Además, la alcalinización es un método utilizado para modificar el color de las semillas, licor o polvo de cacao. Todo este procesamiento, principalmente la fermentación y la alcalinización, disminuye la concentración de polifenoles contenidos originalmente en las semillas de cacao (C. Andres-Lacueva, 2008).

2.10.1 Beneficios a la salud por consumo de productos derivados del Cacao

Los productos derivados del cacao han sido consumidos a través de los años en diferentes civilizaciones, no solamente por su buen sabor sino también por sus beneficios a la salud. Los Mayas preparaban una bebida a partir de las semillas de cacao y la llamaban la bebida de los Dioses, que dio lugar al nombre científico de la planta del cacao, *Theobroma cacao*, del griego theo (Dios) y broma (comida). Los aztecas preparaban una bebida a partir de las semillas del cacao, el chocolatl, y era llamada la “bebida divina” por el Emperador Azteca Moctezuma debido a que confería mayor resistencia a la fatiga. Durante la Conquista de América por los españoles, Hernán Cortes mencionó que una taza de esta bebida permitía a los hombres caminar un día entero sin comer. En el siglo XVI el cacao fue llevado a Europa donde se continuó usando por sus propiedades medicinales y comenzó a procesarse de diferentes maneras. Actualmente el consumo de cacao y chocolate sigue siendo muy importante, sin embargo su uso se ha inclinado hacia la repostería, lo que ha mermado sus propiedades nutricionales principalmente por el alto contenido de lípidos y carbohidratos con el que se procesa (Kris Etherton, 2002) (Roberto Corti, 2009).

En el año de 1999 se realizó un estudio en la comunidad de los Indios Kuna para obtener información acerca de los factores genéticos y no genéticos involucrados en el desarrollo de la hipertensión sanguínea. La comunidad Kuna es una población que vive en las islas de San Blas en Panamá que se encuentra separada del resto del país y tiene la peculiaridad de mostrar una baja incidencia de hipertensión sanguínea entre sus habitantes, lo cual despertó el interés de su estudio. En esta investigación también participaron personas originarias de la comunidad Kuna que habían emigrado a la ciudad y que cambiaron su estilo de vida, con el propósito de conocer si la baja incidencia de los indios Kuna para desarrollar hipertensión tenía un origen genético o no. Los resultados fueron muy interesantes: en primer lugar se observó que entre los miembros de la comunidad indígena que adoptaban el estilo de vida de la ciudad, la incidencia de hipertensión aumentaba, lo que sugiere que la protección contra la hipertensión en la comunidad Kuna no se trata de un factor genético. En segundo lugar los estudios de alimentación mostraron que no existían cambios importantes en el tipo y la cantidad de la comida, además que de que el consumo de sal por parte de los

indios en la isla era incluso mayor que las poblaciones occidentales. Sin embargo, una diferencia importante que se encontró fue el tipo de bebidas ingeridas. El agua no es muy abundante en la isla, por lo cual los indios preparan una bebida a base de cacao que toman prácticamente todo el día (más de 5 tazas diarias). Otro cambio que se observó en el estudio fue un mayor consumo de pescado por parte de los habitantes de la isla, lo que podría proveerles de una mayor cantidad de omega 3. Sin embargo, la ingesta de pescado no es tan importante como para poder atribuirle la protección contra la hipertensión además de que se ha demostrado que el consumo de omega 3 tiene un efecto modesto en la presión sanguínea (Norman K. Hollenberg, 2009) (McCullough, 2006).

Con este estudio se incrementó el interés por conocer las propiedades del cacao, en especial sus beneficios al sistema cardiovascular. Los beneficios observados en el sistema cardiovascular y en todo el organismo con el consumo de productos derivados del cacao son atribuidos a sus propiedades como antioxidante, vasodilatador, antihipertensivo, antiplaquetario y antiinflamatorio (Mary B. Engler, 2006). Además de estos efectos, otros estudios sugieren que el consumo de productos derivados del cacao puede disminuir la resistencia a la insulina, modular el sistema inmune, disminuir el riesgo de carcinogénesis, proteger el sistema nervioso y la piel (David L. Katz, 2011).

2.10.2 Flavonoides en la mediación de los beneficios a la salud por el consumo de productos derivados del Cacao

Los flavonoides no son los únicos compuestos con actividad biológica presentes en el cacao. El cacao es rico en metilxantinas, teobromina y cafeína que tienen efecto como moduladores del sistema nervioso central y gastrointestinal, además de su efecto diurético. Sin embargo, debido a sus propiedades, los flavonoides son considerados los principales mediadores de los beneficios a la salud atribuidos al consumo de productos derivados del cacao (Sven Langer, 2011) (Hendrik J. Smit, 2004).

2.10.3 Flavanoles del Cacao

En 1909 Ultee y van Dorsen identificaron al principal compuesto polifenólico del cacao con una fórmula empírica de $C_{16}H_{16}O_6$ y le asignaron el nombre de "kakakol".

Actualmente se sabe que este producto de aspecto cristalino contenía a las de catequinas del cacao.

Los monómeros de catequina más abundantes en el cacao son la (+)-catequina y la (-)-epicatequina. Estos enantiómeros sólo difieren en la configuración de su C-3, ya que la (+)-catequina tiene una configuración "S" y la (-)-epicatequina tiene la configuración "R". Los otros dos enantiómeros, (-)-catequina y (+)-epicatequina no abundan en la naturaleza y por lo tanto tampoco en el cacao (Abbe Maleyki Mhd Jalil, 2008).

Los oligómeros y polímeros de catequinas, o procianidinas, representan alrededor del 90% del total de polifenoles y están constituidas principalmente de (-)-epicatequina, mientras que los monómeros representan del 5 al 10% (C. Andres-Lacueva, 2008).

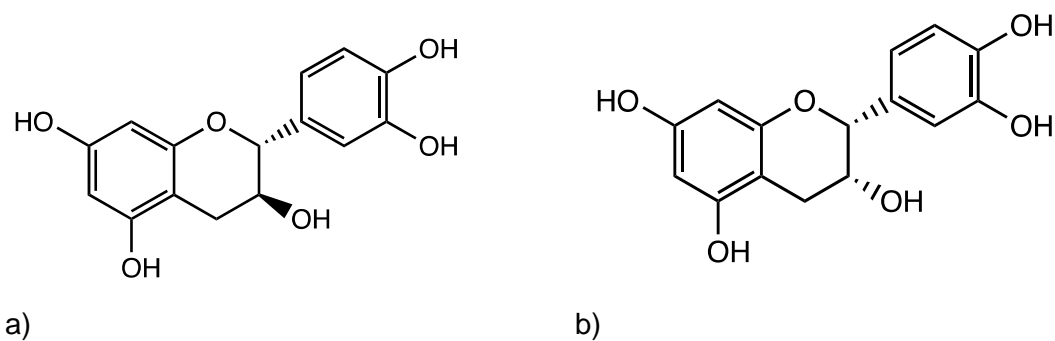


Figura 5. Estructura química de a) (+)-Catequina (2R, 3S) y b) (-)-Epicatequina (2R, 3R)

2.11 (-)-Epicatequina

La (-)-epicatequina (Epi) es el monómero de flavanol más abundante en el cacao representando el 35% de su contenido total de polifenoles (C. Andres-Lacueva, 2008). En cuanto a la biodisponibilidad de Epi, estudios en humanos muestran que después de consumir un producto derivado del cacao rico en flavonoides, la concentración más alta de Epi en plasma se observa 2 horas después de la ingesta, con la eliminación de la mayor parte de ésta a las 8 horas.

Estudios sobre los flavonoides del cacao han mostrado una relación directa del consumo de productos derivados del cacao con un incremento de la concentración de

Epi y la capacidad antioxidante del plasma. Además, la cantidad de productos de la oxidación de lípidos en plasma ha mostrado una relación inversa con el incremento de Epi. Es por esto que Epi es considerada un mediador importante de los beneficios atribuidos al consumo de productos derivados del cacao (Kris Etherton, 2002).

2.11.1 Beneficios de (-)-Epicatequina en el Sistema Cardiovascular

El consumo de productos derivados del cacao muestra beneficios en el sistema cardiovascular, incluyendo la mejora del funcionamiento endotelial. Estudios relacionan directamente este efecto con la Epi presente en el cacao. La función endotelial es mediada por el metabolismo del óxido nítrico (NO) y otras moléculas vasoactivas como los prostanoides. Un estudio realizado en humanos adultos que consumieron chocolate oscuro rico en flavonoides durante 2 semanas, relaciona el aumento de la dilatación mediada por el flujo de la arteria braquial (una medida del funcionamiento endotelial) con el incremento de Epi en plasma (Mary B. Engler, 2006). Además de esta medición, el consumo crónico de flavanoles se relaciona con una alta excreción de metabolitos de NO, lo que es consistente con un incremento de la producción de NO que favorece la vasodilatación (Hagen Schroeter, 2005).

Cuando Epi es administrada directamente en humanos se mimetiza la mejora en la función endotelial observada con el consumo de productos derivados del cacao. El mecanismo propuesto para explicar la mejora en el endotelio es con un incremento en la producción de NO mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por acción de Epi (Hagen Schroeter, 2005).

Además del mejoramiento en endotelio, Epi ha mostrado favorecer la angiogénesis y conferir protección al miocardio. Un estudio en ratones a los que se les administró Epi a una dosis de 1mg/kg dos veces al día durante 15 días, mostró un incremento en la angiogénesis en el miocardio similar a lo observado en ratones sometidos a ejercicio físico durante el mismo periodo de tiempo (I Ramirez-Sanchez, 2012), mientras que en un estudio realizado en ratas sometidas a cirugía de isquemia-reperfusión tratadas con Epi a una dosis de 1 mg/kg por día 10 días antes de la cirugía, mostraron una disminución del tamaño de la zona de infarto 48 horas después de la cirugía (Katrina Go Yamazaki, 2008).

2.11.2 Beneficios de (-)-Epicatequina en la mitocondria

Epi ha sido considerada como un mediador del funcionamiento mitocondrial, lo que podría explicar en parte los efectos benéficos a la salud que se le atribuyen. Se ha reportado que la administración de Epi en una dosis de 1 mg/kg dos veces al día por un periodo de 15 días incrementa la maquinaria de fosforilación oxidativa en músculo esquelético y corazón así como la densidad y contenido de crestas mitocondriales. Los resultados fueron aún mejores que los obtenidos con ratones sometidos a ejercicio físico sin Epi, pero los efectos se potencializaban al combinar los dos tratamientos (Epicatequina y ejercicio físico) (Leonardo Nogueira, 2011).

En un estudio realizado en ratas sometidas a cirugía de isquemia-reperfusión a las que se les administró Epi vía intravenosa en una dosis de 10 mg/kg, se observó una menor área de infarto y una disminución de la remodelación adversa del tejido cardiaco. Incluso una segunda dosis de Epi a las 12 horas de la cirugía, mostró una mayor disminución del daño causado por el infarto. Los investigadores sugieren que esta protección podría ser mediada por la vía óxido nítrico sintasa/guanilil cilcasa soluble (NOS/sGC) la cual sería activada por Epi estimulándose el transporte y oxidación de piruvato en la mitocondria (Katrina Go Yamazaki e. a., 2014).

Otro estudio realizado en cultivo de células de endotelio de arteria coronaria bovina mostró que el tratamiento con Epi incrementaba la actividad de la enzima citrato sintasa y la expresión de proteínas mitocondriales. Se sugiere que este incremento en la actividad y nivel de proteína mitocondrial es mediado por la producción de NO, el cual es considerado un estimulante de la biogénesis mitocondrial (Aldo Moreno-Ulloa e. a., 2013).

Células obtenidas de túbulo proximal de ratón fueron tratadas con el agente de quimioterapia cisplatino por una hora y después de retirarlo se trataron con Epi, para evaluar su efecto protector a nivel mitocondria. Los resultados mostraron que Epi protege del daño mitocondrial inducido por cisplatino previniendo la liberación de citocromo c y la pérdida del potencial de membrana (Katsuyuki Tanabe, 2012).

2.11.3 Beneficios de (-)-Epicatequina en el Sistema Antioxidante Celular

Las propiedades antioxidantes atribuidas al consumo de productos derivados del cacao se han relacionado con el incremento de Epi en sangre, que es consistente con el incremento en la capacidad antioxidante y la disminución de la peroxidación de lípidos en suero (Janice F. Wang, 2000).

Otro estudio reciente en el que se administró Epi en una dosis de 1mg/kg dos veces al día a ratones seniles, mostró cambios favorables en el sistema de defensa antioxidante y la biogénesis mitocondrial. Específicamente en corazón, los niveles de SOD2, catalasa y glutatión peroxidasa se incrementaron parcialmente en los ratones seniles tratados con Epi (Aldo Moreno-Ulloa, 2014).

3. Materiales y Métodos

3.1 Tratamiento de los Animales.

40 ratones CD1 machos de 6 semanas de edad de un peso entre 25 y 36 g que se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h a 25°C, con libre acceso a agua y comida, fueron divididos en cuatro grupos. El primer grupo (Ctr, $n=10$) fue tratado con 0.1 mL de agua destilada vía oral diario y 0.1 mL de solución salina vía intraperitoneal los días correspondientes a la administración de DOX. El segundo grupo (Epi, $n=9$) fue tratado con 1mg/kg/día de Epi (Sigma-Aldrich) vía oral y 0.1 mL de solución salina vía intraperitoneal los días correspondientes a la administración de DOX. El tercer grupo (DOX, $n=10$) fue tratado con 0.1 mL de agua destilada vía oral diario y 5mg de DOX (Adriamicina, Roche) por kg de peso los días 5, 8, 11, 14 y 17 del tratamiento para alcanzar una dosis acumulada de 25 mg/kg. El cuarto grupo (DOX+Epi, $n=10$) fue tratado con 1mg/kg/día de Epi vía oral y se le administró DOX en la misma dosificación que el grupo DOX. Se hizo un seguimiento diario del peso corporal de cada ratón.

3.2 Recolección de muestras

Los ratones fueron eutanizados 21 días después de haber iniciado el tratamiento oral. El corazón de cada ratón fue extraído, pesado y congelado a -80°C inmediatamente hasta su procesamiento. Muestras de sangre fueron colectadas y mezcladas con 150 UI de heparina, se centrifugaron a 1,500 rpm durante 15 min para obtener el plasma y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

3.3 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios anti catalasa, anti SOD2 fueron obtenidos de Abcam y preparados en una dilución 1:5000. El anticuerpo primario utilizado para reconocer grupos dinitrofenilos (anti DNP) fue obtenido de Abcam y preparado en una dilución 1:1000. El anticuerpo primario anti gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa fue obtenido de Cell Signaling y preparado en una dilución de 1:1000. El anticuerpo primario anti mitoilina fue obtenido de MitoSciences y preparado en una dilución de 20 μ L por cada 10 mL. El anticuerpo primario de anti complejo V fue obtenido de MitoSciences y preparado en una dilución de 5 μ L por cada 10 mL. Los anticuerpos

secundarios conjugados con peroxidasa de rábano para ratón y conejo fueron obtenidos de Cell Signaling y se prepararon en una dilución 1:5000.

3.4 Homogenización de tejidos y obtención de proteína total

Muestras de miocardio (25 a 35 mg) fueron homogenizadas con un politrón en 350 μ L de buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL 1%, Desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%), inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich), 5 mM Na_3VO_4 y 3 mM NaF. Los homogenizados fueron sonicados por 15 min a 4°C y centrifugados a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante con la proteína total fue colectado y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento.

3.5 Método de Bradford

Se utilizó una solución de albúmina de suero bovino a una concentración de 1mg/mL para realizar la curva estándar. Las muestras fueron diluidas 1:5 en agua y mezcladas con 200 μ L de reactivo de Bradford (Bio Rad) en una placa de 96 pocillos. Se dejó reaccionar durante 5 min. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 595 nm con un microlector.

3.6 Western Blot

La concentración de proteína total de las muestras fue determinada utilizando el método de Bradford por triplicado. 20 μ g de muestra fue cargado en geles preensamblados de 4-10% de poliacrilamida para realizar su electroforesis y se realizó la transferencia a membrana de polivinilo utilizando un sistema semiseco. Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo [tris-buffer saline más Tween 20 al 0.1% (TBST) al 5% de leche libre de grasa] durante 1 h, siguiendo con la incubación con el anticuerpo primario. El tiempo de incubación para el anticuerpo anti GAPDH fue de 15 min a temperatura ambiente, para anti catalasa y anti SOD2 fue de 30 min a temperatura ambiente, mientras que para los anticuerpos anti mitofilina y anti complejo V durante toda la noche a 4°C. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST por 5 minutos e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST por 5 minutos y reveladas con solución de quimioluminiscencia (Thermo Fisher Scientific). Las impresiones del inmunoblot se

realizaron en una película fotográfica. La intensidad de las bandas fue cuantificada digitalmente usando el programa Image J.

3.7 Determinación de Proteína Carbonilada

100 μ L de muestra fue transferida a un tubo. 400 μ L de solución de dinitrofenilhidrazina (DNPH) fue añadida al tubo muestra. Los tubos correspondientes a cada muestra fueron incubados en oscuridad por 1 h a temperatura ambiente. Los tubos se mezclaron utilizando vortex cada 15 min del tiempo de incubación. Se adicionó 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 20% a cada tubo y se mezcló con vortex. Los tubos fueron incubados 5 min en hielo. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido en 500 μ L de TCA al 10% e incubados en hielo por 5 min. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado resuspendido manualmente en 500 μ L de una mezcla (1:1) de etanol/acetato de etilo, se mezcló profundamente con vortex y fueron centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. El lavado con etanol/acetato de etilo se repitió otras. La pastilla de proteína fue resuspendida en 500 μ L de hidrocloreto de guanidina y mezclada con vortex. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La proteína total fue determinada por método de Bradford. Se tomaron 5 μ g por muestra y se adicionó buffer de fosfatos hasta alcanzar un volumen de 8 μ L. Las muestras fueron depositadas directamente por goteo en una membrana de vinilo. La membrana con las muestras se dejó secar a temperatura ambiente. La membrana se incubó con solución de bloqueo (TBST al 5% de leche libre de grasa) durante 1 h, siguiendo con la incubación con el anticuerpo primario anti DNP durante toda la noche a 4°C. La membrana fue lavada 3 veces con TBST por 5 minutos e incubada con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la peroxidasa de rábano durante 1 h a temperatura ambiente. La membrana fue lavada 3 veces con TBST por 5 minutos y revelada con solución de quimioluminiscencia. Las impresiones del dot blot se realizaron en una película fotográfica. La intensidad de los puntos fue cuantificada digitalmente usando el programa Image J.

3.8 Análisis Resultados.

Los datos son expresados como promedio \pm error estándar de la muestra (EEM). El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey. El valor de significancia estadística es del 5%.

4. Resultados

4.1 Tasa de Supervivencia

Antes de la eutanasia, tres ratones del grupo DOX y tres ratones del grupo DOX + Epi murieron a causa del tratamiento, teniendo la misma tasa de supervivencia (70%). Ningún ratón murió antes de la recolección de órganos en los grupos Ctrl y Epi (tasa de supervivencia del 100%).

4.2 Aspecto y comportamiento de los ratones

No se observaron cambios en el comportamiento y aspecto en los grupos Ctrl y Epi. Durante el tratamiento, los ratones del grupo DOX y del grupo DOX + Epi mostraron una aparente debilidad, micciones frecuentes, episodios de diarrea y pérdida de pelaje en la zona de inyección.

Los grupos Ctrl y Epi no presentaron diferencias significativas respecto al peso promedio corporal y peso promedio del corazón. En relación al grupo Ctrl y grupo Epi, los ratones del grupo DOX y DOX + Epi mostraron una disminución significativa en el peso corporal ($P < 0.05$). Al comparar el peso promedio del corazón, los grupos DOX y DOX + Epi mostraron una disminución significativa en relación al grupo Epi, pero no se observó diferencia significativa contra el grupo Ctrl. El ratio peso del corazón/peso corporal entre los grupos no mostró diferencia significativa. El porcentaje de ganancia corporal también mostró una disminución significativa en los grupos DOX y DOX + Epi respecto a los grupos Ctrl y Epi ($P < 0.0001$).

Grupo	Peso corporal (g)	Peso del corazón (g)	Radio peso del corazón/peso corporal mg/g
Ctrl (n=9)	33.33 ± 0.79	0.2088 ± 0.0246	0.6302 ± 0.0706
Epi (n=8)	35.67 ± 0.94	0.2399 ± 0.0192	0.6695 ± 0.0518
DOX (n=7)	28.57 ± 1.12*††	0.1631 ± 0.0116†	0.5764 ± 0.0468
DOX + Epi (n=7)	25.67 ± 0.96**††	0.1543 ± 0.0113†	0.5996 ± 0.0335

Tabla 1. Los datos son expresados como valor promedio por grupo ± EEM; *P < 0.05 versus Ctrl; **P < 0.0001 versus Ctrl; †P < 0.05 versus Epi; ††P < 0.0001 versus Epi

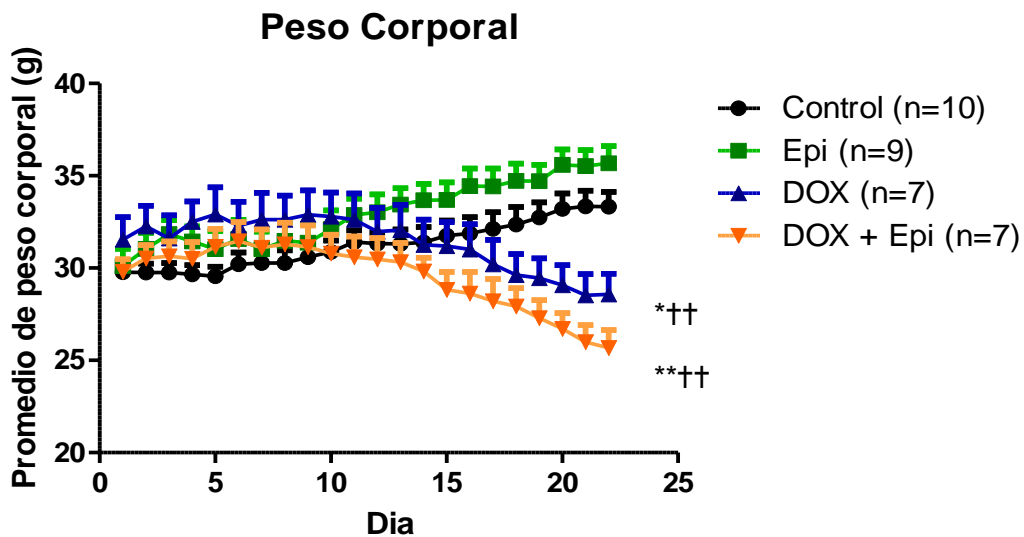


Figura 6. *P < 0.001 versus Ctrl; **P < 0.0001 versus Ctrl; ††P < 0.0001 versus Epi
Peso corporal correspondiente a cada día del tratamiento. Los valores son expresados como el valor promedio por grupo + EEM

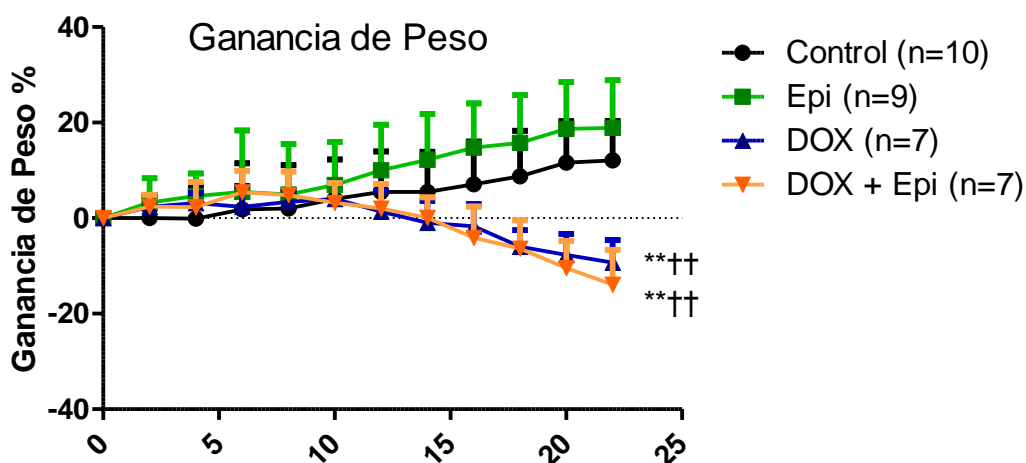


Figura 7. **P < 0.0001 versus Ctrl; ††P < 0.0001 versus Epi
 Porcentaje de ganancia de peso corporal durante el tratamiento. Los datos se expresan como el valor promedio por grupo + EEM

4.3 Expresión de GAPDH en Miocardio

La proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) participa en el metabolismo de carbohidratos catalizando la conversión del gliceraldehído 3-fosfato en D-glicerato 1,3-bisfosfato, durante la glucólisis, y fue utilizada como proteína control en los ensayos de Western Blot. El nivel de expresión de la proteína GAPDH del grupo DOX + Epi mostró una reducción significativa respecto al grupo Ctrl (P < 0.05). No se observó una diferencia significativa en los valores de expresión de la proteína GAPDH entre el resto de los grupos.

Ctrl (n=8)	Epi (n=7)	DOX (n=7)	DOX + Epi (n=7)
1 ± 0	0.939 ± 0.101	0.894 ± 0.036	0.744 ± 0.038*

Tabla 2. *P < 0.05 respecto a Ctrl. Los valores son expresados como el valor arbitrario promedio del grupo ± EEM.

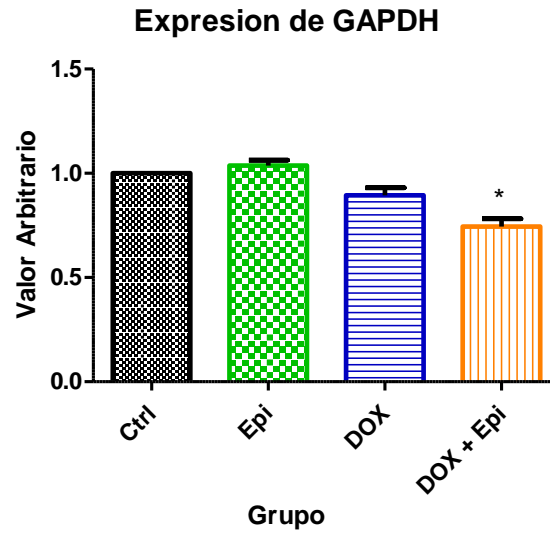


Figura 8. *P < 0.05 respecto a Ctrl. Las barras representan el valor arbitrario promedio de GAPDH por grupo y el respectivo EEM.

4.4 Moduladores de la Defensa Antioxidante en Miocardio: SOD2 y Catalasa

La SOD2 y la catalasa (CAT) son enzimas que forman parte del sistema de defensa antioxidante y se utilizaron para evaluar la respuesta de este sistema a los tratamientos en muestras de miocardio. Los valores no normalizados con GAPDH (valores arbitrarios) de la expresión de SOD2 y CAT no mostraron una diferencia significativa entre los diferentes grupos.

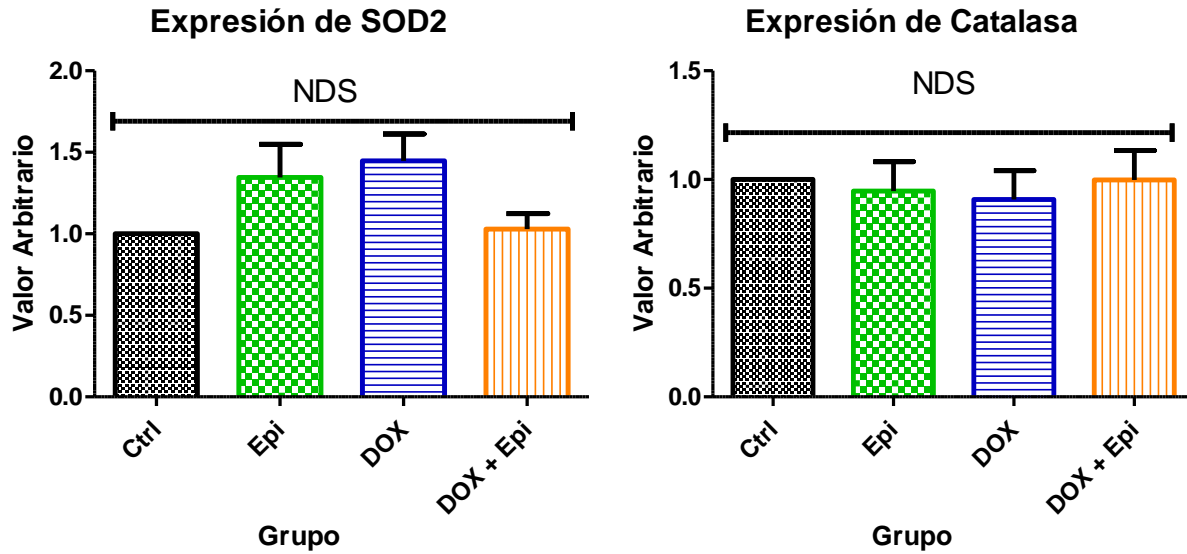


Figura 9. A) Las barras representan el promedio de los valores arbitrarios de SOD2 por grupo con los respectivos EEM. B) Las barras representan el promedio de los valores arbitrarios de CAT por grupo con los respectivos EEM. NDS: no existe diferencia significativa entre los grupos.

Proteína	Ctrl (n=8)	Epi (n=7)	DOX (n=7)	DOX + Epi (n=7)
SOD2	1 ± 0	1.346 ± 0.203	1.447 ± 0.165	1.029 ± 0.095
CAT	1 ± 0	0.947 ± 0.135	0.909 ± 0.132	0.999 ± 0.135

Tabla 3. Los valores son expresados como el valor arbitrario promedio del grupo ± EEM.

Los valores normalizados con GAPDH de la expresión de la proteína SOD2 mostraron un incremento significativo en el grupo DOX respecto al grupo Ctrl. El resto de los grupos no mostraron diferencias significativas. Los valores normalizados con GAPDH de la expresión de CAT no mostraron una diferencia significativa entre los grupos.

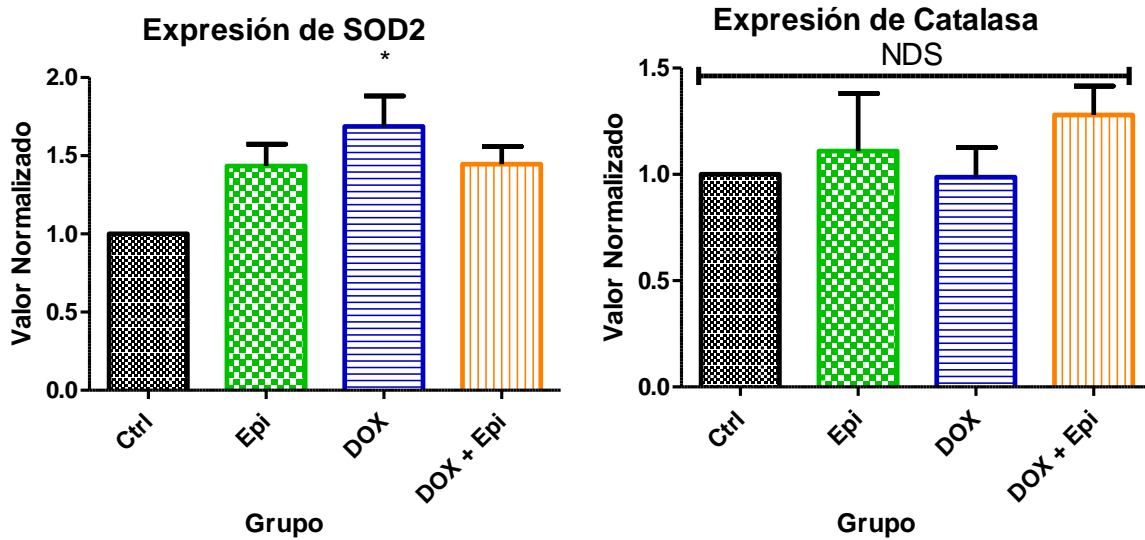


Figura 10. *P < 0.05 respecto a Ctrl. A) Las barras representan el promedio de los valores normalizados de SOD2 por grupo con los respectivos EEM. B) Las barras representan el promedio de los valores normalizados de CAT por grupo con los respectivos EEM. NDS: no existe diferencia significativa entre los grupos.

Proteína	Ctrl (n=8)	Epi (n=7)	DOX (n=7)	DOX + Epi (n=7)
SOD2	1 ± 0	1.434 ± 0.141	1.687 ± 0.195*	1.446 ± 0.113
Catalasa	1 ± 0	1.109 ± 0.271	0.987 ± 0.140	1.279 ± 0.137

Tabla 4. *P < 0.05 respecto al grupo Ctrl. Los valores son expresados como el valor normalizado promedio del grupo ± EEM.

4.5 Proteínas Mitocondriales en Miocardio: Mitofilina y Complejo V

La expresión de mitofilina fue utilizada como un marcador del efecto del tratamiento sobre las mitocondrias, ya que se trata de una proteína abundante en este organelo, involucrada con la formación de las crestas mitocondriales y por lo tanto, se encuentra en grandes cantidades en el tejido cardiaco. La medición de la expresión de mitofilina en muestras de miocardio no mostró diferencias significativas en los valores no normalizados y normalizados con GAPDH entre los grupos.

Por otra parte el complejo V se utilizó como marcador de la función mitocondrial, debido a que forma parte de la cadena respiratoria en la mitocondria, teniendo como función la síntesis de ATP. La medición de la expresión del complejo V en muestras de tejido cardiaco no mostró diferencias significativas en los valores no normalizados y normalizados con GAPDH entre los grupos.

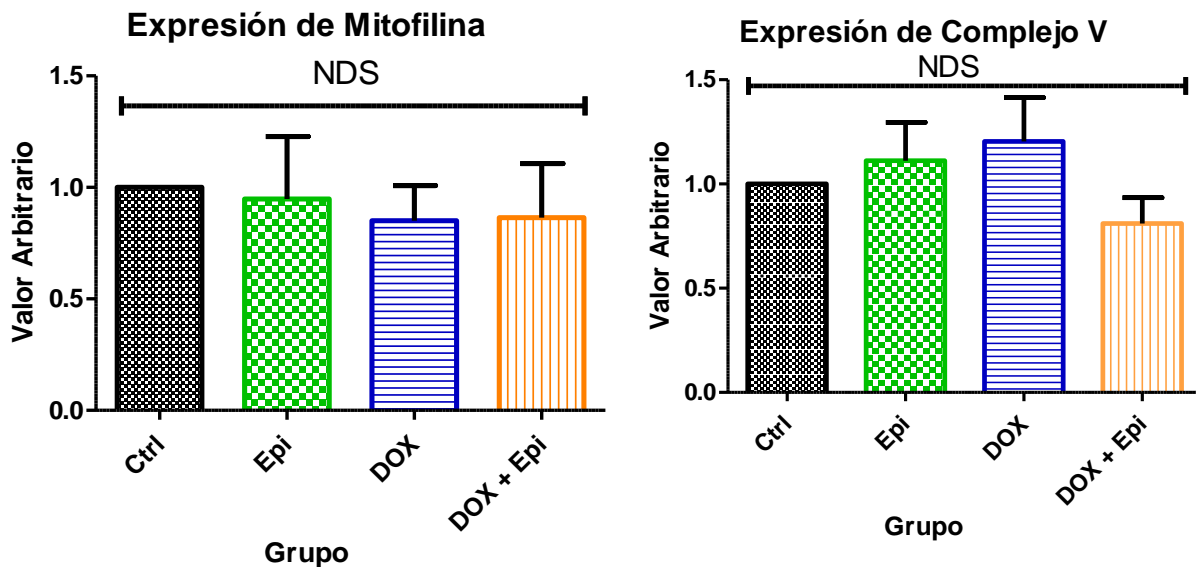


Figura 11. A) Las barras representan el promedio de los valores arbitrarios de Mitofilina por grupo con los respectivos EEM. B) Las barras representan el promedio de los valores arbitrarios de Complejo V por grupo con los respectivos EEM. NDS: no existe diferencia significativa entre los grupos.

Proteína	Ctrl (n=8)	Epi (n=7)	DOX (n=7)	DOX + Epi (n=7)
Mitofilina	1 ± 0	0.949 ± 0.279	0.850 ± 0.158	0.864 ± 0.243
Complejo V	1 ± 0	1.112 ± 0.184	1.204 ± 0.210	0.810 ± 0.125

Tabla 5. Los valores son expresados como el valor arbitrario promedio del grupo ± EEM.

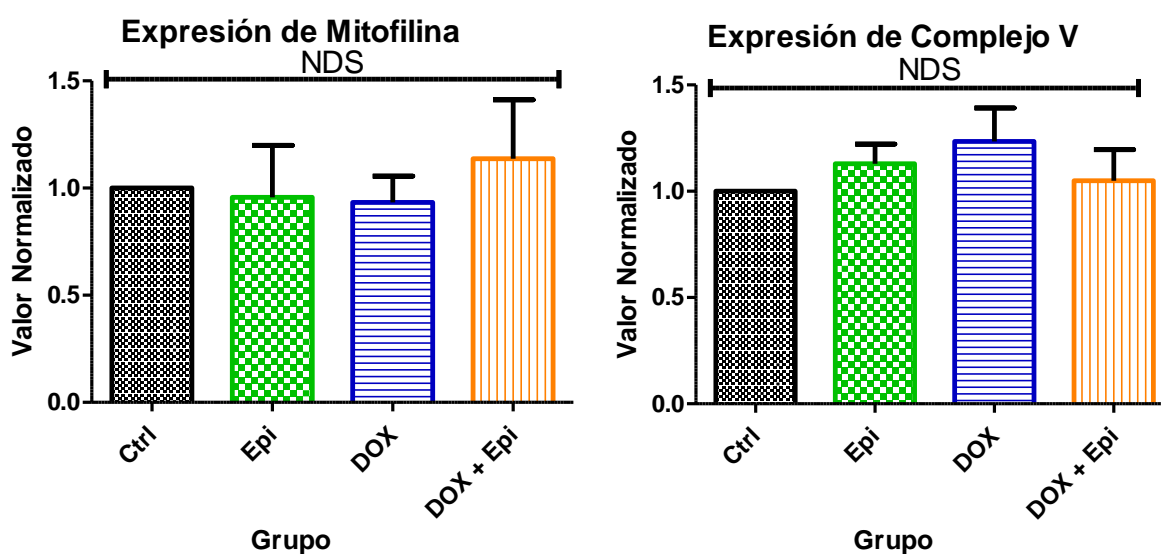


Figura 12. A) Las barras representan el promedio de los valores normalizados de Mitofilina por grupo con los respectivos EEM. B) Las barras representan el promedio de los valores normalizados de Complejo V por grupo con los respectivos EEM. NDS: no existe diferencia significativa entre los grupos.

Proteína	Ctrl (n=8)	Epi (n=7)	DOX (n=7)	DOX + Epi (n=7)
Mitofilina	1 ± 0	0.957 ± 0.243	0.933 ± 0.123	1.137 ± 0.274
Complejo V	1 ± 0	1.130 ± 0.092	1.234 ± 0.158	1.049 ± 0.147

Tabla 6. Los valores son expresados como el valor normalizado promedio del grupo ± EEM.

4.6 Proteínas carboniladas en plasma

La determinación de proteínas carboniladas es empleada como un indicador general de estrés oxidativo. Los resultados de este estudio muestran que no existe una diferencia significativa entre los grupos respecto al nivel de proteína carbonilada en plasma.

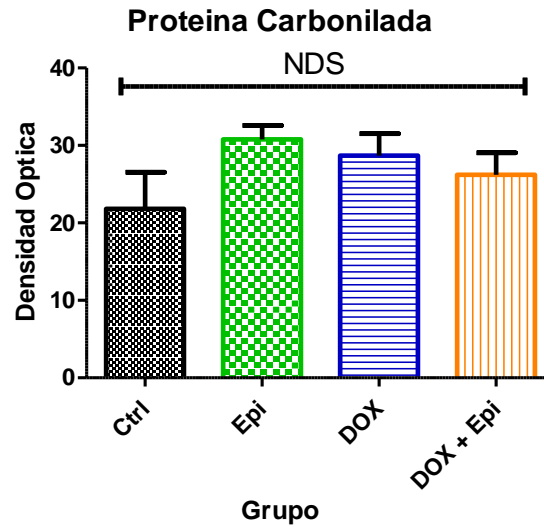


Figura 13. Las barras representan el promedio de las densidades ópticas correspondiente a la proteína carbonilada por grupo con los respectivos EEM. NSD: no existe diferencia significativa entre los grupos.

Ctrl (n=4)	Epi (n=4)	DOX (n=4)	DOX + Epi (n=4)
21.83 ± 4.725	30.77 ± 1.828	28.67 ± 2.833	26.23 ± 2.822

Tabla 7. Los valores son expresados como el valor de la densidad óptica promedio del grupo ± EEM correspondiente a la proteína carbonilada.

5. Discusión de Resultados

5.1 Supervivencia, comportamiento, peso corporal y peso del corazón de los ratones

Al término del tratamiento pudimos observar una disminución en la supervivencia de los grupos que recibieron DOX (del 70% en grupos DOX y DOX + Epi) respecto a los grupos control (tasa de supervivencia del 100% en grupos Ctrl y Epi). Además se observaron cambios en el comportamiento de los ratones y una pérdida de peso corporal significativo en los grupos DOX y DOX + Epi respecto a los grupos control (Ctrl y Epi).

La elección de la dosificación de DOX en los ratones se realizó en base a otros estudios que muestran que al dividir la dosis total de DOX en varias administraciones espaciadas se alcanza una mayor tasa de supervivencia en los animales, logrando desarrollar cardiotoxicidad. Un estudio realizado por Milano, et al en ratones en el año 2014 mostró que con una administración de 4 mg/kg por día de DOX durante 6 días en un periodo de dos semanas (dosis acumulada de 24 mg/kg), se obtenía una mayor tasa de supervivencia a partir del día 21 de haber iniciado el tratamiento al mismo tiempo que se desarrollaba una severa cardiotoxicidad, la cual fue determinado con niveles plasmáticos de troponina c y parámetros hemodinámicos del ventrículo izquierdo. (Giuseppina Milano, 2014). En otro estudio realizado en ratones se observó que la DOX administrada en 4 mg/kg una vez por semana durante 7 semanas, alcanzando la dosis acumulada de 28 mg/kg, fue demasiado tóxica para los animales. Debido a esto la dosis fue ajustada a 4 mg/kg una vez por semana durante 6 semanas, teniendo una dosis acumulada de 24 mg/kg, lo cual incrementó la tasa de supervivencia de los ratones después de dos semanas del tratamiento, dando seguimiento a la cardiotoxicidad en los animales a través de técnicas de ecocardiografía (van Acker, 1996).

La pérdida de peso corporal y del corazón es utilizado como una medida de seguimiento de animales tratados con DOX. Por ejemplo, en el estudio de Milano, et al los resultados arrojan una disminución en el peso corporal y del corazón a partir del día 21 de tratamiento, después de haber recibido una dosis acumulada de 24 mg/kg de

DOX (Giuseppina Milano, 2014). Sin embargo el estudio de van Acker, et al, sólo se observaron cambios significativos de pérdida de peso corporal en el grupo de ratones al que se le administró la dosis acumulada de 28 mg/kg de DOX, no así para el grupo que recibió 24 mg/kg acumulados de DOX (van Acker, 1996).

Cabe mencionar que el tiempo de administración de DOX juega un papel importante en la evolución de los ratones, y en el primer estudio fue administrada en un periodo de dos semanas, lo cual resulta más agresivo si se compara con el segundo estudio donde DOX se administra en un periodo de 6 semanas. En nuestro tratamiento, DOX se administró en un lapso de 13 días, lo que se acerca más al tratamiento de Milano, et al. Pero a diferencia de este estudio nosotros no observamos un cambio significativo en el peso del corazón de los grupos DOX y DOX + Epi respecto al grupo Ctrl, sólo tuvieron diferencia significativa respecto al grupo Epi. Finalmente, al obtener la relación peso corazón/peso corporal no observamos una diferencia significativa entre los grupos, lo cual indica que cualquier pérdida de peso del corazón fue proporcional a la pérdida de peso corporal en los ratones tratados con DOX, lo que nos hace pensar que el corazón no resulto particularmente afectado en su masa.

5.2 Moduladores del Sistema Antioxidante en Miocardio: SOD2 y Catalasa

Los datos obtenidos en este estudio muestran un aumento en los niveles normalizados de la expresión de SOD2 en miocardio del grupo DOX respecto al grupo Ctrl. Por su parte, el grupo DOX + Epi no mostró una diferencia significativo respecto al grupo Ctrl y al grupo DOX. Como se mencionó, SOD2 es una enzima mitocondrial que se encarga de catalizar la conversión del anión superóxido en peróxido de hidrógeno. El miocardio contiene altos niveles de mitocondrias por lo que la enzima SOD2 es clave en el sistema de defensa antioxidante en este tejido.

Durante estados de EO celular se ha observado un incremento importante (hasta del doble) de la enzima SOD2. Este es el caso del estudio de Hussain, et al, donde se muestra un incremento en la actividad y expresión de estas proteínas en células de linfoblastos TK6 a las que se les administró DOX en una dosis de 0.5 µg/mL. Esta observación fue relacionada con la activación de la vía de apoptosis de p53, ya que se han identificado secuencias reconocidas por la proteína p53 en la región promotora de

los genes que codifican para SOD2 y glutatión peroxidasa. Se piensa que un desequilibrio en la expresión de las proteínas antioxidantes también pueden llevar a un estado de estrés oxidativo (Hussain, 2014).

Diferentes estudios han medido la actividad enzimática de la SOD2 como marcador de estrés oxidativo inducido por DOX. Childs, et al, realizaron un estudio en el año 2002 en el que ratas tratadas con 20 mg/kg de DOX en una dosis única, mostraron un incremento en la actividad de SOD2 en miocardio (5.9 ± 2.4 U/mg de proteína) respecto al grupo control (0.43 ± 0.2 U/mg de proteína) (Childs, 2002); por otra parte, Naidu et al, administraron una dosis de 4mg/kg de DOX por semana durante cuatro semanas (dosis acumulada de 16 mg/kg) en ratones y observaron una disminución en la actividad de la SOD2 en miocardio (24 ± 3.6 U/mg de proteína) tres semanas después de concluir el tratamiento en comparación con el grupo control (37 ± 7.5 U/mg de proteína) (Naidu, 2002).

Nosotros consideramos que el incremento en la expresión de SOD2 en el miocardio de los ratones del grupo DOX podría representar un mecanismo de defensa celular ante el EO generado por este agente en el corazón.

Por otra parte, CAT se empleó como otro marcador del sistema antioxidante. CAT es una enzima citoplasmática que se encarga de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Como se había mencionado, el cardiomiocito no contiene grandes cantidades de enzimas antioxidantes, especialmente de CAT, en relación con otros tejidos.

Nuestros resultados muestran que no hay una diferencia significativa en los niveles normalizados de expresión de CAT entre los grupos. En el estudio de Hussain et al, no se observó un incremento en la expresión de CAT inducido por DOX en las células TK6 tratadas con este agente de quimioterapia y sugieren que juega una contraparte en la apoptosis inducida por p53 (Hussain, 2014).

La determinación de la actividad enzimática de CAT también es utilizada como marcador de estrés oxidativo inducido por DOX. En los estudios mencionados anteriormente para la SOD2, la actividad enzimática de CAT en miocardio permanece

sin cambios después del tratamiento con DOX. Naidu et al, no observaron una diferencia significativa en la actividad enzimática de CAT en miocardio en el grupo de ratones tratado con DOX (5.80 ± 1.4 U/mg de proteína) respecto al grupo control (6.20 ± 1.0 U/mg de proteína) (Naidu, 2002), lo cual coincide con los resultados de Childs et al, donde el grupo DOX no muestra cambios en su actividad enzimática de CAT en miocardio (0.37 ± 0.14 U/mg de proteína) respecto al grupo control (0.19 ± 0.03 U/mg de proteína) (Childs, 2002).

5.3 Proteínas Mitocondriales en Miocardio: Mitofilina y Complejo V

La mitofilina es una de las proteínas más abundantes en la mitocondria, que forma parte de las crestas mitocondriales y en un principio fue descrita como una proteína del músculo cardíaco debido a su abundancia en este tejido. Se piensa que una de las funciones de la mitofilina es la morfogenética intramitocondrial, al relacionarse con la formación tubular normal de las crestas mitocondriales y de las uniones crestales (John, 2005).

Como se mencionó anteriormente, DOX induce daño a nivel mitocondrial el cual se relaciona con el desarrollo de cardiotoxicidad. Un estudio realizado en miocitos tratados con DOX muestra cambios en el funcionamiento mitocondrial (como la disminución del potencial de membrana) los cuales preceden a la apoptosis celular. En este mismo estudio mitocondrias aisladas de tejido de rata y tratadas con DOX, fueron analizadas y se logró observar un incremento en la producción de superóxido, seguido de la liberación de citocromo c, lo que permitió relacionar el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la apoptosis en función del tiempo (Green, 2002).

Debido a la importancia de la mitocondria en el desarrollo de la cardiotoxicidad inducida por DOX y, debido a que la mitofilina es un componente mitocondrial importante, decidimos utilizar la expresión de mitofilina como marcador de la estructura mitocondrial después del tratamiento. La expresión de mitofilina ha sido relacionada con la biogénesis mitocondrial, la cual juega un papel importante en tejidos como el músculo y corazón que contienen grandes cantidades de mitocondrias (Valero, 2014); sin embargo, un exceso en la expresión de mitofilina también ha sido relacionada con

falla cardiaca, considerándose parte del desarrollo de la hipertrofia de este órgano (Yuan, 2014).

En este estudio esperábamos observar un cambio en la expresión de mitofilina que nos permitiera medir el impacto a nivel mitocondrial de DOX, sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los grupos.

Por otra parte, durante el tratamiento con DOX se ha observado que los complejos mitocondriales representan un blanco importante para este agente de quimioterapia, y diferentes estudios muestran cambios en la actividad enzimática de estos complejos inducidos por DOX, siendo la citocromo c oxidasa el complejo más estudiado (complejo IV) (Tokarska-Schlattner, 2006) (Papadopoulou, 1999).

Dentro de estos complejos mitocondriales, el complejo V o ATP sintasa se encarga de la síntesis de ATP a partir de ADP y de fosfato inorgánico en la última parte de la cadena respiratoria, utilizando la energía derivada del movimiento de protones a través de una membrana y está compuesta de dos subunidades (F_1 y F_0) (Stock, 1999).

Durante periodos de anoxia o durante el desacoplamiento mitocondrial, se ha observado una disminución de la expresión de la ATP sintasa, mientras que una sobreexpresión de esta proteína se ha detectado durante la contracción en cardiomiocitos (Das, 2003).

Con este estudio esperábamos observar un cambio en la expresión del complejo V que nos indicara el funcionamiento mitocondrial durante el tratamiento con DOX, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

5.4 Carbonilación de Proteínas en plasma

La determinación de la carbonilación de proteínas es utilizada como un marcador de EO de carácter amplio y severo, que incluye moléculas formadas por la reacción de las proteínas con las ERO directamente, o indirectamente con compuestos carbonílicos derivados de estas ERO. Este marcador tiene la ventaja de ser estable por lo que su cuantificación resulta un valor muy confiable (Dalle-Donne, 2003).

En estudios realizados con pacientes como con modelos animales, incluyendo el ratón, se ha observado un aumento en la cantidad de proteína carbonilada en plasma después de la administración de DOX. Por ejemplo, la administración de DOX en una dosis de 20 mg/kg a un grupo de ratones incrementó en más del doble la cantidad de proteína carbonilada en plasma 72 horas después de la administración en relación al grupo control (Aluise, 2009).

En este estudio decidimos evaluar el nivel de proteínas carboniladas en plasma como un indicador de estrés oxidativo a nivel sistémico. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados.

5.5 Evaluación del modelo de cardiotoxicidad inducida por DOX

Puesto que la dosificación de DOX fue seleccionada en base a estudios que muestran signos de cardiotoxicidad en ratones con una dosificación similar, consideramos que el tiempo de evolución de los animales después de la administración de DOX debió de ser mayor para poder observar cambios significativos en los marcadores de daño seleccionados para este estudio como parte de la evaluación de la cardiotoxicidad. Sin embargo, esto representaba un riesgo para la supervivencia de los ratones que mostraban problemas de salud después de haber sido tratados con DOX, lo que no nos permitió prolongar el tiempo de seguimiento.

5.6 Cardioprotección de (-)-Epicatequina en la cardiotoxicidad inducida por DOX

La medición de la expresión de CAT, mitofilina y complejo V en miocardio y de proteínas carboniladas en plasma no mostraron diferencias significativas entre los grupos, lo que no nos permitió utilizar estos marcadores en la evaluación del efecto cardioprotector de EPI. Sin embargo, en las determinaciones de peso corporal y tasa de supervivencia, en las que si hubo diferencia significativa respecto a los grupos control, el grupo DOX + Epi no mostró diferencia significativa respecto al grupo DOX.

Existen diferentes estudios donde se ha probado la acción cardioprotectora de flavonoides durante el tratamiento con DOX. Por ejemplo, un estudio realizado por Mantawy et al, analizó ratas tratadas con crisina en una dosis de 50 mg/kg por día durante 12 días consecutivos seguido de una dosis única de DOX de 15 mg/kg las

cuales mostraron una recuperación de en las actividades enzimáticas de CAT (7.58 ± 1.65 U/mg de proteína) y SOD (27.22 ± 5.78 U/mg de proteína) en miocardio al compararlo con un grupo de ratas que solo recibió DOX (CAT 5.17 ± 1.01 U/mg de proteína y SOD 19.77 ± 4.12 U/mg de proteína), además de mostrar una recuperación en la relación peso corazón/peso corporal (grupo DOX + crisina = 0.37 ± 0.055 y grupo DOX = 0.32 ± 0.035) (Mantawya, 2014).

El ajo se caracteriza por su alto contenido de flavonoides como la quercetina (Bozin, 2008). En un estudio realizado en ratones se observó que el extracto de ajo inyectado intraperitonealmente seis veces a la semana, reduce los niveles de peroxidación de lípidos (que es un marcador de estrés oxidativo) en homogenados de corazón (221.3 ± 31.6), esto después de ser tratados con DOX 1.5 mg/kg por día tres veces a la semana durante 40 días, en comparación con ratones que únicamente fueron tratados con la misma dosis de DOX (186.6 ± 42.2) (Kojima R, 1994).

Además, no observamos cambios en el grupo Epi respecto al grupo Ctrl. Existen estudios donde se ha probado EPI en ratones, la cual incrementa los niveles de los marcadores utilizados por nosotros respecto a un grupo control. Por ejemplo, Nogueira et al, observaron que ratones tratados con EPI en una dosis de 1 mg/kg dos veces al día durante 15 días mostraban un incremento en la expresión de mitofilina en miocardio comparado con el grupo control, lo cual se volvió a observar en un estudio realizado en ratones seniles (los cuales expresan una menor cantidad de complejo V y mitofilina en tejido cardiaco) a los que se les administra EPI dosificada de la misma forma que en el estudio anterior, y se observó una recuperación parcial de la expresión de mitofilina y complejo V respecto a un grupo de ratones jóvenes. En este mismo estudio, la expresión de SOD 2 y CAT también se recuperó parcialmente en ratones seniles tratados con EPI respecto al grupo de ratones jóvenes (Aldo Moreno-Ulloa, 2013) (Leonardo Nogueira, 2011).

Otro estudio en el que también utilizaron EPI fue realizado por Mohamed et al, se trataron ratas con este flavonoide en una dosis de 10 mg/kg/día durante dos semanas y en las siguientes dos semanas se trataron con seis inyecciones de DOX para alcanzar una dosis acumulada de 13 mg/kg, observándose una disminución en la

expresión del Factor de Necrosis Tumoral α , Óxido Nítrico Sintasa inducible y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas en cerebro, utilizados como marcadores de toxicidad cerebral, en comparación con el grupo que sólo recibió DOX (Mohamed, 2011).

Estas comparaciones nos hacen pensar que posiblemente Epi no se administro en una dosis suficiente para permitirnos observar cambios en los marcadores utilizados durante el periodo de tratamiento seleccionado para este estudio.

6. Conclusiones

Con la realización de este estudio no logramos observar un efecto cardioprotector de (-)-Epicatequina a una dosis de 1 mg/kg por día en ratones CD1 tratados con 25 mg/kg de Doxorubicina durante un periodo de 21 días.

El modelo de cardiotoxicidad empleado no permitió observar un cambio significativo entre los grupos control y los grupos que recibieron tratamiento con Doxorubicina en la mayoría de los marcadores de cardiotoxicidad seleccionados.

Se determinó el peso corporal y del corazón de los ratones para evaluar la evolución de los animales y el impacto del tratamiento en el corazón. También se logró determinar la expresión proteica de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa 2 en muestras de miocardio, así como los niveles de proteína carbonilada en suero, siendo los marcadores para la evaluación del sistema antioxidante celular en este tejido. Además se determinaron los niveles proteicos de mitofilina y complejo V en muestras de miocardio para su evaluación mitocondrial.

Sin embargo los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos que nos permitiera evaluar un efecto cardioprotector por parte de (-)-Epicatequina.

Consideramos que el periodo de evolución de los ratones a partir de la última administración de Doxorubicina no fue suficiente para observar cambios significativos entre los grupos, siendo muy probablemente un factor limitante en el desarrollo de la cardiotoxicidad de nuestro modelo experimental, por lo que sugerimos que esta información sea considerada para futuros estudios.

7. Referencias

- Abbe Maleyki Mhd Jalil, e. a. (2008). Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules*, pp. 2190-2219.
- Adelheid Weidinger, e. a. (2015). Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, pp. 472-484.
- Alberts, e. a. (2014). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
- Aldo Moreno-Ulloa, e. a. (2013). Effects of (-)-epicatechin and derivatives on nitric oxide mediated induction of mitochondrial proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , pp. 4441–4446.
- Aldo Moreno-Ulloa, e. a. (2014). Recovery of Indicators of Mitochondrial Biogenesis, Oxidative Stress, and Aging With (-)-Epicatechin in Senile Mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* , 10 (1093), pp. 1-10.
- Aluise, e. a. (2009). In vivo amelioration of adriamycin induced oxidative stress in plasma by gamma-glutamylcysteine ethyl ester (GCEE). *Cancer Letters* , pp. 25-29.
- Ankur Gulati, e. a. (2013). Association of Fibrosis With Mortality and Sudden Cardiac Death in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *Journal American Medical Association*, pp. 896-908.
- Antonella De Angelis, e. a. (2016). Doxorubicin cardiotoxicity and target cells: a broader perspective. *Cardio-Oncology*, pp. 1-8.
- Axel Schlit, e. a. (2014). Cardiotoxicity and Oncological Treatments. *Dtsch Arztebl Int*, pp. 161–8.
- Azra Rabbani, e. a. (2005). The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure . *BioEssays*, pp. 50–56.
- Bhave, M. e. a. (2014). An update on the risk prediction and prevention of anticancer therapy-induced cardiotoxicity. *Current Opinion in Oncology* , 590-599.
- Biplob Bhattacharya, e. a. (2015). Cancer Therapy Using Antibiotics. *Journal of Cancer Therapy*, pp. 849-858.
- Bozin, e. a. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum*L., Alliaceae). *Food Chemistry*, pp. 925–929.
- C. Andres-Lacueva, e. a. (2008). Flavanol and Flavonol Contents of Cocoa Powder Products: Influence of the Manufacturing Process. *J. Agric. Food Chem*, pp. 3111–3117.

Cameron K. Tebbi, e. a. (2007). Dexrazoxane-Associated Risk for Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome and Other Secondary Malignancies in Pediatric Hodgkin's Disease. *Journal Of Clinical Oncology*, pp. 493-500.

7. Carine E. Hamo, e. a. (2016). Cancer Therapy–Related Cardiac Dysfunction and Heart Failure, Part 2: Prevention, Treatment, Guidelines, and Future Directions. *Circulation: Heart Failure.*, pp. 1-10.

Carvalho C, e. a. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*, pp. 3267-3285.

Chen MH, e. a. (2011). Cardiovascular disease: cause of morbidity and mortality in adult survivors of childhood cancers. *Circulation Research*, pp. 619-628.

Chengqun Huang, e. a. (2010). Juvenile Exposure to Anthracyclines Impairs Cardiac Progenitor Cell Function and Vascularization Resulting in Greater Susceptibility to Stress-Induced Myocardial Injury in Adult Mice. *Circulation*, pp. 675-683.

Childs, e. a. (2002). Doxorubicin Treatment in Vivo Causes Cytochrome c Release and Cardiomyocyte Apoptosis, As Well As Increased Mitochondrial Efficiency, Superoxide Dismutase Activity, and Bcl-2:Bax Ratio. *Cancer Research*, pp. 4592–4598.

Cvetković RS, e. a. (2005). Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs.*, pp. 1005-24.

Dalle-Donne, e. a. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Molecular Medicine*, pp. 169-176.

Dana M. Walker, e. a. (2013). Dexrazoxane use in pediatric patients with acute lymphoblastic or myeloid leukemia from 1999 and 2009: Analysis of a national cohort of patients in the pediatric health information systems database. *Pediatric Blood & Cancer*, pp. 616-620.

Daniela Cardinale, e. a. (2015). Early Detection of Anthracycline Cardiotoxicity and Improvement With Heart Failure Therapy. *Circulation*, pp. 1981-1988.

Das. (2003). Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, pp. 71–82.

David L. Katz, e. a. (2011). Cocoa and Chocolate in Human Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling* , pp. 2779-2811.

Delgado-Roche e. a. (2014). Ozone-Oxidative Preconditioning Prevents Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Sprague-Dawley Rats. *Sultan Qaboos Univ MedJ*, pp. 342-348.

Donato Mele, e. a. (2016). Current views on anthracycline cardiotoxicity. *Heart Failure Reviews*, pp. 1-14.

Douglas Hanahan, e. a. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, pp. 646-674.

E. Goormaghtigh, e. a. (1990). Structure of the adriamycin-cardiolipin complex: Role in mitochondrial toxicity. *Biophysical Chemistry*, pp. 247-257.

Elizabeth M. McNally, e. a. (2013). Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.*, pp. 19-26.

Elsy Navarrete-Rodriguez, e. a. (2013). Diagnóstico Oportuno del daño al miocardio en pacientes tratados con antraciclinas: un reto para el siglo XXI. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, pp. 72-77.

Eman M. Mantawy, e. a. (2014). Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via supression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *European Journal of Pharmacology*. pp. 107-118.

Esra Birben, e. a. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* , 9:19.

F. J. F. Broeyer, S. O. (2008). Evaluation of biomarkers for cardiotoxicity of anthracyclin-based chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*, pp. 961-968.

Fábio N. Gava, e. a. (2013). Doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in a rabbit model: An update. *Research in Veterinary Science*, pp. 115–121.

Fan Yang, e. a. (2016). Preclinical Evaluation of an Epidermal Growth Factor Receptor–Targeted Doxorubicin–Peptide Conjugate: Toxicity, Biodistribution, and Efficacy in Mice. *Journal of Pharmaceutical Science*, pp. 639–649.

Flora, e. a. (2009). Structural Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 191-206.

Fotso, H. L. (2008). *Anthracycline Chemistry and Biology I*. Gottingen: Springer.

Genzou Takemura, e. a. (2007). Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, pp. 330–352.

Genzou Takemura, e. a. (2007). Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy: From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, pp. 330–352.

Giorgio Minotti, P. M. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, pp. 185–229.

Giuseppina Milano, e. a. (2014). Doxorubicin and Trastuzumab Regimen induces Biventricular Failure in mice. *Journal of the American Society of Echocardiography*, pp. 568-579.

Green, e. a. (2002). Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, pp. 94–101.

Hagen Schroeter, e. a. (2005). (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*, pp. 1024–1029.

- Helena J. van der Pal, e. a. (2012). High Risk of Symptomatic Cardiac Events in Childhood Cancer Survivors. *Journal Of Clinical Oncology*, pp. 1429-1437.
- Hendrik J. Smit, e. a. (2004). Methylxanthines are the psycho-pharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology*, pp. 412-419.
- Henry N.Kirman, e. a. (1984). Catalase:A Tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, pp. 4343-4347.
- Ho LK, e. a. (2016). David and Goliath: chemical perturbation of eukaryotes by bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol*,pp. 233-48.
- Hussain, e. a. (2014). p53-Induced Up-Regulation of MnSOD and GPx but not Catalase Increases Oxidative Stress and Apoptosis. *Molecular Biology, Pathobiology and Genetics*, pp. 2350-2356.
- I Ramirez-Sanchez, e. a. (2012). Stimulatory effects of the flavanol (-)-epicatechin on cardiac angiogenesis: Additive effects with exercise. *J Cardiovasc Pharmacol* pp. , 429–438.
- Igor N. Zelko, e. a. (2002). Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison Of The Cuzn-Sod (Sod1), Mn-Sod (Sod2), And Ec-Sod (Sod3) Gene Structures, Evolution, And Expression. *Free Radical Biology & Medicine*, pp. 337–349.
- J. M. Berthiaume, e. a. (2007). Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, pp. 15-25.
- Janice F. Wang, e. a. (2000). A Dose-Response Effect from Chocolate Consumption on Plasma Epicatechin and Oxidative Damage. *J. Nutr*, pp. 2115S-2119S.
- Jin Zheng, e. a. (2011). Cardioprotective effects of epigallocatechin-3-gallate against doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. *European Journal of Pharmacology*, pp. 82-88.
- Joel Salazar-Mendiguchia, e. a. (2013). Anthracycline-mediated cardiomyopathy: Basic molecular knowledge for the cardiologist. *Archivos de Cardiologia de Mexico*, pp. 1-6.
- John J.V. Chairperson, e. a. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*,pp. 803–869.
- John, e. a. (2005). The Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology. *Molecular Biology of the Cell*, pp. 1543–1554.
- Katrina Go Yamazaki, e. a. (2008). Short- and long-term effects of (-)-epicatechin on myocardial ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, pp. 761-767.
- Katrina Go Yamazaki, e. a. (2014). Intravenous (-)-epicatechin reduces myocardial ischemic injury by protecting mitochondrial function. *International Journal of Cardiology*, pp. 297–306.

- Katsuyuki Tanabe, e. a. (2012). Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropathy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, pp. 1-11.
- Kojima R, e. a. (1994). Protective effects of an aged garlic extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the mouse. *Nutr Cancer.*, pp. 163-73.
- Kris-Etherton, e. a. (2002). Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Current Opinion in Lipidology*,pp. 41–49.
- L. H. YAO, e. a. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, pp. 113-122.
- Laszlo Goth, e. a. (2004). Catalase Enzyme Mutations and their Association with Diseases. *Mol Diagn*, pp. 141-149.
- Lefrak Edward, e. a. (1973). A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer*, pp. 302-314.
- Lei Wei, e. a. (2015). Dissecting the Mechanisms of Doxorubicin and Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity: The Involvement of Actin Cytoskeleton and ROCK1. *Plos one*, pp. 1-18.
- Leonardo Nogueira, e. a. (2011). (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *The Journal of Physiology*, pp. 4615-4631.
- Lipshultz SE, e. a. (1995). Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *The new england journal of medicine*, pp. 1738-1743.
- Lotrionte, e. a. (2013). Review and Meta-Analysis of Incidence and Clinical Predictors of Anthracycline Cardiotoxicity. *The American Journal of Cardiology*, pp. 1980-1984.
- Malgorzata Tokarska-Schlattner, e. a. (2006). New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetic. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, pp. 389–405.
- Mantawya, e. a. (2014). Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, pp. 107–118.
- Markkanen E, e. a. (2016). DNA Damage and Repair in Schizophrenia and Autism: Implications for Cancer Comorbidity and Beyond. *Int J Mol Sci.*, pp. 1-17.
- Mary B. Engler, e. a. (2006). The Emerging Role of Flavonoid-Rich Cocoa and Chocolate in Cardiovascular Health and Disease. *Nutrition Reviews*, pp. 109 - 118.
- Marzia Lotrionte, e. a. (2103). Review and Meta-Analysis of Incidence and Clinical Predictors of Anthracycline Cardiotoxicity. *Am J Cardiol*, pp. 1980-1989.

- McCullough, e. a. (2006). Hypertension, the Kuna, and the Epidemiology of Flavanols. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, pp. S103-S109.
- Michael S. Ewer, e. a. (2010). Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiology needs to know. *Nature Reviews Cardiology*, pp. 564-575.
- Michela Salvatici, e. a. (2015). Cancer Cardiotoxicity and Cardiac Biomarkers. *Biomarkers in Cance*, pp. 73-105.
- Mohamed, e. a. (2011). Epicatechin attenuates doxorubicin-induced brain toxicity: critical role of TNF- α , iNOS and NF- κ B. *Brain Res Bull.*, pp. 22-8.
- N.C. Cook, e. a. (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, pp. 66-76.
- Naidu, e. a. (2002). Protective effect of Gingko hi/aha extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, pp. 894-900.
- National Cancer Institute. (2015, Febrero 9). *National Cancer Institute*. Retrieved Julio 01, 2016, from <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>
- Norman K. Hollenberg, e. a. (2009). Flavanols, the Kuna, cocoa consumption, and nitric oxide. *Journal of the American Society of Hypertension*, pp. 105–112.
- O Marcillat, e. a. (1989). Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. *Biochemical Journal*, pp.181-189.
- Oktay Tacar, e. a. (2013). Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, pp. 157–170.
- Olli J. Arola, e. a. (2000). Acute Doxorubicin Cardiotoxicity Involves Cardiomyocyte Apoptosis. *Cancer Research*, pp. 1789-1792.
- Organization, e. a. (2014). *World Cancer Report 2014*. France: International Agency for Research on Cancer.
- P Vejpongsa, e. a. (2014). Topoisomerase 2 β : A Promising Molecular Traget for Primary Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Clinical Farmacology and Therapeutics*, pp. 45-52.
- Pandey, e. a. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, pp. 1-17.
- Papadopoulou, e. a. (1999). Structural and Functional Impairment of Mitochondria in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in Mice: Suppression of Cytochrome c Oxidase II Gene Expression. *Biochemical Pharmacology*, pp. 481–489.

- Patel, J. M. (2008). A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*, pp.1-5.
- Paul D. Ray, e. a. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signa*, pp. 981–990.
- Peter Georgakopoulos, e. a. (2010). Cardioprotective effect of metoprolol and enalapril in doxorubicin-treated lymphoma patients: A prospective, parallel-group, randomized, controlled study with 36-month follow-up. *American Journal of Hematology*, pp. 894-896.
- Pietta, e. a. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod*, pp.1035–1042.
- Pilar Ortiz-Vilchis, e. a. (2014). Co-administration of the flavanol (-)-epicatechin with doxycycline synergistically reduces infarct size in a model of ischemia reperfusion injury by inhibition of mitochondrial swelling. *European Journal of Pharmacology*, pp 76-82.
- Pimprapa Vejpongsa, e. a. (2014). Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity Challenges and Opportunities. *Journal of the American College of Cardiology*, pp. 938-945.
- Reid Hayward, e. a. (2007). Doxorubicin Cardiotoxicity in the Rat: An In Vivo Characterization. *Journal of American Association for Laboratory Animal Science*, pp. 20-32.
- Robert C. Kane, e. a. (2008). Dexrazoxane (Totect™): FDA Review and Approval for the Treatment of Accidental Extravasation Following Intravenous Anthracycline Chemotherapy. *The Oncologist*, pp.445–45.
- Roberto Corti, e. a. (2009). Cocoa and Cardiovascular Health. *Circulation*, pp. 1433-1441.
- Ronny S. Jiji, e. a. (2012). Non-invasive imaging and monitoring cardiotoxicity of cancer therapeutic drugs. *Journal of Nuclear Cardiology*, pp. 377-388.
- Sabry M. Attia, e. a. (2010). Proanthocyanidins Produce Significant Attenuation of Doxorubicin-Induced Mutagenicity via Suppression of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*, pp. 404-413.
- Sadurska, e. a. (2015). Current Views on Anthracycline Cardiotoxicity in Childhood Cancer Survivors. *Pediatric Cardiology*, pp. 1112–1119.
- Sailesh Malla, N. P. (2010). Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. *Elsevier*, pp. 427-435.
- Sandra M Swain, F. S. (2013). A Retrospective Analysis of Three Trials. *American Cancer Society*, pp. 2869-2879.
- Schlitt A, e. a. (2014). Cardiotoxicity and oncological treatments. *Deutsches Arzteblatt International*, pp. 161-168.
- Serna, e. a. (2010). Insuficiencia Cardíaca Crónica. *Comité de Insuficiencia Cardíaca*, pp. 1-13.

Sewa S. Legha, e. a. (1982). Reduction of Doxorubicin Cardiotoxicity by Prolonged Continuous Intravenous Infusion. *Ann Intern Med.*, pp. 133-139.

Shashank Kumar, e. a. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* , pp.1-16.

Shashi Raj, e. a. (2014). Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: A Review of Pathophysiology Diagnosis and Treatment. *Curr Treat Options Cardio Med*, pp. 1-14.

Soumil Narayan, e. a. (2016). Frequent mutations in acetylation and ubiquitination sites suggest novel driver mechanisms of cancer. *Genome Medicine*, pp. 8-55.

Steven E. Lipshultz, e. a. (2013). Long-term Cardiovascular Toxicity in Children, Adolescents, and Young Adults Who Receive Cancer Therapy: Pathophysiology, Course, Monitoring, Management, Prevention, and Research Directions: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, pp. 1927-1995.

Stock, e. a. (1999). Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase. *Science*, pp. 1700-1705.

Swain SM, e. a. (2003). Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*, pp. 2869-79.

Swen Langer, e. a. (2011). Flavanols and Methylxanthines in Commercially Available Dark Chocolate: A Study of the Correlation with Nonfat Cocoa Solids. *J. Agric. Food Chem*, pp. 8435–8441.

Tokarska-Schlattner, e. a. (2006). New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetic. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, pp. 1-17.

Tomas Simunek, e. a. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, pp. 154-171.

Valero, e. a. (2014). Mitochondrial Biogenesis: Pharmacological Approaches . *Current Pharmaceutical Design*, pp. 5507-5509.

van Acker, e. a. (1996). Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, pp 95-101.

Volkova, e. a. (2011). Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment. *Current Cardiology Reviews*, pp. 214-220.

Wallace, e. a. (2003). Doxorubicin-Induced Cardiac Mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology* , 105–115.

Weiss RB, e. a. (1986). Anthracycline analogs: the past, present, and future. *Cancer Chemother Pharmacol.*, pp. 185-97.

Wouters, e. a. (2005). Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *British Journal of Haematology*, pp 559–679.

Yanti Octavia, e. a. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From Molecular Mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, pp. 1213-1225.

Yik Hoe Ngan, e. a. (2016). A comparison between liposomal and nonliposomal formulations of doxorubicin in the treatment of cancer: An updated review. *Archives of Pharmacy Practice*, pp. 1-13.

Yogesh C. Awasti, e. a. (1975). Purification and Properties of Human Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *The Journal Of Biological Chemistry*, pp. 5144-5149.

Yuan, e. a. (2014). Overexpression of Mitofilin in the Mouse Heart Promotes Cardiac Hypertrophy in Response to Hypertrophic Stimuli. *Antioxidants & Redox Signaling*, pp. 1693-1707.