

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN NUTRICIÓN
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ASTAXANTINA EN RATONES
TRATADOS CON DOXORRUBICINA SOBRE LA HISTOMORFOLOGÍA DEL
MIOCARDIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN

PRESENTA:

P.L.N. LIZBETH COSME HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. EN C. RIGOBERTO OROS PANTOJA

CODIRECTORA DE TESIS:

DRA. EN C. KEILA ISAAC OLIVÉ

REVISORAS:

DRA. EN B. ALEJANDRA DONAJÍ BENÍTEZ ARCINIEGA

DRA. EN C.S. LILIANA ARANDA LARA

TOLUCA, MÉXICO OCTUBRE. 2024.

Efecto de la suplementación con Astaxantina en ratones tratados con
Doxorrubicina sobre la histomorfología del miocardio.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1: Vasculatura cardíaca macroscópica	5
Figura 2: Histología comparativa del miocardio de fibras cardiacas orientadas longitudinalmente	6
Figura 3. Estructura química de la doxorubicina	8
Figura 4. Estructura de la astaxantina	16
Figura 5: ubicación de la molécula de astaxantina en la membrana celular.....	17
Figura 6. Selección y cuantificación colorimétrica del número de núcleos.....	32
Figura 7. Miocardio ventricular de ratón control (H&E).....	35
Figura 8. Miocardio ventricular de ratón suplementado con astaxantina (H&E).....	36
Figura 9. Miocardio ventricular de ratón tratado con doxorubicina (H&E).....	36
Figura 10. Miocardio ventricular de ratón tratado con astaxantina-doxorubicina (H&E).....	37
Figura 11. Espesor de los cardiomiocitos	37
Figura 12. Cantidad de núcleos.....	38
Figura 13. Área nuclear.....	38
Figura 14. Miocardio ventricular de ratón control (Tinción Masson).....	39
Figura 15. Miocardio ventricular de ratón suplementado astaxantina (Tinción Masson).....	40
Figura 16. Miocardio ventricular de ratón tratado doxorubicina (Tinción Masson).....	40
Figura 17. Miocardio ventricular de ratón tratado astaxantina-doxorubicina (Tinción Masson)....	41
Figura 18. Miocardio ventricular de ratón control (Tinción PAS).....	42
Figura 19. Miocardio ventricular de ratón suplementado astaxantina (Tinción PAS).....	42
Figura 20. Miocardio ventricular de ratón tratado con doxorubicina (Tinción PAS).....	43
Figura 21. Miocardio ventricular de ratón tratado con astaxantina-doxorubicina (Tinción PAS) ..	43
Figura 22. Miocardio ventricular de ratón control (Inmunohistoquímica FAP).....	44

Figura 23. Miocardio ventricular de ratón suplementado astaxantina
(Inmunohistoquímica FAP)..... 45

Figura 24. Miocardio ventricular de ratón tratado con doxorubicina
(Inmunohistoquímica FAP)..... 45

Figura 25. Miocardio ventricular de ratón tratado con Astaxantina-doxorubicina
(Inmunohistoquímica FAP).....46

TABLA

Tabla 1. Sistemas de defensa: antioxidantes endógenos y exógenos..... 15

INDICE

Resumen	1
I. Marco Teórico	4
Introducción	4
1. Anatomía e histología comparativa del aparato cardiovascular	5
2. Doxorrubicina	7
2.1. Cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina	8
2.2. Fisiopatología	9
2.3. Remodelado cardiaco inducido por doxorrubicina	10
2.4. Alteraciones en el metabolismo energético	11
2.5. Activación de proteasas	11
2.6. Efectos sobre el miocardio	12
3. Agentes cardioprotectores	13
3.1. Antioxidantes	14
3.2. Astaxantina	16
3.2.1. Efectos de la astaxantina sobre el sistema Cardiovascular	19
3.2.2. Efecto de la astaxantina en la cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina	19
II. Planteamiento del problema	20
III. Justificación	21
IV. Hipótesis de trabajo	22
V. Objetivos	23
V.I. Objetivo general	23

V.II	Objetivos específicos	23
VI.	Métodos	24
VI.1	Diseño del estudio	24
VI.2	Operacionalización de variables	24
VI.3	Universo de trabajo y muestra	25
VI.4	Desarrollo del proyecto	25
VI.5	Límite de tiempo y espacio	33
VI.6	Diseño de análisis	33
VII.	Implicaciones éticas	34
VIII.	Resultados	35
VIII.1	Efecto de la astaxantina y doxorrubicina sobre la histomorfología del miocardio	35
VIII.2	Efecto de la astaxantina y doxorrubicina sobre la cantidad de colágeno	39
VIII.3	Efecto de la astaxantina y doxorrubicina sobre el almacenamiento de glucógeno	41
VIII.4	Efecto de la doxorrubicina y la astaxantina sobre producción de FAP	44
IX.	Discusión	47
	Conclusiones	50
	Recomendaciones	50
X.	Bibliografía	51

Resumen

La doxorubicina es un fármaco quimioterapéutico ampliamente utilizado, el cual de manera adversa puede causar cardiotoxicidad. Se sabe que puede provocar un aumento en la generación de radicales libres que dañan el tejido cardíaco, mientras que la astaxantina al ser un potente antioxidante, tiene la capacidad de neutralizar gran cantidad de radicales libres, lo que permitiría disminuir estrés oxidativo y el daño celular subsecuente. El objetivo de este estudio fue determinar si la suplementación con astaxantina reduce los efectos cardiotóxicos de la doxorubicina en ratones tratados con doxorubicina de manera crónica. Metodología: Se emplearon ratones hembra CD1 distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos: 1. control, 2. suplementado con astaxantina (vía oral a razón de 5 mg/Kg de peso diariamente por cinco semanas), 3. tratado con doxorubicina (por vía intraperitoneal a razón de 5mg/kg/peso cada semana por cinco semanas consecutivas), y 4. Tratado con doxorubicina + astaxantina. El análisis histomorfológico se realizó a partir de tinciones (hematoxilina & eosina “H&E”, Masson, PAS e inmunohistoquímica para el biomarcador del factor activador de fibroblastos “FAP”), mientras que el análisis cualitativo, se realizó mediante análisis por software de las fotomicrografías de los grupos de estudio. Resultados: Los grupos control y suplementado con astaxantina, presentaron características histomorfológicas en todas las técnicas empleadas. En el grupo tratado con doxorubicina, de manera cualitativa se observó disminución en la cantidad de núcleos en los cardiomiocitos, así como un incremento en la expresión de FAP. En el análisis por software, el grupo tratado con doxorubicina, fue el que presentó cambios más significativos respecto a los demás grupos de estudio: en la tinción con hematoxilina & eosina se observó disminución en la cantidad de núcleos e incremento en el área nuclear, aumento en el espesor de los cardiomiocitos, disminución en los niveles de glucógeno miocárdico e incremento en la expresión de FAP. No se observaron cambios de reparación por fibrosis en la tinción de Masson, sin embargo, se presentó un incremento en la tinción citoplasmática por la fucsina ácida. Conclusión: Aunque no se observaron cambios sugestivos de fibrosis, al análisis cuantitativo por software permitió evidenciar cambios histomorfológicos que podrían indicar mecanismos tempranos de daño y reparación ante la toxicidad por doxorubicina. En contraparte, en el grupo tratado con astaxantina y doxorubicina estos cambios fueron menores. Esto sugiere que la astaxantina podría

disminuir los efectos cardiotoxicos de la doxorubicina en pacientes bajo tratamiento oncológico. Se requieren estudios adicionales a fin de evaluar si los tratamientos aplicados evolucionan a cambios tardíos que indiquen mayor daño y reparación del miocardio, o en su defecto, evaluar otros esquemas de doxorubicina a mayor dosis y tiempo de tratamiento.

Palabras clave: doxorubicina, cardiotoxicidad, astaxantina, antioxidantes, estrés oxidativo, modelo murino.

Summary

Doxorubicin is a widely used chemotherapeutic drug, which can adversely cause cardiotoxicity. It is known that it can cause an increase in the generation of free radicals that damage cardiac tissue, while astaxanthin, being a potent antioxidant, has the ability to neutralize a large amount of free radicals, which would allow reducing oxidative stress and subsequent cellular damage. The objective of this study was to determine whether astaxanthin supplementation reduces the cardiotoxic effects of doxorubicin in mice treated with doxorubicin chronically. Methods: Female CD1 mice were randomly assigned to four groups: 1. control, 2. supplemented with astaxanthin (oral at a rate of 5 mg/kg of weight daily for five weeks), 3. treated with doxorubicin (intraperitoneally at a rate of 5 mg/kg/weight each week for five consecutive weeks), and 4. treated with doxorubicin + astaxanthin. Histomorphological analysis was performed using stains (hematoxylin & eosin "H&E", Masson, PAS and immunohistochemistry for the fibroblast activating factor "FAP" biomarker), while qualitative analysis was performed using software analysis of photomicrographs of the study groups. Results: The control and astaxanthin-supplemented groups presented histomorphological characteristics in all the techniques used. In the group treated with doxorubicin, a qualitative decrease in the number of nuclei in cardiomyocytes was observed, as well as an increase in the expression of FAP. In the software analysis, the group treated with doxorubicin was the one that presented the most significant changes compared to the other study groups: in the staining with hematoxylin & eosin, a decrease in the number of nuclei and an increase in the nuclear area, an increase in the thickness of the cardiomyocytes, a decrease in the levels of myocardial glycogen and an increase in the

expression of FAP were observed. No changes in fibrosis repair were observed in the Masson stain, however, an increase in cytoplasmic staining by acid fuchsin was presented. Conclusion: Although no changes suggestive of fibrosis were observed, the quantitative analysis by software showing histomorphological changes that could indicate early mechanisms of damage and repair in the face of doxorubicin toxicity. In contrast, in the group treated with astaxanthin and doxorubicin these changes were smaller. This suggests that astaxanthin could reduce the cardiotoxic effects of doxorubicin in patients undergoing cancer treatment. Additional studies are required to evaluate whether the treatments applied lead to late changes that indicate greater myocardial damage and repair, or failing that, to evaluate other doxorubicin regimens at higher doses and treatment times.

Keywords: doxorubicin, cardiotoxicity, astaxanthin, antioxidants, oxidative stress, murine model.

I. Marco Teórico

Introducción

Diferentes estudios refieren sobre los efectos secundarios del uso de antraciclinas en el tratamiento de diferentes tipos de neoplasia (1). Uno de los fármacos citotóxicos más utilizado dentro de los esquemas de tratamiento oncológico es la doxorubicina, debido a su eficacia y menor coste, sin embargo, este fármaco se ve asociado al desarrollo de cardiotoxicidad temprana o tardía, siendo la segunda el padecimiento de mayor incidencia entre los pacientes. Este daño cardíaco consecuente al uso de doxorubicina representa un impacto significativo en los sistemas económicos y de salud, puesto que su farmacodinamia interviene directamente en la transcripción del ADN celular, por lo tanto, la cardiotoxicidad tanto tardía como temprana, no solo se manifestará en el paciente oncológico, sino también en su descendencia (2).

Una dieta deficiente en antioxidantes y diversas comorbilidades que suelen manifestarse en los pacientes oncológicos, ofrecen el ambiente adecuado para el desarrollo de afecciones cardíacas mediadas por el incremento de radicales libres consecuentes al uso de doxorubicina. Por tal motivo, en los últimos años se han realizado estudios para evaluar diferentes agentes cardioprotectores para estos casos específicos de cardiotoxicidad. Dentro de estos agentes, los antioxidantes han demostrado eficacia en la reducción del crecimiento y la metástasis de diferentes tumores, así como una reducción de los niveles de radicales libres generados en el organismo a causa del tratamiento quimioterapéutico. Actualmente la astaxantina se ha considerado uno de los antioxidantes con mayor eficacia en comparación con la vitamina E y la vitamina C. Este carotenoide ha sido objeto de estudio en los últimos años como coadyuvante en el tratamiento de diferentes patologías, dando resultados significativos de mejora ya sea en los signos y síntomas de la enfermedad o en la farmacocinética de diferentes tratamientos. A nivel cardiovascular, se ha observado que la astaxantina mejora los niveles de PAS, CT y LDL (3).

Estas observaciones en la eficacia del efecto antioxidante de la astaxantina han despertado un interés particular para ser utilizado como suplementación en los pacientes oncológicos en tratamiento con doxorubicina, puesto que su capacidad de reducir el número de radicales

libres se presenta como una herramienta útil en reducir el estrés oxidativo del tratamiento involucrado en la manifestación de cardiotoxicidad tardía.

1. Anatomía e histología comparativa del corazón

El corazón es como una doble bomba de cuatro cámaras que impulsa la sangre por todo el cuerpo. La circulación pulmonar, gestionada por el corazón derecho, dirige la sangre desoxigenada a los pulmones. Paralelamente, el área izquierda del corazón impulsa la sangre oxigenada a través de la circulación sistémica. En humanos adultos, el corazón presenta dimensiones promedio de 12 x 9 x 6 cm y un peso aproximado de 250 g en mujeres y 300 g en hombres.

Anatómicamente, en el humano y ratón, el corazón se divide por tabiques en cuatro cámaras: aurículas y ventrículos derechos e izquierdos. Sin embargo, existen diferencias morfológicas significativas entre roedores y humanos, incluyendo variaciones en la configuración general, la distribución de las arterias coronarias, la estructura valvular, el espesor de las capas pericárdica, epicárdica y endocárdica, así como en la prominencia del esqueleto fibroso (4).

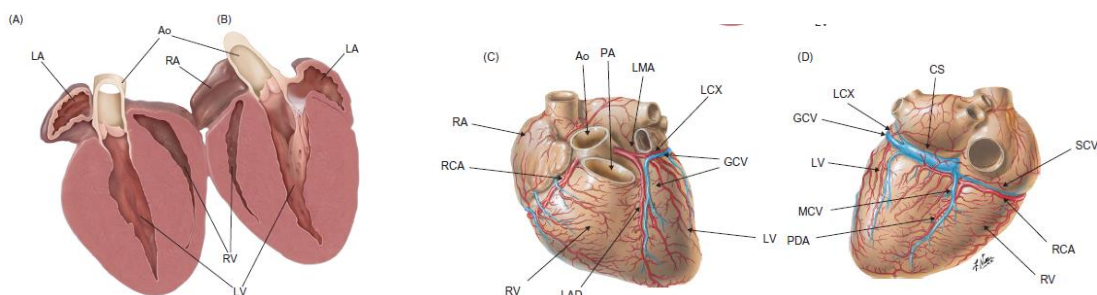


Figura 1: Vasculatura cardíaca macroscópica. (A y B) Anterior (A) y posterior. (B) Superficies del corazón del ratón. Fuente: Elsevier, Inc., www.netterimages.com. Los vasos que son fácilmente visibles en la superficie del corazón del ratón son las venas cardíacas. Las arterias coronarias son intramiocárdicas y no son fácilmente visibles en la superficie. (C y D) Esternocostal (C) y diafrágica. Fuente: Elsevier, Inc., www.netterimages.com. (D) Superficies del corazón humano. A diferencia del ratón, muchos de los grandes vasos del corazón humano son epicárdicos y, por lo tanto, pueden verse externamente. En estos diagramas, las arterias coronarias están resaltadas en rojo y las venas en azul. Ao, aorta; CS, seno coronario; GCV, vena cardíaca mayor; LAD, arteria coronaria descendente anterior izquierda; LCX, arteria coronaria circunfleja izquierda; LMA, arteria coronaria principal izquierda; LV, ventrículo izquierdo; MCV, vena cardíaca media; PA, arteria pulmonar; PDA, arteria coronaria descendente posterior; RA, aurícula derecha; RCA, arteria coronaria derecha; RV, ventrículo derecho; SCV, vena cardíaca pequeña. Fuente: Paneles C y D Elsevier, Inc., www.netterimages.com.

Histológicamente el corazón se compone de endocardio, miocardio y epicardio. La morfología característica del miocardio humano presenta células alargadas y bifurcadas denominadas cardiomiocitos, las cuales están unidas en sus extremos, con una longitud de 80-100 μm y un espesor de 15 μm aproximadamente, pueden presentar uno o dos núcleos ovales en el centro de la célula. El miocardio auriculo-ventricular de humano y ratón, presentan características histológicas similares, en los ratones los cardiomiocitos son generalmente binucleados, mientras que, en el humano, son mononucleados. Estas células forman columnas que se anastomosan irregularmente. En la unión entre dos células se presenta una línea transversal oscura, estas áreas especializadas para la unión se denominan discos intercalares (5)

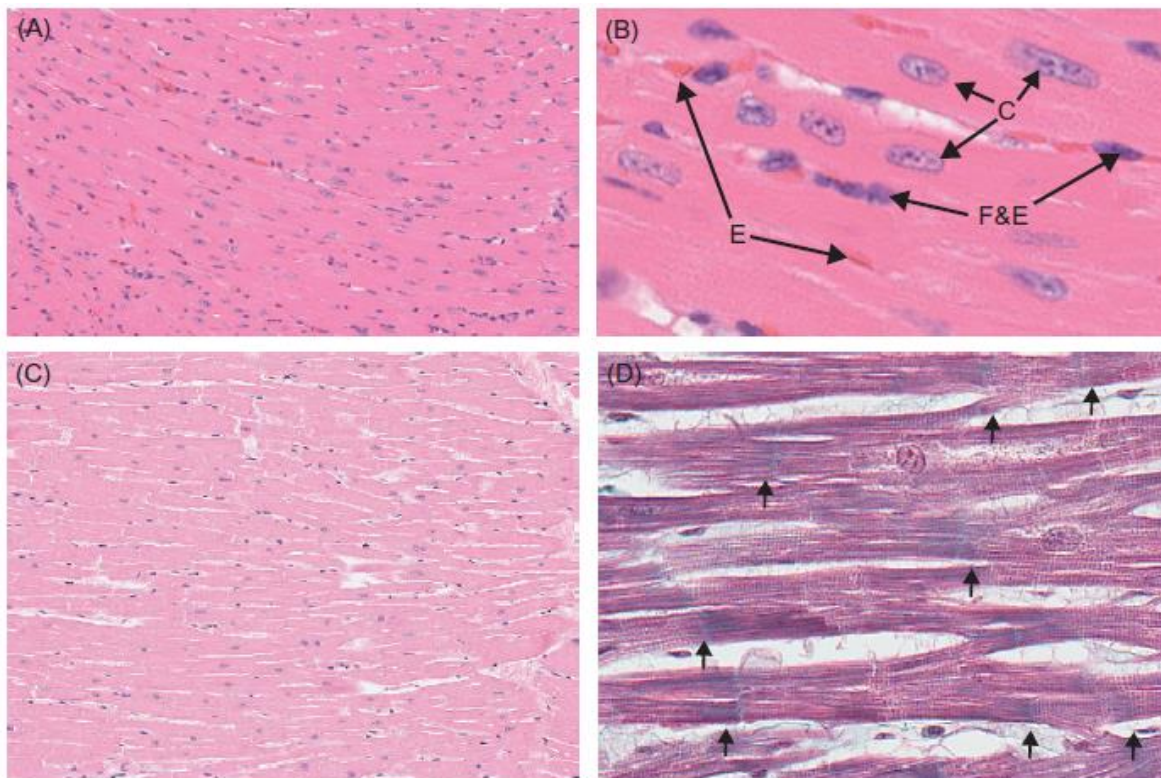


Figura 2: Histología comparativa del miocardio de fibras cardiacas orientadas longitudinalmente. (A y B) Miocardio del ventrículo izquierdo del ratón. (C) Miocardio del ventrículo izquierdo humano con bajo aumento. (D) Miocardio del ventrículo izquierdo humano a gran aumento y teñido con Tricrómica de Gromori (4)

Las células funcionales del miocardio se clasifican en cardiomiocitos atriales, nodales, de conducción y ventriculares, estos últimos se caracterizan por ser más largos, con una organización sarcomérica más definida, un eficiente sistema de túbulos T y abundante red mitocondrial conformada por tres tipos de mitocondrias: intermiofibrilares, subsarcolémicas y perinucleares (6). Las intermiofibrilares suministran energía para la contracción muscular, mientras que las subsarcolémicas proporcionan energía para el transporte iónico a través de la membrana celular. Las mitocondrias perinucleares, por su parte, están involucradas en la producción de energía para los procesos de transcripción genética. Esta especialización mitocondrial garantiza un suministro eficiente de energía para las diversas funciones del corazón y hace a los cardiomiocitos ventriculares responsables de la contracción principal (7).

La capacidad de contracción y relajación está mediada por la interacción de iones Ca^{2+} y Na^{+} . El rol de los cardiomiocitos en la conducción de impulsos eléctricos se lleva a cabo gracias a la unión de los discos intercalados, actividad que permite una armonizada contracción cardíaca para un bombeo rítmico de la sangre. Mientras que la adaptabilidad es la capacidad del miocardio para adaptarse a determinados cambios en la homeostasis que impliquen un aumento del volumen sanguíneo como lo es el embarazo o el ejercicio físico, esta adaptabilidad ocurre gracias a modificaciones en la frecuencia y fuerza de contracción de los cardiomiocitos (8,9).

2. Doxorrubicina

La doxorrubicina (DOXO) es un antibiótico del grupo de antraciclinas considerado citotóxico, se obtiene de la cepa *Streptomyces peucetius* var *caesius* (10). Se utiliza en el tratamiento quimioterapéutico de neoplasias hematológicas y sólidas, como: cáncer de pulmón microcítico, de mama, ovario, vejiga, osteosarcoma, sarcoma avanzado de tejidos blandos, sarcoma de Ewing, linfoma no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, mieloma múltiple avanzado, carcinoma de endometrio, tumor de Wilms, cáncer papilar/folicular avanzado de tiroides, carcinoma anaplásico de tiroides y neuroblastoma avanzado etc. (1)

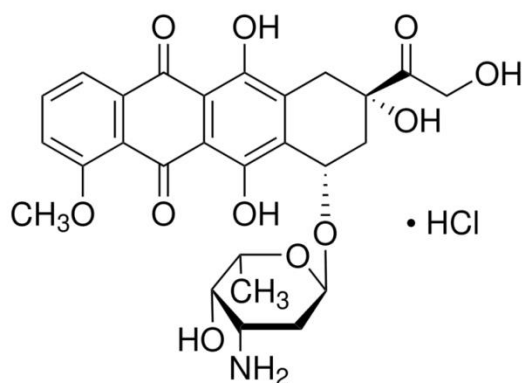


Figura 3. Estructura química de la doxorrubicina. Fórmula: $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$

2.1 Cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina

A pesar de su efectividad antineoplásica, la DOX posee efectos adversos relacionados con la cardiotoxicidad (11). Se ha descrito que la dosis acumulada de antraciclina causa daño irreversible hasta en 5% de los pacientes (12), y presenta una tasa de mortalidad del 60% (13). Esta afección se caracteriza por la reducción en la fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI), cardiomegalia, edema pulmonar, disnea, o derrame pleural (14)

Esta cardiotoxicidad puede ser aguda si se manifiesta 2-3 días después de la primera dosis, con una incidencia del 11% (15); mientras que crónica puede ser temprana si se manifiesta hasta un año después de la última dosis, o tardía si ocurre después de esta etapa. En esta última, la tasa de mortalidad es dosis dependiente de 3-5% por 400 mg/m² y asciende a 18-48% por 700 mg/m² (13) En contraparte, la cardiotoxicidad también puede manifestarse a largo plazo, incluso después de concluir la terapia con Doxorrubicina (2).

Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de cardiotoxicidad por tratamiento con antraciclina, se encuentran el sexo femenino (debido a menor masa y gasto cardíaco), la dosis acumulada, padecimientos cardiovasculares y metabólicos preexistentes, falla renal, longevidad y tratamientos previos con otros citotóxicos o radioterapia (16)

2.2 Fisiopatología

Entre las características específicas del corazón que lo vuelven más susceptibles a los efectos citotóxicos de la doxorubicina, se encuentran la alta tasa metabólica, la acumulación del fármaco, una limitada capacidad de reparación de las células cardíacas y el efecto directo de la doxorubicina sobre el ADN de los cardiomiocitos, lo que puede llevar a la muerte celular y a la disfunción cardíaca.

Aunque no se han definido con precisión los mecanismos por los cuales la doxorubicina induce cardiotoxicidad, dos de las principales rutas asociadas a la cardiotoxicidad por DOXO es la inhibición de la Topoisomerasa II y la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (17).

La inhibición de la Topoisomerasa II reduce la síntesis de ADN y ARN, a su vez disminuye la reparación celular, provoca agotamiento del retículo endoplásmico liso, senescencia precoz y muerte celular. En consecuencia, la apoptosis de cardiomiocitos resulta en reducción en la fracción de eyección o falla cardíaca (18).

La producción de Especies Reactivas de Oxígeno se debe a que, en su estructura molecular, la doxorubicina contiene múltiples radicales hidroxilos “ROS”, que por acción enzimática de la eNOS endotelial o su reducción por la NADPH oxidasa, la convierte en radical Doxorubicina semiquinona, la cual contiene radicales superóxidos y oxígeno singlet adicionales (pathway of cardiac). Por tanto, la molécula de DOXO modificada, se considera un radical libre más eficiente (19). En consecuencia, el aumento de esta capacidad oxidativa y mayor producción de ROS, provoca alteraciones estructurales y funcionales a nivel mitocondrial, como aumento en permeabilidad e inhibición del potencial de membrana. En conjunto, el daño celular y mitocondrial resulta en cardiotoxicidad (20,21)

Tanto el daño en la transcripción del ADN y ARN, como el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno tienen acción directa, lo que genera sarcopenia cardíaca caracterizada por la reducción e hipertrofia sobre los cardiomiocitos, y a su vez se limita la regeneración del músculo cardíaco. Esta serie de eventos dan como resultado fibrosis del miocardio y remodelación ventricular que son las responsables de los diferentes signos y síntomas de la cardiotoxicidad (22)

2.3 Remodelado cardiaco inducido por doxorrubicina

El corazón es un órgano que tiene la capacidad de adaptarse ante alguna agresión o sobrecarga de esfuerzo, este proceso de remodelado o plasticidad cardiaca, comprende una fase inflamatoria, fase proliferativa y una fase de regeneración (23). Las células cardiacas que han sufrido necrosis o apoptosis promueven la fase inflamatoria, la cual desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno y cascadas de citoquinas. Estas últimas promueven la proliferación celular y la síntesis de la MEC por la migración de fibroblastos (20), los cuales utilizan metaloproteinasas (MMPs) para degradar la matriz extracelular dañada, facilitan la migración de células y formación de nuevos vasos sanguíneos. Durante la fase inflamatoria la MMP-2 y las colagenasas participan en la remodelación del tejido. En la fase proliferativa las MMPs 1, 3, 9 y 10 contribuyen a la angiogénesis (24,25)

En relación a este remodelado cardiaco, la fibrosis sugiere un cambio tardío en la reparación posterior a un proceso inflamatorio, el cual está relacionado directamente con la cardiotoxicidad inducida por el tratamiento con doxorrubicina.

Colágeno

El colágeno es una glicoproteína que representa el 25% de la proteína corporal, el humano cuenta con 28 tipos diferentes y se encuentran predominantemente en hueso, tendones, piel, cartílago, arterias, pulmón e hígado. El colágeno tipo I es el más abundante en tejidos conectivos. Se produce principalmente en los fibroblastos mediante la síntesis de precursores de colágeno I, se ensambla y procesa en la matriz extracelular (MEC). Esta proteína tiene funciones de soporte estructural para la preservación del tejido, reservorio de factores de crecimiento que intervienen en los mecanismos de reparación y coordinación de respuestas celulares que garantizan el correcto funcionamiento de las células. En la MEC del miocardio, sus propiedades se relacionan con la correcta funcionalidad y estructura del músculo cardiaco; en condiciones de estrés, la MEC desencadena respuestas biológicas que se relacionan con la disfunción ventricular y la patogénesis de la insuficiencia cardíaca (26)

El colágeno tipo I juega diferentes funciones tanto estructurales como de transporte químico en el remodelado cardiaco, entre ellas se encuentran el soporte estructural, reparación y cicatrización, modulación de la rigidez y regulación de la señalización celular

Se sabe que Doxorubicina provoca daño directo a los fibroblastos cardíacos humanos (HCF)(27), en consecuencia, se altera la síntesis de colágeno I. Así mismo, se ha sugerido que los cambios fibróticos pueden ser independientes a al proceso de muerte celular, como son: menor concentración de α -SMA, aumentó en la expresión de MMP-1, IL-6, TGF- β y colágeno en fibroblastos. También se induce la transdiferenciación y el aumento en la expresión de MMP1. En un estudio en ratas, se observó que la dosis acumulada de DOX también provocó fibrosis cardíaca, en donde los fibroblastos aumentaron la síntesis de colágeno I (28).

2.4 Alteraciones en el metabolismo energético

Glucógeno fosforilasa

La glucógeno fosforilasa es una enzima que funciona como catalizador en el proceso de la degradación del glucógeno, en el cuerpo humano existen tres isoformas: muscular (MGP), hepática (LGP) y cerebral/cardiaca (GPBB). La GPBB de los cardiomiocitos, tiene la función de proveer la energía necesaria para las actividades de contracción (28). Cuando se incrementa la demanda energética del miocardio o en casos de hipoxia, la GPBB facilita el metabolismo energético en un estado anaerobio, por ende, esta se verá aumentada y de manera proporcional se incrementará la degradación de glucógeno. Si ocurre daño a la membrana celular y esta aumenta su permeabilidad, la GPBB puede filtrarse al espacio extracelular, por tanto, el incremento de sus niveles plasmáticos, se considera un biomarcador de isquemia (37) y de daño al miocardio inducido por DOX (36). Al respecto, estudios comprueban un aumento de vesículas extracelulares que contienen GPBB con respecto al grupo control (38).

2.5 Activación de proteasas

Las metaloproteinasas (MMPs) son un grupo de enzimas proteolíticas de la MEC y tienen un papel fundamental en su estructura, cumplen con funciones de regulación, catálisis y estructuración. La función de estas enzimas se puede observar en procesos de daño epitelial,

endotelial y en procesos de cicatrización, el funcionamiento de las MMPs se encuentra mediado por inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs) los cuales también participan en la proliferación de fibroblastos y la diferenciación de miofibroblastos. Una reducción de los TIMPs dará como resultado daño en homeostasis del tejido que se manifiesta como un exceso de proteínas de la MEC causado por periodos prolongados de inflamación y fibrosis, esta sobreexpresión de MMPs causado por reducción de TIMPs también se relaciona con un aumento en el crecimiento tumoral. Los niveles elevados de MMPs 2, 8 y 9 se utilizan como indicadores de un proceso de cicatrización deficiente e hipertrofia celular. Específicamente la MMP-2 se encuentra de forma reducida en el centro de la lesión y con mayor concentración en la periferia de la misma, lo cual resulta en una formación excesiva de colágeno y un aumento en el área de tejido cicatrizado (30).

En un estudio con ratas, se observó que una dosis acumulada de 15 mg/kg de Doxorubicina por 4 semanas, disminuyó la actividad plasmática de las MMP-2 y MMP-9, de manera contraria, 8 semanas después del tratamiento, se observó principalmente un aumento de la actividad plasmática de la MMP-2 (39).

El efecto de la Doxorubicina en el aumento de actividad plasmática de las MMP-2 y 9 constituye un círculo vicioso, en el cual se ha observado que la sobreexpresión de MMP-9 aumenta la señalización de las vías de TGF- β y p-SMAD3, lo que favorece el crecimiento tumoral y genera una sobre producción de colágeno, incrementado así el efecto adverso del acumulamiento de colágeno en el tejido miocárdico que se traduce en las manifestaciones de la cardiotoxicidad como es la reducción de la fracción de eyección, cardiomegalia, arritmias, etc. (40).

2.6 Efectos sobre el miocardio

Se ha observado que el uso quimioterapéutico de Doxorubicina provoca múltiples efectos secundarios que se manifiestan directamente sobre la morfología del miocardio. En un estudio realizado en ratas Wistar, se observó congestión de miocitos y formación de micro trombos intravasculares coronarios. Lesiones que indican daño en la membrana y aumento de la permeabilidad celular. Así mismo, se ha observado reducción del flujo sanguíneo,

desintegración del endotelio vascular y agregación plaquetaria mediada por receptores GPIIb/IIIa 8888 En otro ensayo también se observó hemorragia, degeneración del miocardio, edema e infiltración de células proinflamatorias (24).

En un ensayo histológico en el miocardio de ratas Sprague Dawley tratadas con adriamicina. Se percibió un aumento de tejido conectivo, remodelación miocárdica inducida por la necrosis y apoptosis de los cardiomiocitos, aumento del número de fibroblastos y la alteración de proteínas estructurales del espacio extracelular (26). También se ha visto que el uso de la Doxorubicina genera atrofia de los cardiomiocitos (27).

Se ha observado también una degeneración tanto de las fibras musculares del miocardio por la pérdida de miofibrillas y como de las mitocondrias mediada por la producción de radicales libres de oxígeno y la peroxidación lipídica en la membrana mitocondrial. También se sabe que la inhibición de las proteínas apoptóticas Bcl-xL y Bcl2 es causada por la producción de ROS inducida por el tratamiento con DOX, esta misma también es responsable de los altos niveles de troponinas, CK y LDH debido a que ejerce un grave efecto sobre los cardiomiocitos (28).

Estos cambios morfológicos indican una remodelación causada por el daño y los mecanismos de reparación del miocardio (25).

3. Agentes cardioprotectores

Derivado del efecto secundario que tiene sobre el corazón el tratamiento con doxorubicina, desde la década de los 80 se ha generado un creciente interés por brindar tratamientos que puedan reducir este efecto secundario. En un estudio de revisión Se estudiaron diversos agentes (nanopartículas, polímeros, fitoquímicos y probióticos) para reducir la toxicidad cardíaca causada por el fármaco doxorubicina. Los nano medicamentos mostraron ser prometedores al disminuir los efectos secundarios en células sanas. Entre los polímeros, el PEG-NAG-DOX destaca por reducir la toxicidad cardíaca. Los fitoquímicos como el resveratrol, alicina y compuestos del árbol Terminalia arjuna también presentaron efectos beneficiosos. Finalmente, los probióticos Bifidobacterium y Lactobacillus demostraron

reducir el daño al miocardio. Estos resultados sugieren que estos agentes podrían ser útiles para proteger el corazón durante tratamientos con doxorubicina. (29).

Otro estudio realizado con enoxaparina muestra que puede reducir significativamente, pero no revertir por completo la cardiotoxicidad inducida por DOX, la enoxaparina reduce la cTnI y mejorar las puntuaciones histopatológicas de la miocardiopatía en comparación con el grupo DOX. ENX también disminuyó la MDA y aumentó el TAC del corazón de ratas a niveles relativamente comparables a los del control. También se observaron reducciones significativas en TNF- α , IL-1 β y caspasa-3 después del tratamiento con ENX en comparación con el grupo de DOX (30).

La suplementación de antioxidantes como alternativa para reducir el daño por doxorubicina, ha demostrado un efecto positivo al disminuir la producción de ROS y la inflamación en el daño hepático inducido por DOXO, reponer enzimas antioxidantes como la catalasa, la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa, reducción de la inflamación y las aberraciones cromosómicas, por ende, una menor afcción del ADN. Estos efectos se pueden observar en la reducción de los marcadores de cardiotoxicidad inducida por DOX, como es el caso de la caspasa-3 y Bax al mismo tiempo que aumenta las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. De interés particular, se comprobó que el uso de tiosulfato de sodio (STS) suprime la apoptosis cardíaca. (31–33)

3.1 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este al reaccionar-interactuar con los radicales libres de oxígeno y las especies reactivas de oxígeno (ROS) en comparación con otras moléculas presentes en un microambiente específico, como la membrana plasmática, el citoplasma, el núcleo o el líquido extracelular, protegiendo a las células del daño causado por los radicales libres (34).

El cuerpo humano cuenta con un sistema de defensa antioxidante que incluye tanto enzimas como compuestos no enzimáticos, los cuales se activan principalmente ante una alta

producción de ROS, mientras que la ingesta de antioxidantes exógenos a través de los alimentos resulta crucial para potenciar la acción de las defensas enzimáticas. Entre las enzimas antioxidantes más importantes se encuentran el superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD intracelular, Mn-SOD y SOD extracelular) (35).

Las enzimas antioxidantes primarias actúan como una primera línea de defensa, transformando las especies reactivas de oxígeno (ROS) en sustancias inofensivas como el agua y el oxígeno molecular. Por otro lado, las enzimas antioxidantes secundarias, como la glutatión-reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, trabajan en conjunto con otros antioxidantes endógenos para neutralizar indirectamente las ROS. El ácido úrico, además de proteger a los glóbulos rojos de la destrucción, desempeña un papel crucial en la eliminación del oxígeno singlete, un tipo de ROS altamente reactivo (36).

Los antioxidantes de bajo peso molecular no enzimáticos, como la vitamina E y C, así como minerales como el selenio y el zinc, desempeñan un papel vital en la protección celular. Los flavonoides, que incluyen flavonoles, flavanoles, antocianinas, isoflavonoides, flavanonas y ácidos fenólicos, actúan como quelantes de iones metálicos de transición involucrados en la reacción de Fenton y como depurados de ROS (37).

Sistemas de defensa: antioxidantes endógenos y exógenos	
Antioxidantes enzimáticos endógenos	Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoxi-metionina-reductasas
Antioxidantes endógenos no enzimáticos	GSH (glutatión reducido), ácido úrico, bilirrubina, glutatión, albumina, melatonina, ácido dihidro-lipóico, metalotioneína, ubiquinol (o Co-enzima Q).
Antioxidantes exógenos	a) vitaminas: ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (Vitamina E), betacaroteno (pro-vitamina A).
	b) carotenoides: luteína, zeaxantina, licopeno, astaxantina.

	c) polifenoles: flavonoides (ej. catequinas) y no-flavonoides.
	d) otros compuestos: glucosinolatos (ej. isotiocianatos) y compuestos organoazufrados (ej. dialil-disulfido, dimetilsulfóxido).

Tabla 1. Sistemas de defensa: antioxidantes endógenos y exógenos.

3.2 Astaxantina

La astaxantina (ASTX) pertenece al grupo de los carotenoides, como el β -caroteno y β -criptoxantina. Se encuentra principalmente en especies marinas como salmón, camarones, cangrejos, langostas, krill antártico, así como en fuentes vegetales. La microalga *Haematococcus pluvialis* produce este carotenoide como un mecanismo de fotoprotección y señalización en condiciones de estrés como altas cantidades de luz ultravioleta (38,39)

La ASTX posee una potente capacidad antioxidante 500 veces más mayor que la Vitamina E y 10 veces más que el β -caroteno, atribuible a su estructura química que consiste en una cadena de dobles enlaces conjugados que presenta electrones descentralizados que le permite neutralizar radicales libres. Al momento se ha observado que esta actividad antioxidante se lleva a cabo mediante activación de la vía Nrf2/HO-1, aumentando la expresión de enzimas antioxidantes como HO-1, NQO1 y GST- α 1, se cree que sus efectos antioxidantes provienen de la eliminación directa de diferentes especies reactivas, tanto por la donación de electrones como por la unión con los radicales libres, reduciendo la inflamación y protegiendo a las células del daño oxidativo (38,40)

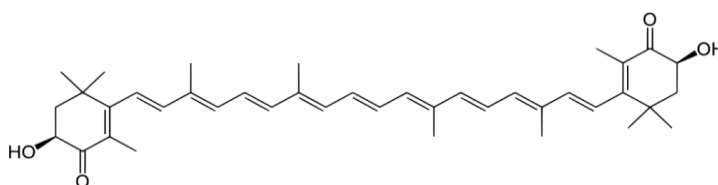


Figura 4. Estructura de la astaxantina. Fórmula C₄₀H₅₂O₄.

Los mecanismos de acción de la astaxantina se pueden observar en el medio intra y extra de celular, ya que su estructura molecular le permite adoptar una alineación transmembranal. Los grupos polares de la ASTX se superponen a las regiones polares de la membrana celular, mientras que la región no polar de la molécula se alinea en el centro de la membrana, esta

interacción permite mantener la estructura normal de la membrana. El efecto antioxidante en el espacio intracelular se debe a que los enlaces conjugados en la región central no polar de la ASTX le permiten eliminar radicales libres del interior de la célula al transportarlos a lo largo su propia cadena de carbono, de modo que son neutralizados por otros antioxidantes ubicados fuera de la membrana celular.

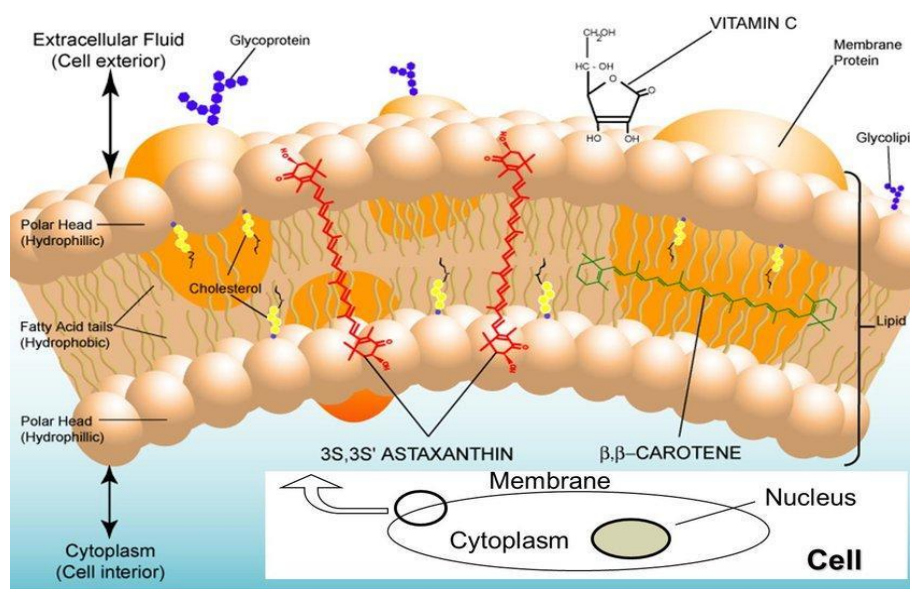


Figura 5: Ubicación de la molécula de astaxantina en la membrana celular. (41)

En los últimos años aumentó la investigación sobre el consumo de ASTX y sus efectos benéficos para la salud, asegurando que su consumo humano es viable, ya que posee propiedades farmacológicas sin efectos secundarios o toxicidad.

Los resultados de diferentes modelos experimentales, sugirieron que la suplementación con astaxantina permite regular múltiples mecanismos de la inmunidad celular y humoral para atenuar la inmunosenescencia. Por ejemplo, mediante la supresión de la vía NF-Kb, la elevación de los niveles de interleucina-2, inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG). Este efecto se relaciona con la salud gastrointestinal por reducción de la inflamación gástrica. También se han observado beneficios sobre la salud dérmica al tener un efecto fotoprotectores, de la misma manera se ha observado beneficios en la fertilidad masculina al mejorar la calidad espermática. En animales asmáticos suplementados con ASTX, se pudo

apreciar reducción de células pulmonares inflamatorias, en la secreción de moco y de la fibrosis pulmonar (42,43).

También se han reportado efectos neuroprotectores, ya que tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Al tener efectos anti apoptóticos reduce el déficit neurológico y el edema cerebral, lo que mejora las consecuencias del infarto cerebral (44). Debido a sus potentes efectos antioxidantes, también se han demostrado importantes beneficios en la salud osteoarticular y muscular, ya que reduce la atrofia muscular (50 - 51).

Este carotenoide también demostró tener efectos anticancerígenos al suprimir la metástasis en modelos murinos de cáncer de colon (52) y en otro estudio in vivo de cáncer de próstata, se redujo la expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (53).

Cada uno de estos beneficios a la salud se han visto relacionados con el efecto antioxidante de la astaxantina.

3.2.1 Efectos de la astaxantina sobre el sistema cardiovascular

Diferentes estudios demuestran el papel protector de la ASTX en modelos de enfermedades cardiovasculares, incluida isquemia y daño por reperfusión cardíaca. Un estudio con un modelo de microembolización coronaria en ratas reveló que la suplementación con astaxantina atenuó drásticamente la inducción de disfunción cardíaca, infarto de miocardio y apoptosis de cardiomiocitos, que se asoció con la supresión del estrés oxidativo a través de la activación de la señalización Nrf2/heme oxigenasa-1 (45)

Así mismo, también se observó una mejora en niveles de PAS, CT y LDL (11), debido a su capacidad para neutralizar el peroxinitrito (ONOO^-) (46), formando así 15-nitroastaxantina, lo cual retrasa la oxidación de la molécula LDL.

También, se ha demostrado que la ASTX reduce el tiempo de tránsito sanguíneo en un modelo de rata hipertensa, así como en humanos (47). Estudios en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) informaron que la suplementación con ASTX redujo significativamente la presión sistólica e indujo cambios histológicos significativos en la aorta asociados con una disminución de la rigidez vascular y la presión arterial (48). ()En un modelo SHR propenso

a accidentes cerebrovasculares, la ASTX redujo significativamente el daño estructural al ADN mediante el biomarcador de daño oxidativo 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) en orina. De manera concreta, se redujo la presión arterial sistólica y suprimió la trombogénesis en las venas cerebrales. Este efecto antitrombogénico pudo deberse a la vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria causada por una mayor biodisponibilidad de NO (49).

3.2.2 Efecto de la astaxantina en la cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina

El uso de astaxantina en la afección cardíaca por doxorrubicina ha arrojado resultados prometedores, evaluados mediante la medición de las funciones sistólica y diastólica, las cuales han manifestado una mejora significativa, así como en la medición de diferentes marcadores cardíacos como la troponina I, citocromo C, resultando en una reducción de los mismos, sugiere también la ASTX cuenta con propiedades de quelación de hierro, el cual se conoce como coadyuvante en el desarrollo de cardiotoxicidad por DOXO. En otro estudio se observó una reducción de los niveles de malondialdehído (MDA) y un aumento en los niveles de glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (SOD) en el tejido cardíaco. Estos resultados se pueden traducir en una reducción de la cardiotoxicidad al reducir el estrés oxidativo y la acumulación de hierro en el tejido cardíaco. (50)

II. Planteamiento del problema

La Doxorubicina al ser un antibiótico citotóxico, tiene como objetivo reducir la proliferación de las células cancerígenas. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual impide la replicación celular de las células cancerígenas, tiene efecto directo sobre la transcripción de ADN y ARN, la replicación celular de células sanas, la regeneración y mecanismos de reparación del tejido cardíaco, induciendo entonces cardiotoxicidad. La cardiotoxicidad inducida por la Doxorubicina de tipo tardía se ha caracterizado por ser dosis-dependiente y generar daños irreversibles, mismos que pueden heredarse debido al daño del tratamiento sobre el material genético. Esto implica que las afecciones cardíacas se presentan los pacientes tratados con Doxorubicina se puede manifestar en las siguientes generaciones, lo cual aumentaría la tasa de pacientes con daño cardíaco y los costos en salud que implicaría su tratamiento.

Si bien existe evidencia sobre la eficacia del tratamiento quimioterapéutico con Doxorubicina, la realidad del daño por cardiotoxicidad podría limitar su uso y eso implicaría un problema en el manejo de una enfermedad tan creciente y agresiva como el cáncer.

III. Justificación

El mecanismo de acción de la Doxorubicina ha demostrado tener efectos secundarios perjudiciales para la salud cardiovascular y aumentar el índice de mortalidad de los pacientes durante o después del tratamiento con este fármaco, por lo tanto, es necesario encontrar alternativas que ayuden a reducir o contrarrestar la cardiotoxicidad inducida por la Doxorubicina.

La posibilidad de poder reducir la cardiotoxicidad inducida por este antibiótico citotóxico a través de suplementos antioxidantes de alta calidad como la Astaxantina, se presenta como una oportunidad para aumentar la esperanza de vida a corto, mediano y largo plazo de los pacientes tratados con Doxorubicina, así como un beneficio a largo plazo para los sistemas de salud al reducir los costos elevados por tratamientos posteriores a pacientes que tendrían la probabilidad de presentar algún tipo de cardiopatía relacionada con la cardiotoxicidad.

Por tal motivo, surge la necesidad de evaluar el efecto cardioprotector de la Astaxantina para brindar a los pacientes oncológicos alternativas de soporte nutricional no invasivas y con costes accesibles que les garanticen menores efectos secundarios durante el tratamiento quimioterapéutico.

La nutrición en el cáncer es fundamental para combatir los efectos secundarios de los tratamientos como la pérdida de peso y las dificultades para comer, mejorando así la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, se necesita más investigación para identificar nutrientes específicos que puedan ayudar a combatir estos efectos y potencialmente mejorar la supervivencia. Los suplementos nutricionales personalizados podrían ser una herramienta clave en el futuro para tratar a los pacientes con cáncer.

IV. Hipótesis de trabajo

La administración concomitante de Astaxantina y Doxorrubicina atenuará la formación de radicales libres inducidos por la Doxorrubicina en las membranas celulares cardíacas, protegiendo así las estructuras celulares y mejorando la supervivencia de los cardiomiocitos, evidenciado por una reducción de los marcadores histológicos, lo que sugiere un efecto cardioprotector sobre la cardiotoxicidad inducida por el fármaco

V. Objetivos

V.I Objetivo general

Analizar los efectos de la suplementación con AST en animales tratados con DOX.

V.II Objetivos específicos

- Evaluar la histomorfología del miocardio de cada uno de los grupos, comparando número de núcleos,
- Detectar la presencia de colágeno en el miocardio como indicador de fibrosis
- Analizar el almacenamiento de glucógeno como indicador de actividad metabólica del cardiomiocito.
- Comparar la presencia de la proteína activadora de fibroblastos en el miocardio, como marcador de daño cardíaco, entre los grupos de experimentación.

VI. Métodos

VI.1 Diseño del estudio

Estudio experimental transversal casos y controles.

VI.2 Operacionalización de variables

Variable	Definición teórica	Definición operacional	Tipo de Variable	Nivel de medición	Indicadores
Variables independientes					
Peso corporal	Medida de la fuerza gravitatoria que ejerce la tierra sobre la masa de un individuo.	El peso corporal fue calculado con una báscula digital de precisión. Se colocaron al animal en la plataforma y se registró el valor del peso en gramos.	Cuantitativa continua	Intervalo	Peso en gramos.
Sexo	Condición orgánica que divide a los machos de las hembras	Hembra	Cualitativa	Categorica	Macho o hembra
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo.	11 semanas de edad	Cuantitativa	Continua	Semanas - mes
Variables intervinientes					
Dosis de Doxorubicina	Antibiótico citotóxico de uso quimioterapéutico perteneciente al grupo de las antraciclinas.	Dosis de Doxorubicina por vía intravenosa (5mg/kg de peso), cada semana por 5 semanas.	Cuantitativa continua	Intervalo	mg/kg de peso
Dosis de Astaxantina	Carotenoide antioxidante, obtenido de	Dosis de astaxantina de acuerdo al peso semanal de los ratones (5 mg/kg de	Cuantitativa continua	Intervalo	mg/kg de peso

	microalgas Haematococcus pluvialis.	peso). Suplementada por vía oral con micropipeta.			
Variables Dependientes					
Cambios en la histomorfología cardiaca	Disfunción del músculo cardiaco, causado por la exposición a un tratamiento antineoplásico, con la posibilidad de progresar a insuficiencia cardiaca.	El análisis histomorfológico y del tejido miocárdico se realizó mediante diferentes tinciones para evaluar: forma, tamaño celular, número de núcleos, cantidad de glucógeno y fibrosis en el tejido. El análisis de expresión de FAP se realizó mediante inmunohistoquímica.	Cualitativo, cuantitativo	Nominal	Número de núcleos en μ^2 . Espesor en micras lineales. Volumen en μ^2 .

VI.3 Universo de trabajo y muestra

Se utilizaron 20 ratones hembra CD1 (11 semanas de edad, 30-35 gr). Distribuidos aleatoriamente en 4 grupos experimentales: 1. Control (n=3); 2. Suplementado con Astaxantina (n=4); 3. Tratado con Doxorubicina (n=7) y 4. Tratado con Astaxantina y Doxorubicina (n=6). Obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

VI.4 Desarrollo del proyecto

Manejo de los animales de experimentación

Los ratones fueron alojados en cajas de policarbonato (34.5x49x17cm) en condiciones estándar de Bioterio (Ciclos de luz/obscuridad de 12x12; a 21°C en ambiente libre de ruido y 40-45% de humedad, alimentados con dieta “Rodent-Chow” y agua a libre demanda).

Esquema de suplementación con Astaxantina

La Astaxantina utilizada fue de la marca BioAstin ® Vegetarian Beadlets, 2.5%. Debido a su presentación en microperlas y propiedades liposolubles, la homogenización se realizó con 50 µL de Tween-20 y 1950 ml de agua de beber.

Se administró astaxantina diariamente por vía oral a razón de 5 mg/kg/peso por 5 semanas, iniciando desde las 10 semanas de edad de los animales hasta la conclusión del experimento. Esta administración se llevó de forma rápida mediante la sujeción de los ratones mediante una micropipeta.

Esquema de administración de Doxorrubicina

Se realizó la administración de una dosis semanal de 5mg/kg/peso de Doxorrubicina (Doxoget ® 50) por vía intravenosa.

Sacrificio de animales

Posterior al periodo de tratamiento, todos los grupos fueron sacrificados con una cámara de CO₂, a una presión de 20 mm/Hg y un flujo de 2-2.5 litros/minuto, con desplazamiento de O₂ (20% por minuto), de acuerdo con las normas bioéticas internacionales y la Norma Oficial Mexicana (NOM-033-ZOO-1999).

Obtención de muestras biológicas

La recolección de tejidos cardíaco de los animales se realizó después del proceso de sacrificio. Los corazones se lavaron con 5 ml de solución salina, se dividieron cuidadosamente por la mitad con un bisturí quirúrgico, ambas mitades contaban con aurícula y ventrículo correspondiente, para finalmente reservarse en formaldehído al 10% por 24 horas.

Fijación

El montaje de los órganos se hizo en cassetes histológicos debidamente rotulados y se fijaron en formol tamponado al 10%, elaborado con 100 ml de formaldehído (37-40% solución

concentrada), 900 ml de agua destilada, 4g/L NaHPO₄ (fosfato de sodio monobásico) y 6.5g/L Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico).

Inclusión en parafina

Posterior a las 48 horas de fijación, los órganos fueron incluidos en parafina a 58°C, con la siguiente técnica:

- **Deshidratación:**
Siguiendo un proceso de deshidratación, el tejido se sumergió por intervalos de 30 minutos en concentraciones crecientes de alcohol etílico (etanol 50°, etanol 70°, etanol 80°, etanol 90°, etanol 96°, etanol 100° I, etanol 100° II).
- **Diafanización:**
Se hizo una inmersión de los tejidos en dos periodos de 1.5 horas cada uno en Xileno I y posteriormente en Xileno II.
- **Inclusión y formación de bloque de parafina:**
Se llevo a cabo mediante dos incubaciones subsecuentes de 1.5 horas cada una en parafina I, parafina II y parafina III para inclusión a 60° C. Los tejidos se orientaron en moldes metálicos para inclusión para formar el bloque de parafina, posteriormente se desmontaron y se almacenaron.

- **Obtención de los cortes histológico**

Los cortes histológicos fueron realizados con un Reichert-Jung (Leica Biosystems, Lake Cook Road, IL, USA), con un espesor de 4 micras.

1. El bloque de parafina se orientó y fijó en los brazaletes del microtomo, asegurándose de que la muestra de tejido quedara perpendicular a la trayectoria de la navaja. Se realizó un desbaste grueso para eliminar el exceso de parafina y exponer la superficie de interés.
2. Con el microtomo ajustado a un espesor de 4 micras, se efectuaron cortes seriados mediante la rotación manual de la manivela. Cada sección se recogió de un baño de floración a una temperatura controlada de 40°C para facilitar su extensión y evitar arrugar.

3. Los cortes extendidos se transmitieron a portaobjetos limpios. Para asegurar una adhesión óptima, se colocaron los portaobjetos en una planchade calentamiento a 60°C durante 15 minutos, permitiendo que la parafina se fundiera y se adhiriera firmemente al vidrio.

Tinciones histológicas

Para iniciar el procesamiento histológico, las secciones de tejido se sometieron a un protocolo de desparafinación e hidratación. Este proceso consistió en sumergir las muestras secuencialmente en xileno (dos cambios), alcoholes de graduación decreciente (100%, 96%, 80%, 70%) y agua destilada, durante 10 minutos en cada baño. Esta etapa previa de desparafinación se realizó en cada uno de los tejidos empleados para las diferentes tinciones realizadas en este trabajo.

- Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E):
 1. Preparación de la muestra: Se inicio el proceso de desparafinación e hidratación de las muestras.
 2. Tinción nuclear: Posteriormente las muestras se sumergieron en una solución de Hematoxilina por 3 minutos para teñir los núcleos celulares, seguido de un lavado con agua corriente.
 3. Diferenciación: Se realizaron tres lavados en alcohol ácido para ajustar la intensidad de la tinción nuclear, seguido de un lavado con agua corriente.
 4. Azulado y contraste: Las muestras se pasaron a agua amoniacal por 3 minutos para realzar el color azul de los núcleos teñidos con hematoxilina, Nuevamente, se realizaron lavados con agua corriente.
 5. Tinción citoplasmática: Para contrarrestar los núcleos , las muestras se colocaron en solución de eosina durante 4 minutos, tiñendo el citoplasma de color rosado.
 6. Deshidratación y montaje: Finalmente, se procedió a deshidratar las muestras en volúmenes ascendentes de alcohol (70%, 80%, 96% I, 96% II, 100% I, 100% II) y Xileno (I y II). Finalmente se realizó el montaje de la muestra con una gota de resina sintética.

- Tinción de MASSON:
 1. Preparación de la muestra: Se inicio el proceso de desparafinación e hidratación de las muestras.
 2. Fijación: Las secciones se fijaron en liquido de Bouin durante una noche a temperatura ambiente para preservar la morfología celular.
 3. Lavado: Se realizaron lavados exhaustivos con agua corriente hasta eliminar los residuos de fijador y, posteriormente se enjuagaron con agua destilada.
 4. Tinción nuclear: Colorear con Hematoxilina Férrica de Weigert durante 10 minutos
 5. Lavado: Se repitió el procedimiento de lavado con agua corriente hasta aclarar las secciones y posteriormente enjuagar con agua destilada.
 6. Tinción citoplasmática: Se tiño el citoplasma con Fuscina Ácida-Escarlata de Briebrich durante 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada.
 7. Mordentado: Se colocó las secciones en solución de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolíbico durante 15 minutos.
 8. Tinción de colágeno: Se colocaron en Azul de Anilina de 10 a 15 minutos, para colorear las fibras de colágeno y enjuagaron con agua destilada.
 9. Diferenciación: Se utilizo ácido acético al 1% durante 3 minutos para diferenciar la tinción y resaltar los núcleos.
 10. Deshidratación y montaje: Finalmente, se deshidrataron las muestras en volúmenes ascendentes alcohol (70%, 80%, 96% I, 96% II, 100% I, 100% II, Xileno I, Xileno II, y se montaron con una gota de resina sintética.

- Tinción de PAS
 1. Preparación de la muestra: Se inicio el proceso de desparafinación e hidratación de las muestras.
 2. Oxidación: Las secciones se expusieron a una solución de ácido periódico al 0.5% por 15 minutos para oxidar los grupos hidroxilo de los carbohidratos presentes en los tejidos.

3. Lavado: Se realizaron lavados exhaustivos con agua destilada para eliminar el exceso de reactivo.
4. Tinción de PAS: Se tiñeron los grupos aldehídos formados en la oxidación previa con el reactivo de Schiff durante 15 minutos, lo que confiere un color magenta a las estructuras ricas en carbohidratos.
5. Lavado: Se repitió el procedimiento de lavado con agua corriente
6. Mordentado: Se sumergieron las secciones en una solución de ácido clorhídrico al 1% para mejorar la adhesión del colorante a los tejidos, posteriormente enjuagar con agua destilada.
7. Contraste: Para visualizar mejor los núcleos, se contrastó la tinción con Hematoxilina de Harris por 3 minutos, lo que tiñe los núcleos de color azul.
8. Lavado: Se enjuagaron las secciones con agua destilada.
9. Deshidratación y montaje: Se sumergieron las muestras en volúmenes ascendentes de alcohol (70%, 80%, 96% I, 96% II, 100% I, 100% II, Xileno I, Xileno II. Finalmente se realizó el montaje de la muestra con una gota de resina sintética.

Inmunohistoquímica

1. Preparación de la muestra: Se inicio el proceso de desparafinación e hidratación de las muestras.
2. Recuperación antigénica: Se hizo inmersión de los cortes en solución de citrato-EDTA (pH 7.0, 2 mM EDTA, 10 mM, ácido cítrico, 0.05%) precalentada a 100°C por 30 min.
3. Bloqueo: Se hizo un bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno (H₂O₂) al 2% (H₂O₂) por 5 min. Después se realizaron lavados subsecuentes con PBS 1X.
4. Bloqueo de sitios inespecíficos: Se realizó mediante incubación de la muestra con PBS-A, posteriormente se realizaron 3 lavados subsecuentes con PBS 1X

5. Anticuerpo primario: Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C con FAP MoAb (PA5-99458, Thermo Fisher Scientific, Milford, MA, USA), dilución 1:100. Después se realizaron 3 lavados subsecuentes con PBS 1X y PBS 1X Tween al 0.05%.

6. Anticuerpo Secundario: Las muestras fueron incubadas con HRP-conjugated secondary donkey anti-rabbit IgG Ab (BioLegend: 406401; San Diego, CA, USA) en una dilución de 1:100 durante 2 h. Después se realizaron 3 lavados subsecuentes con PBS 1X y PBS 1X Tween al 0.05%.

7. Revelado de la reacción: Se empleó en kit comercial Dako solution. (Dako Liquid DAB+ Substrate Chro-mogen System: K3468; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), aplicado por 60s para visualizar inmunorreacciones. Después se realizaron 3 lavados subsecuentes con PBS 1X, PBS 1X Tween al 0.05%, y después con agua destilada).

8. Contraintinción: Se realizó con Hematoxilina de Harris durante 1 minuto, después se enjuago la muestra con agua corriente y después con agua destilada.

9. Deshidratación y montaje: Se deshidrataron las muestras en volúmenes ascendentes alcohol (70%, 80%, 96% I, 96% II, 100% I, 100% II, Xileno I, Xileno II. Finalmente se realizó el montaje de la muestra con una gota de resina sintética.

Evaluación Histológica

A fin de establecer cambios asociados a cardiotoxicidad en el modelo experimental, en el grupo control se analizaron las características histopatológicas más relevantes de la microarquitectura cardiaca y posteriormente fueron comparadas con los grupos experimentados: microarquitectura de miocardio ventricular, cardiomiocitos ventriculares, expresión de colágeno. El estudio se realizó en secciones transversales a través de un microscopio de campo claro Axiostar (Zeiss Group, Oberkochen, Stuttgart, Alemania) mediante una cámara INFINITY X-32 MP (Lumenera Corp., Ottawa, ON, Canadá) en formato TIF. que se configuro con el software INFINITY ANALYZE and CAPTURE v 6.5.6 (Lumenera Corporation).

Análisis histomorfológico computarizado

Las imágenes en 400X, fueron capturadas con el software Infinity Capture 6.5.7, con un mismo balance de blancos (ver figura 6A). Cada imagen fue cargada en el software Image Pro-Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc.) En la opción el aumento de contraste RGB (Rojo-Verde-Azul), se diseñó una plantilla colorimétrica en negativo en se guardó con los siguientes valores: BRILLO 50, CONTRASTE 63, GAMMA 2: RED; BRILLO 42, CONTRASTE 90, GAMMA 1.0; GREEN BRILLO 47, CONTRASTE 49, GAMMA 1.4; BLUE BRILLO 50, CONTRASTE 63, GAMMA 1.7) (ver figura 6B). Dicha plantilla fue aplicada a cada imagen histológica; posteriormente se realizó el conteo automatizado de objetos oscuros, que correspondían a los núcleos (en la barra de herramientas, el área asignada fue de 3-200 micras cuadradas) (ver figura 6C), posteriormente el conteo total, fue exportado en hoja de cálculo, para su posterior análisis estadístico (media, desviación estándar) de manera individual y grupal.

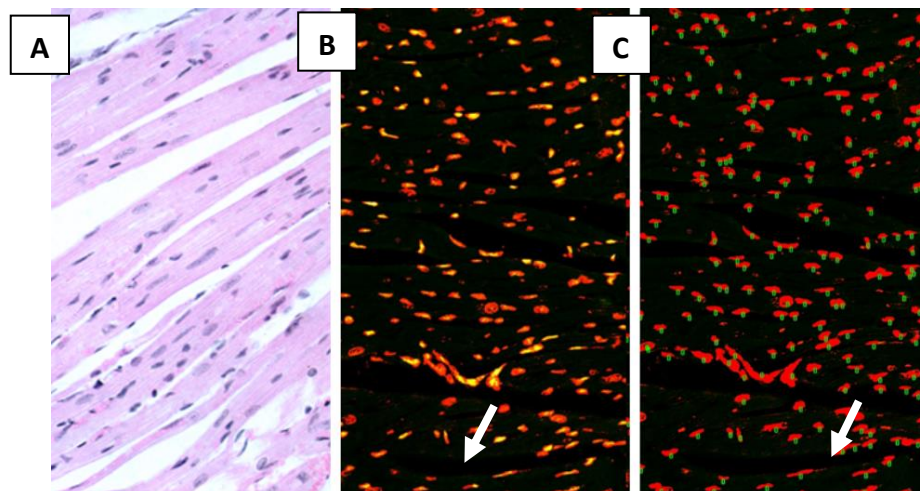


Figura 6. Selección y cuantificación colorimétrica del número de núcleos. La imagen ejemplifica la identificación del núcleo de los cardiomiocitos (flechas, figura A), aplicación de plantilla colorimétrica en negativo, seleccionando los filtros de rango de medida (área: 3-200) (flechas, figura B) y la substracción colorimétrica para su cuantificación (figura C). Fragmentos de fotomicrografía de H&E (400X).

VI.5 Límite de tiempo y espacio

La investigación se realizó en el periodo de tiempo de junio de 2024 a septiembre del año 2024, en las instalaciones del animalario y laboratorio de Neuroendocrinología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicada en Av. Paseo Tollocan, C. Jesús Carranza, Moderna de la Cruz, 50180 Toluca de Lerdo, México.

VI.6 Diseño de análisis

Estudio experimental transversal descriptivo y cuantitativo.

VII. Implicaciones éticas

Este protocolo se realizó acorde con los 5 principios básicos que deben gobernar la experimentación animal propuestos por Marshall Hall (10) y bajo las pautas prescritas en la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (11).

VIII. Resultados

VIII.1 Efecto de la astaxantina y doxorubicina sobre la histomorfología del miocardio.

El tratamiento con doxorubicina provocó múltiples cambios histomorfológicos en la tinción con Hematoxilina & Eosina del tejido miocárdico, lo cual podría ser sugestivo de cardiotoxicidad. De manera cualitativa, se observó alteración de la microarquitectura tisular general, con pérdida en la organización y en las estriaciones correspondientes a las sarcomeras, alteración en la distribución y bifurcación de los cardiomiocitos. Así mismo se observó disminución en el número de los núcleos (ver Figura 9). De manera cuantitativa, se observó un aumento significativo en el espesor de los cardiomiocitos con respecto al grupo control, astaxantina y astaxantina-doxorubicina. Esta medición de referencia en micras lineales, fue cuantificada en la parte central de los cardiomiocitos, excluyendo las áreas de bifurcación celular. Este aumento en el espesor de los cardiomiocitos tratados, podría ser un indicador de edema celular más que por un efecto hipertrófico. Estos cambios histomorfológicos fueron menos evidentes en los grupos suplementados con astaxantina (ver Figura 8 y 10).

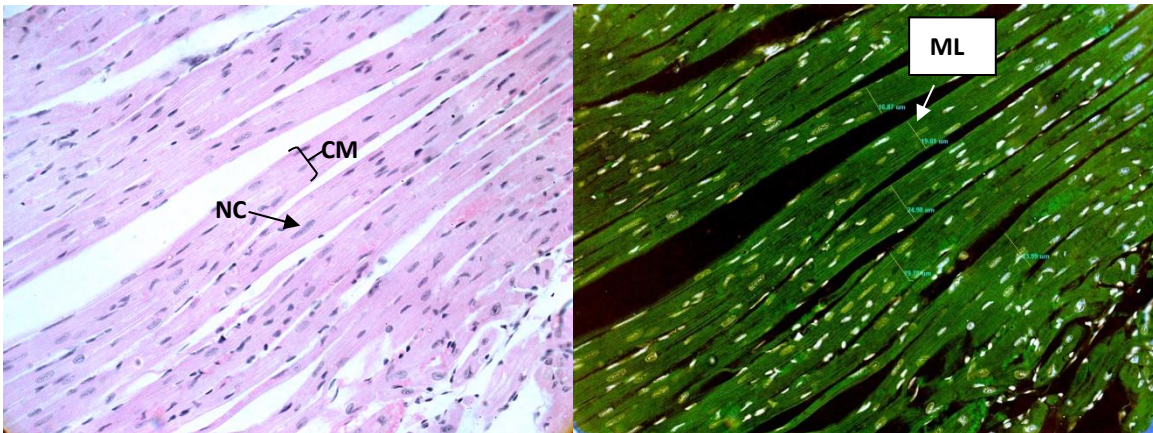


Figura 7. Miocardio de ratón control. La fotomicrografía muestra una la histomorfología normal del miocardio en sección transversal. Los cardiomiocitos (CM) presentan núcleos centrales (NC), con estriaciones transversales. A la izquierda se observa la misma imagen en negativo, las líneas trasversales (ML) representan la medición del espesor de los cardiomiocitos. Magnificación 400X, tinción H&E.

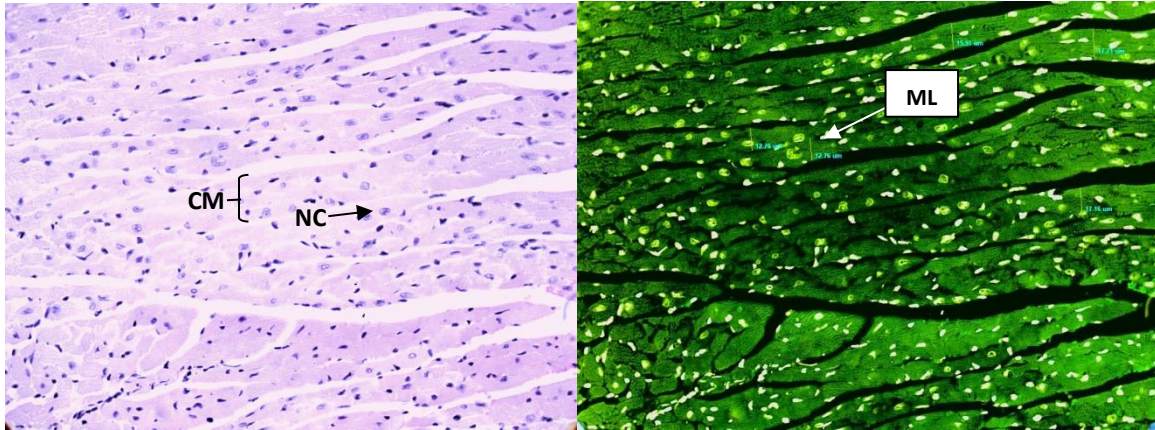


Figura 8. Miocardio ventricular de ratón suplementado con astaxantina. La fotomicrografía de una sección transversal muestra las características del miocardio: los cardiomiocitos (CM) muestran núcleos centrales (NC). Las características del tejido, fueron similares al grupo control. A la izquierda se observa la misma imagen en negativo, las líneas trasversales (ML) representan la medición del espesor de los cardiomiocitos. Magnificación 400X, tinción H&E.

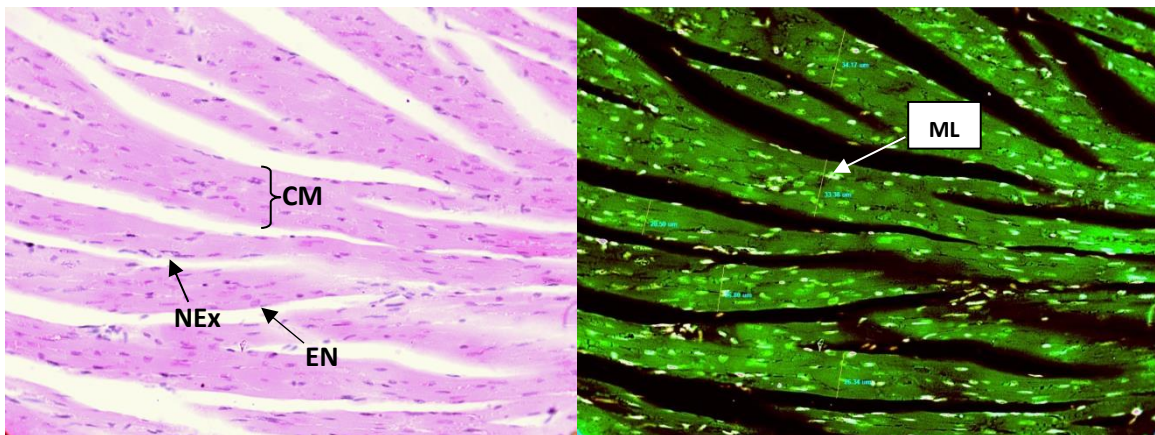


Figura 9. Miocardio de ratón tratado con doxorubicina: La imagen histomorfológica de una sección transversal del miocardio, con una ubicación excéntrica (NEx) y una disminución del número de núcleos en comparación con los otros grupos. A la izquierda se observa la misma imagen en negativo, donde se aprecia un aumento en el espesor de los cardiomiocitos (ML). Magnificación 400X, tinción H&E.

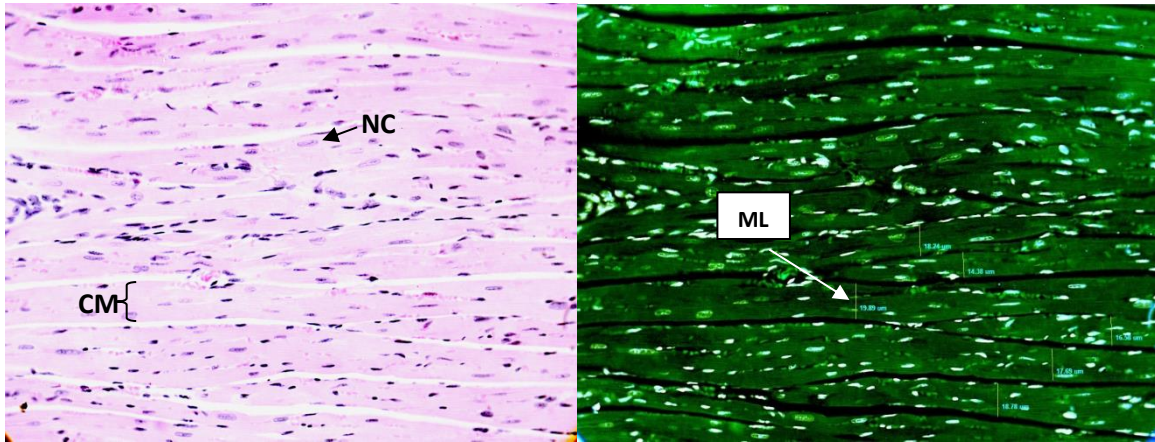


Figura 10. Miocardio de ratón tratado con astaxantina-doxorrubicina. En la imagen histomorfológica se aprecia núcleos centrales (NC), una reducción en el espesor celular de los cardiomiocitos (CM) comparado con el grupo doxorrubicina. A la izquierda se observa la misma imagen en negativo, las líneas transversales (ML) representan la medición del espesor de los cardiomiocitos. Magnificación 400X, tinción H&E.

Análisis cuantitativo por software.

En el análisis de cuantitativo de los datos, se observa que el uso de doxorrubicina ocasionó un aumento del espesor celular y el área de los cardiomiocitos, y al mismo tiempo generó una reducción en la cantidad de núcleos, lo que sugiere un efecto cardiotoxico causado por el uso del fármaco.

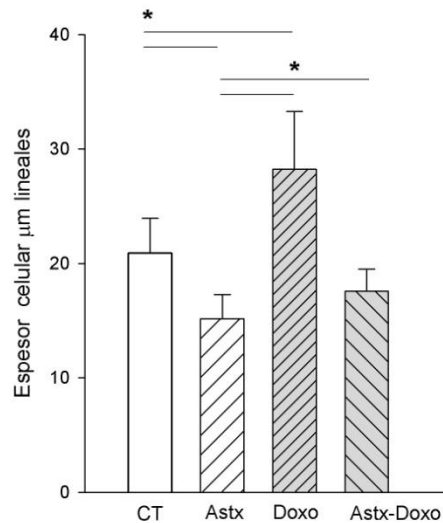


Figura 11. Espesor de los cardiomiocitos. La gráfica muestra el espesor en micras lineales de los cardiomiocitos en los grupos de estudio. Los tratamientos con Astx y Astx- Doxo disminuyeron de manera significativa el espesor de las células respecto al grupo control, mientras que el grupo tratado con doxorrubicina presentó un incremento significativo en su espesor. Anova de una vía (Tukey).

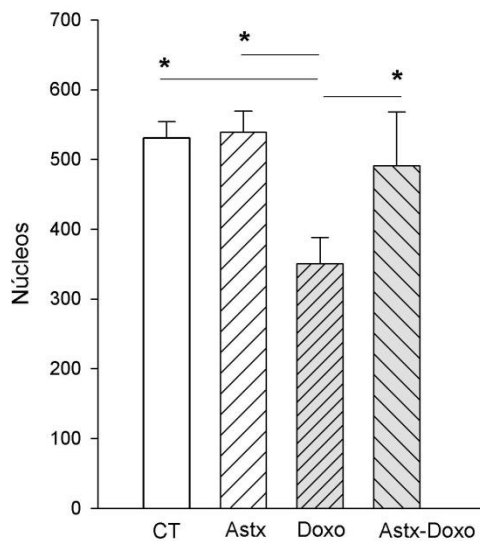


Figura 12. Cantidad de núcleos. La gráfica muestra el número de núcleos de los cardiomiocitos en los grupos de estudio. Los tratamientos con astaxantina tuvieron un aumento poco significativo en comparación con el grupo control, los grupos Astx-Doxo y Doxo tuvieron una disminución, siendo el grupo Doxo el que presentó una disminución significativa. Anova de una vía (Tukey).

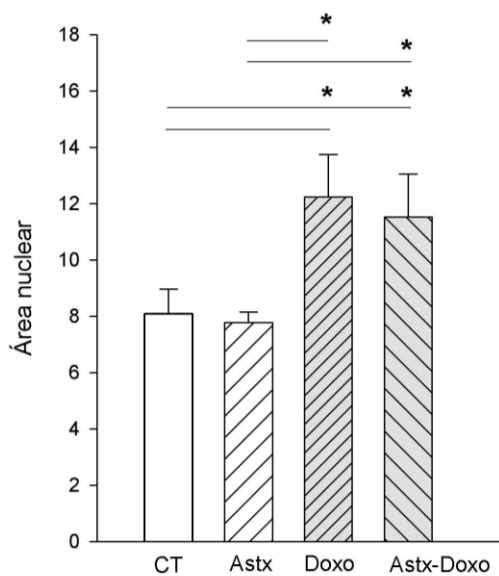


Figura 13. Área nuclear. La gráfica muestra el área de los núcleos de los cardiomiocitos de los cuatro grupos de estudio. Los grupos CT y Astx los núcleos presentaron un área “normal”, en comparación a los grupos Doxo y Astx-Doxo, en los cuales se observó un aumento significativo del área nuclear.

VIII.2 Efecto de la astaxantina y doxorrubicina sobre la cantidad de colágeno

De igual forma en la tinción Tricrómica de Masson, el tratamiento con doxorrubicina provocó cambios histomorfológicos del tejido miocárdico, lo cual podría ser sugestivo de cardiotoxicidad. De manera cualitativa, se observó una tinción sin uniformidad en el miocardio del grupo doxorrubicina, indicador de una menor expresión de colágeno (ver Figura 15). En los grupos control y astaxantina, la tinción es uniforme evidenciando una morfología normal del miocardio (ver Figura 13 y 14). En el grupo astaxantina-doxorrubicina se observa una mayor uniformidad en la tinción, lo que podría sugerir la preservación de los cardiomiocitos y el comienzo de un proceso de reparación tisular, se observan también zonas mínimas en color azul, sin embargo, no son significativas (ver Figura 16).

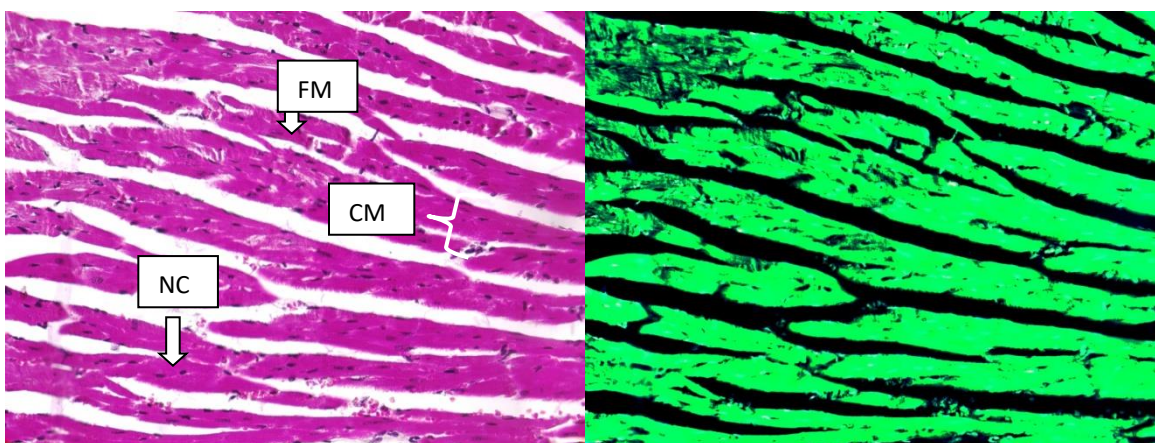


Figura 14. Miocardio de grupo control. En la fotografía se observa la histomorfología normal del miocardio, presenta fibras musculares (FB) con una tinción uniforme de un color rojo brillante, núcleos centrales (NC) y A la izquierda se observa la misma imagen en negativo. Magnificación 400X, tinción tricrómica de Masson.

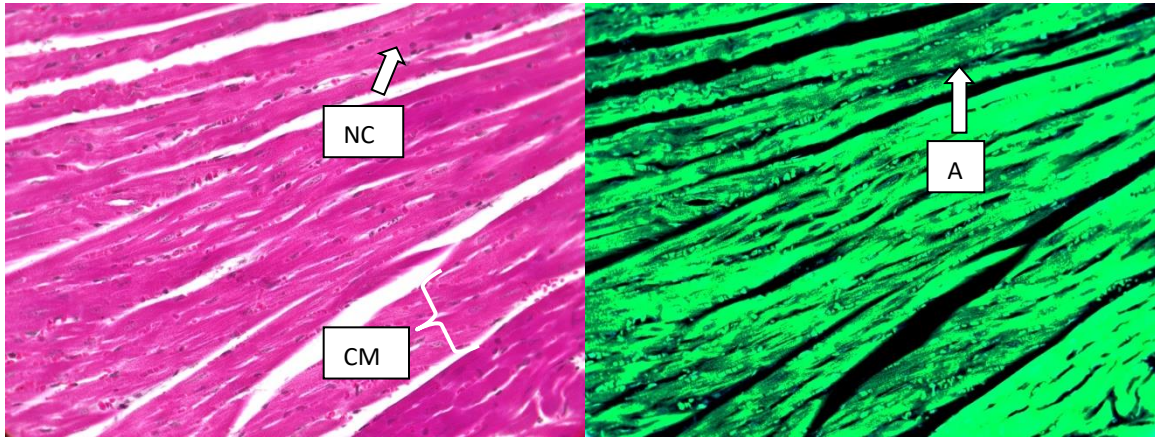


Figura 15. Miocardio de grupo astaxantina. En la fotografía se observa la morfología típica del miocardio, los cardiomiocitos (CM) presentan núcleos centrales (NC), con zonas de menor uniformidad en la marcación de fucsina ácida en las fibras musculares (A) más apreciable en la imagen negativa. (Magnificación 400X, tinción tricrómica de Masson).

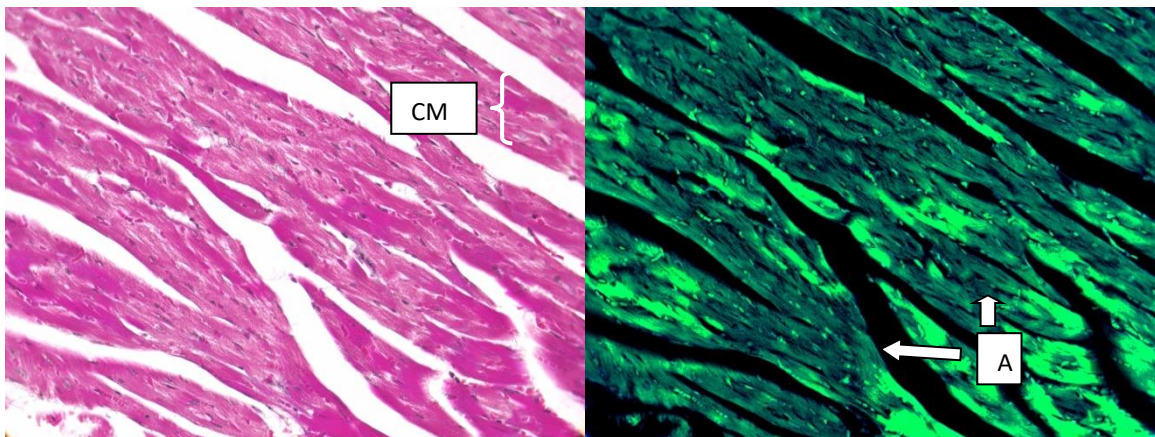


Figura 16. Miocardio de grupo doxorubicina. En la fotomicrografía se observa que los cardiomiocitos (CM) presentan una tinción de fucsina ácida con menor uniformidad (A) respecto a los grupos control y astaxantina. A la izquierda se observa la misma imagen en negativo, las líneas trasversales representan la medición del espesor de los cardiomiocitos. Magnificación 400X, tinción tricrómica de Masson.

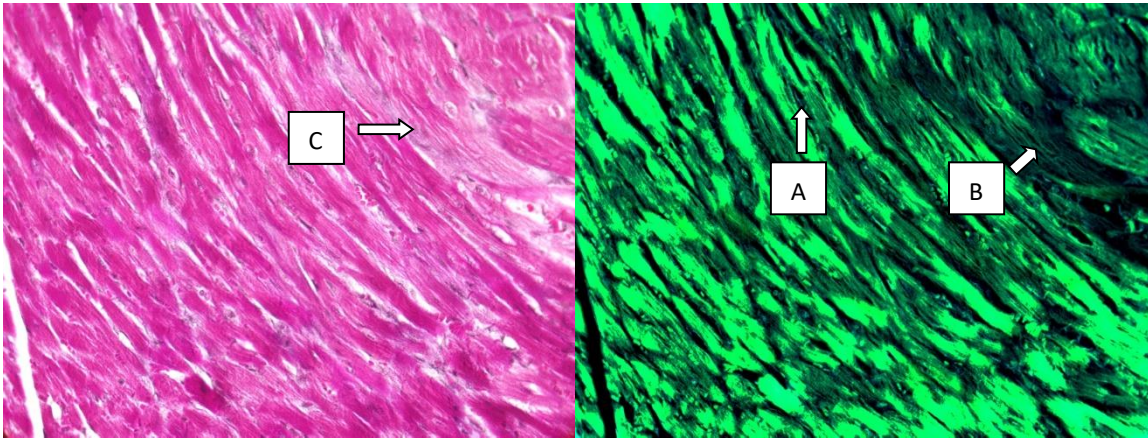


Figura 17. Miocardio de grupo astaxantina-doxorrubicina. La imagen muestra zonas con mayor cantidad de tejido con tinción uniforme (A), ligeras zonas sin coloración (B) de fucsina ácida y áreas con una tenue coloración azul (C). A la izquierda se observa la misma imagen en negativo, las líneas transversales representan la medición del espesor de los cardiomiocitos. Magnificación 400X, tinción tricrómica de Masson.

VIII.3 Efecto de la astaxantina y doxorrubicina sobre el almacenamiento de glucógeno

En la tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS9), para marcaje de glucógeno, el tratamiento con doxorrubicina provocó cambios histomorfológicos, que se evidencian con la tinción de color rojo correspondiente al almacenamiento de glucógeno en los cardiomiocitos. La tinción de color rojo fue seccionada manualmente en el área total de la imagen. Posteriormente se hizo una sustracción del color para excluir núcleos de cardiomiocitos, eritrocitos y otros componentes de tejido conectivo del miocardio para evidenciar el área total de glucógeno, por reacción de PAS.

De forma cualitativa, los grupos control y astaxantina un óptimo almacenamiento de glucógeno (ver figuras 17-18). La muestra del grupo tratado con doxorrubicina, muestra una reducción significativa en el almacenamiento de glucógeno, lo cual se relaciona al daño celular de la DOXO sobre el metabolismo energético de los cardiomiocitos, lo que deriva en cardiotoxicidad (ver figura 19).

En el grupo tratado con ASTX- DOX, las zonas de marcaje de colágeno fueron mayores en comparación con el grupo de DOXO, lo que evidencia un efecto cardioprotector de la astaxantina sobre el tejido cardíaco (ver figura 20).

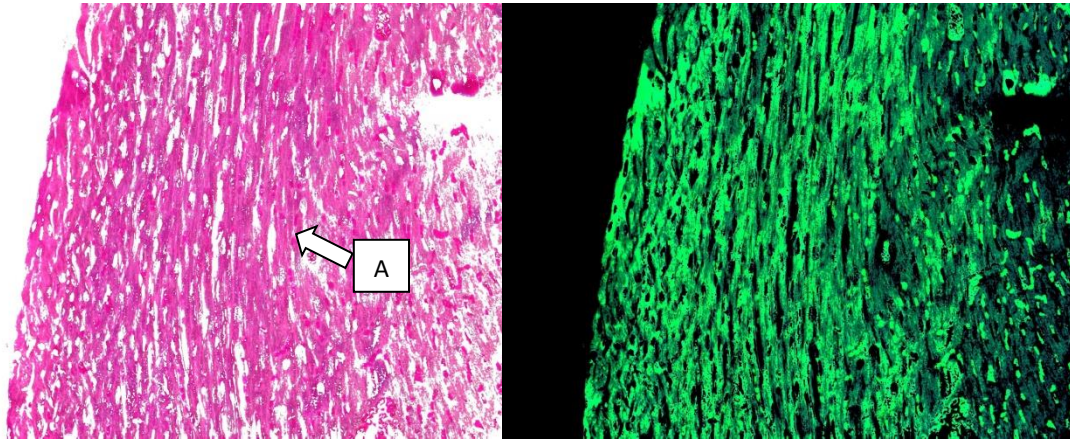


Figura 18. Miocardio de grupo control. La fotomicrografía muestra el tejido miocárdico en una sección transversal, que presenta un color rojo-rosa intenso de forma uniforme (A). Magnificación 400X, tinción PAS.

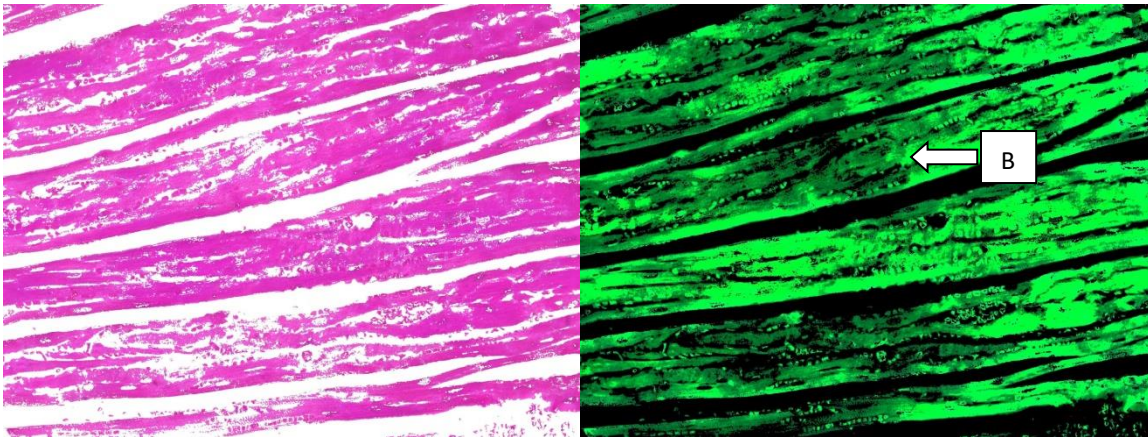


Figura 19. Miocardio del grupo astaxantina. En la fotomicrografía se aprecia zonas de menor marcaje de glucógeno, que se evidencian de mejor manera la imagen en negativo (B). Magnificación 400X, tinción PAS.

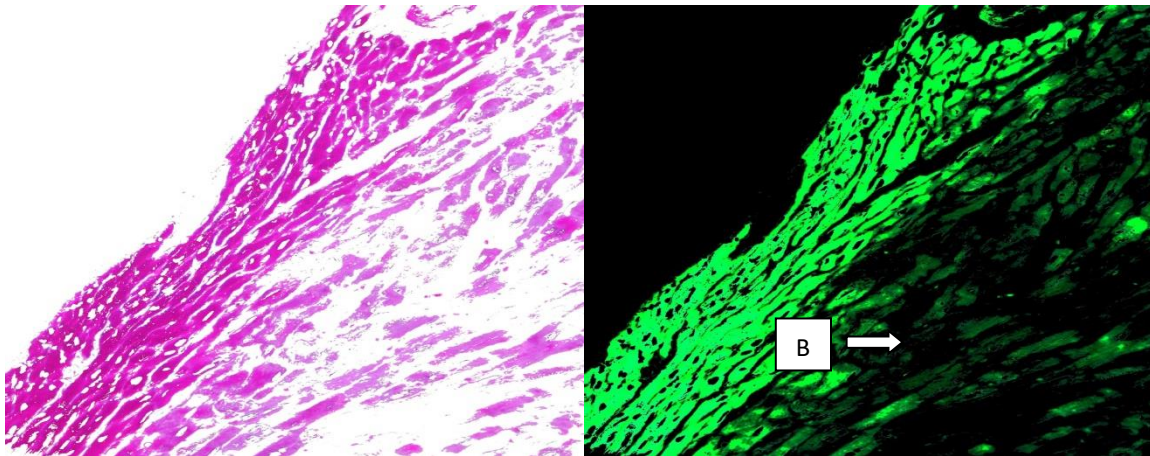


Figura 20. Miocardio de grupo doxorubicina. La imagen muestra una reducción en el almacenamiento de glucógeno de los cardiomiocitos (B), significativamente mayores en relación a los grupos control y astaxantina. Magnificación 400X, tinción PAS.

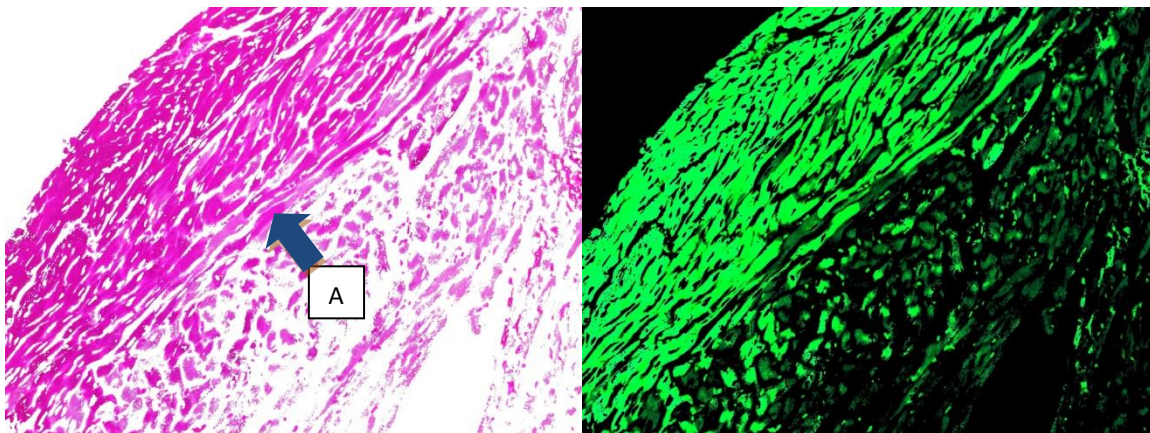


Figura 21. Miocardio del grupo astaxantina-doxorubicina. En la fotomicrografía se observa se observa un mayor número de cardiomiocitos con marcaje de almacenamiento de glucógeno (A), en comparación al grupo tratado con doxorubicina. Magnificación 400X, tinción PAS.

VIII.4 Efecto de la doxorrubicina y la astaxantina sobre producción de FAP

El tratamiento con doxorrubicina provocó múltiples cambios en la inmunohistoquímica del tejido miocárdico, lo cual podría ser sugestivo de cardiotoxicidad. De manera cualitativa, se observó una captación general de FAP en la microarquitectura tisular general, en los diferentes grupos de trabajo. Con un aumento en la colorimetría en el tejido miocárdico del grupo con doxorrubicina, respecto a los grupos astaxantina-doxorrubicina (ver Figura 23). Este aumento en la expresión de FAP podría ser un indicador de una respuesta inmunológica por parte de los fibroblastos, derivado de la agresión causada por el tratamiento de doxorrubicina. En los grupos control y astaxantina, la expresión de FAP puede sugerir una respuesta al estrés causado por la manipulación de los animales (ver Figura 21, 22).

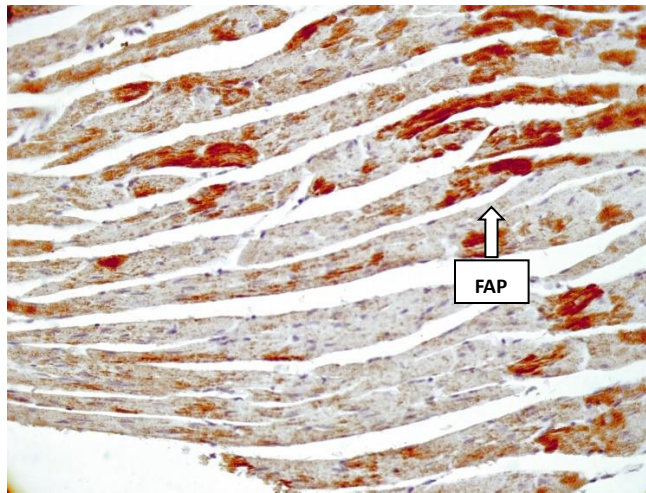


Figura 22. Miocardio de grupo control. La fotomicrografía muestra una sección transversal del miocardio con zonas de expresión de FAP, señaladas por la flecha (FAP). Magnificación 400X, inmunohistoquímica ^{99m}Tc FAP.

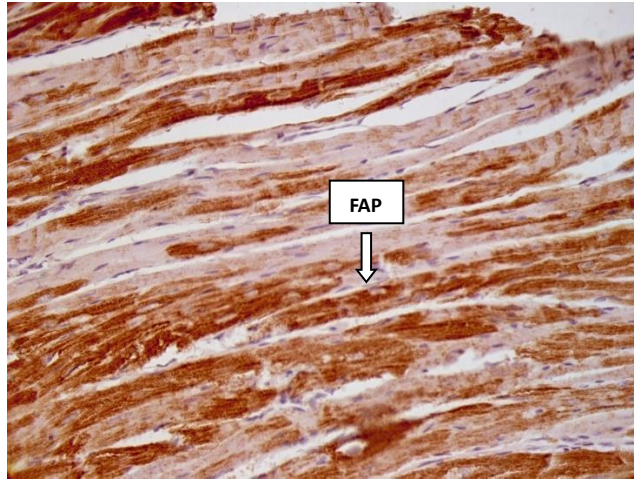


Figura 23. Miocardio de grupo astaxantina. En la fotomicrografía se observa un aumento en la expresión de FAP en casi todas las células, señaladas por la flecha (FAP), posiblemente como el resultado del estrés causado por la manipulación de los animales. Magnificación 400X, inmunohistoquímica ^{99m}Tc FAP.

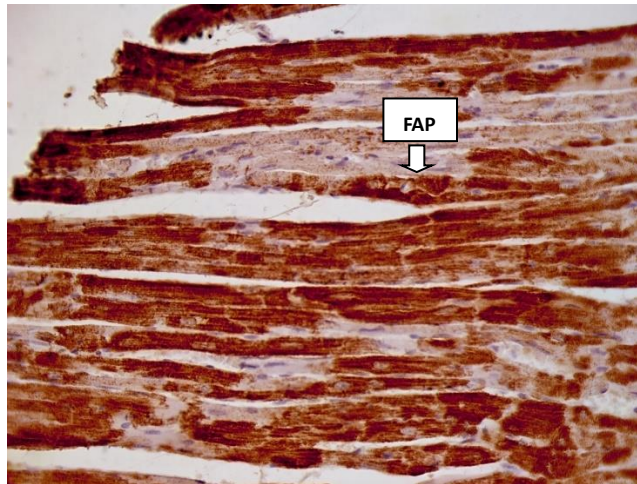


Figura 24. Miocardio de grupo doxorubicina. La fotomicrografía muestra una expresión generalizada con un aumento de la colorimetría, señaladas por la flecha (FAP), lo que sugiere un aumento de la expresión por el tratamiento de doxorubicina. Magnificación 400X, inmunohistoquímica ^{99m}Tc FAP.

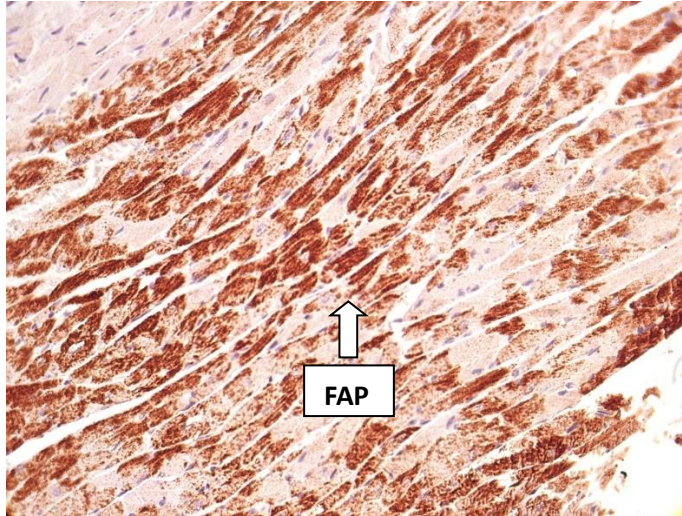


Figura 25. Miocardio de grupo astaxantina-doxorrubicina. La fotomicrografía revela una expresión difusa de FAP en la mayoría de las células del tejido cardíaco, señalado por la flecha (FAP), con excepción de ciertas zonas. Magnificación 400X, inmunohistoquímica ^{99m}Tc FAP.

IX. Discusión

De acuerdo con el análisis de los resultados, proporcionan evidencia sólida que respalda la hipótesis del efecto cardioprotector de la astaxantina sobre la cardiotoxicidad inducida por doxorubicina. Si bien los efectos toxicológicos agudos o crónicos pueden causar falla cardíaca congestiva, predominantemente durante los efectos acumulados, en las fotomicrografías de este estudio se apreciaron cambios mínimos. Sin embargo, estos cambios si fueron evidentes en el análisis histomorfológicos mediante software, lo cual podrían relacionarse con alteraciones presentes, pero no visibles en una apreciación cualitativa. A su vez el análisis retrospectivo de muestras posmortem de pacientes tratados con doxorubicina podría comprobar esta hipótesis. Esto indica que las herramientas digitales serían de gran utilidad para demostrar cambios histopatológicos ocultos. La pérdida de núcleos con aumento del área en micras cuadradas, el aumento en el espesor de los cardiomiocitos, disminución en los patrones colorimétricos citoplasmáticos, podrían ser cambios tempranos asociados a la cardiotoxicidad por doxorubicina. Aunque no existe un estudio detallado mediante herramientas digitales, múltiples estudios incluyen gran cantidad de mecanismos toxicológicos de la doxorubicina, como son aumento del daño oxidativo, inflamación, alteración de los canales y los niveles de calcio y disfunción mitocondrial, lo que conduce a apoptosis de cardiomiocitos y células endoteliales (51, 52, 53, 54). Otro aspecto importante, es que la toxicidad inducida por doxorubicina también se relaciona con los procesos de senescencia miocárdica precoz (55-59), lo cual podría sugerir alteraciones miocárdicas tardías.

Cabe mencionar que el riesgo de falla cardíaca inducida por doxorubicina no solamente se limita a cambios morfológicos, también existen múltiples alteraciones fisiológicas del automatismo cardíaco lo que resulta en disminución del vaciamiento ventricular y disfunción diastólica y fibrilación atrial (60-71)

En otra instancia, cabe resaltar que la falla cardíaca, también provoca cambios hemodinámicos, como es el decremento del 10% la fracción de eyección ventricular en 53% de los pacientes (72, 73).

A nivel molecular, también existen muchos estudios que revelan el desarrollo de daño al ADN causada por doxorubicina (74-76). En cuanto a los cambios, se describen cambios como hipertrofia cardíaca (78-80), lo que se ha asociado con acumulación de productos de desecho (Aumento de la actividad de β -galactosidasa mediante tinción de lipofuscina)(81). Así mismo, se sugiere que existe un aumento de la fibrosis mediado por un incremento en la expresión de fibras de colágeno, en donde los fibroblastos incrementan la expresión de metaloproteasas de matriz (MMP) e inhibidores tisulares de MMP (TIMP)(82-84)

En un estudio en ratas, se encontró que la administración de 2 mg/Kg/peso de doxorubicina por vía intraperitoneal una vez por semana por 4 semanas, provocó microarquitectura en las fibras musculares cardíacas, lo cual se relaciona con los hallazgos de este estudio (85). En este estudio, las alteraciones histomorfológicas sobre la organización de las miofibrillas, fueron evidenciadas mediante microscopia electrónica de barrido. Aunque la microscopia de luz óptica presenta ciertas limitantes, estas pueden ser subsanadas mediante el análisis por software.

Los cambios histomorfológico observados en el miocardio de los animales tratados con DOXO: pérdida de organización sarcomérica, alteración de la distribución de los cardiomiocitos y el aumento del espesor celular, son consistentes con el desarrollo de cardiomiopatía. La escasa tinción con azul de anilina en las muestras teñidas con Tricrómica de Masson, indica una baja presencia de fibrosis, sin embargo, la tinción heterogénea del miocardio en los grupos tratados con Doxo y Astx-Doxo sugieren que el régimen de tratamiento con doxorubicina fue suficiente para inducir las primeras etapas de cardiotoxicidad, por lo tanto, se propone dejar que el grupo de experimentación sobreviva más tiempo, aumentar el tiempo de tratamiento; o cesar el tratamiento y hacer una evaluación más prolongada después del periodo de inoculación del fármaco, para favorecer el desarrollo de daño tardío.

Los grupos con astaxantina mostraron una atenuación significativa del daño miocárdico, evidenciado por una reducción del espesor de los cardiomiocitos, un aumento del número de núcleos y una disminución del área nuclear. Estos resultados indican que la astaxantina mitiga los efectos adversos de la doxorubicina sobre los cardiomiocitos.

El aumento de la expresión de FAP (proteína de activación de los fibroblastos) observado en los grupos tratados con doxorubicina es indicativo de una respuesta de reparación tisular exacerbada, comúnmente asociada a lesiones tisulares. La expresión de FAP en los grupos control y astaxantina plantea la hipótesis de que la proteína de activación de fibroblastos se encuentre de forma constitutiva en los cardiomiocitos, aún no hay estudios que respalde esta hipótesis, sin embargo, se propone hacer estudios que puedan dar luz a este planteamiento. No obstante, la coadministración de astaxantina pareció atenuar esta respuesta, sugiriendo que puede modular los procesos inflamatorios y fibróticos asociados con la cardiotoxicidad.

La disminución del almacenamiento de glucógeno en el grupo tratado con doxorubicina es consistente con las alteraciones metabólicas conocidas inducidas por el fármaco. La doxorubicina puede afectar la función mitocondrial y alterar el metabolismo energético celular, lo que conduce a una disminución de la producción de ATP y el agotamiento del glucógeno. La preservación de las reservas de glucógeno en los grupos tratados con astaxantina sugiere que la astaxantina puede proteger contra estas alteraciones metabólicas.

Conclusiones.

Con este trabajo se concluye que la suplementación con astaxantina ejerce efectos favorables en la preservación de la morfología celular del miocardio ante los efectos perjudiciales del uso de doxorubicina. Produce una mejor respuesta en el proceso de reparación tisular y tiene efectos significativamente favorables en la preservación de los cardiomiocitos, evidenciado por el almacenamiento de glucógeno y una menor captación de FAP en el tejido de los modelos suplementados.

Aunque no se observaron cambios sugestivos de fibrosis, al análisis cuantitativo por software permitió evidenciar cambios histomorfológicos que podrían indicar mecanismos tempranos de daño y reparación ante la toxicidad por doxorubicina. En contraparte, en el grupo tratado con astaxantina y doxorubicina estos cambios fueron menores. Esto sugiere que la astaxantina disminuye los efectos cardiotoxicos de la doxorubicina. Se requieren estudios adicionales a fin de evaluar si los tratamientos aplicados evolucionan a cambios tardíos que indiquen mayor daño y reparación del miocardio, o en su defecto, evaluar otros esquemas de doxorubicina a mayor dosis y tiempo de tratamiento.

Recomendaciones

Si bien este estudio proporciona información valiosa sobre los efectos cardioprotectores de la astaxantina, se recomienda para estudios futuros ampliar el tamaño del número de muestra para tener resultados más representativos y posteriormente realizar ensayos pre clínicos en modelos con cáncer tratados con doxorubicina. Así como aumentar el tiempo de administración del fármaco o dejar un mayor lapso de tiempo entre la última dosis de DOXO y la evaluación histológica, para permitir el desarrollo de cardiotoxicidad tardía.

Por último, se sugiere realizar más estudios para comprender de mejor manera la producción constitutiva de FAP, para elucidar los mecanismos moleculares precisos de los efectos cardioprotectores de la astaxantina.

X. Bibliografía

1. McGowan J V., Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017;31(1):63–75.
2. Al-Tae H, Azimullah S, Meeran MFN, Alaraj Almheiri MK, Al Jasmi RA, Tariq S, et al. β -caryophyllene, a dietary phytocannabinoid attenuates oxidative stress, inflammation, apoptosis and prevents structural alterations of the myocardium against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats: An in vitro and in vivo study. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2019;858(September 2018):172467. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172467>
3. Visioli F, Artaria C. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: Mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps. *Food Funct.* 2017;8(1):39–63.
4. Treuting PM, Dintzis SM. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas*. Comparative Anatomy and Histology: A Mouse and Human Atlas. 2012. 46–51 p.
5. Megías M, P M, MA P. Atlas de histología vegetal y animal [Internet]. 2024. Available from: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/cardiomiocito.php>
6. Nicolas Eduardo Saavedra Torres. Descripción morfofuncional de la histología del miocardio [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2023. Available from: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/85285/1014255978.2024.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
7. Ross MH, Paulina W. *Histología: texto y atlas correlación con la biología molecular y celular*. 2020.; 2020.
8. Montero GU, Campos AU. El calcio en los miocitos cardíacos y su papel en las miocardiopatías. *Rev Costarric Cardiol.* 2006;8.
9. Tortora GJ, Derrickson B, Tavela MJ, Taveira J, Tzal K. *Introducción al cuerpo humano: fundamentos de anatomía y fisiología* / Gerard J. Tortora, Bryan Derrickson.

[Internet]. Academia. México: 2008; 2014. 713 p. Available from: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat03595a&AN=rio.UR00443867&site=eds-live>

10. Zhang YJ, Huang H, Liu Y, Kong B, Wang G. MD-1 deficiency accelerates myocardial inflammation and apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity by activating the TLR4/MAPKs/nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway. *Med Sci Monit.* 2019;25:7898–907.

11. Mancilla TR, Iskra B, Aune GJ. Doxorubicin-induced cardiomyopathy in children. *Compr Physiol.* 2019;9(3):905–31.

12. Choksey A, Timm KN. Cancer therapy-induced cardiotoxicity—a metabolic perspective on pathogenesis, diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci.* 2022;23(1).

13. Jones IC, Dass CR. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: causative factors and possible interventions. *J Pharm Pharmacol.* 2022;74(12):1677–88.

14. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;139:111708. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111708>

15. Kong CY, Guo Z, Song P, Zhang X, Yuan YP, Teng T, et al. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. *Int J Biol Sci.* 2022;18(2):760–70.

16. Pau Sánchez Sendra P. Efectos del carotenoide astaxantina en la salud humana, según la ciencia. *NPunto.* 2019;2.

17. Farouk F, Elmaaty AA, Elkamhawy A, Tawfik HO, Alnajjar R, Abourehab MAS, et al. Investigating the potential anticancer activities of antibiotics as topoisomerase II inhibitors and DNA intercalators: in vitro, molecular docking, molecular dynamics, and SAR studies. *J Enzyme Inhib Med Chem* [Internet]. 2023;38(1). Available from: <https://doi.org/10.1080/14756366.2023.2171029>

18. Parma G, Lluberas N, Castillo C, Ormaechea G. Chemotherapy agents and cardiotoxicity : a current and user-friendly. *Arch Med Interna* [Internet]. 2013;35(2):37–47. Available from: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-423X2013000200003
19. Vitfell-Rasmussen J, Krarup-Hansen A, Vaage-Nilsen M, Kümler T, Zerahn B. Real-life incidence of cardiotoxicity and associated risk factors in sarcoma patients receiving doxorubicin. *Acta Oncol (Madr)* [Internet]. 2022;61(7):801–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/0284186X.2022.2082884>
20. Frangogiannis NG. *failure*. 2020;125(1):117–46.
21. Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JAP, Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Arch Toxicol*. 2016;90(9):2063–76.
22. He H, Wang L, Qiao Y, Zhou Q, Li H, Chen S, et al. Doxorubicin induces endotheliotoxicity and mitochondrial dysfunction via ROS/eNOS/NO pathway. *Front Pharmacol*. 2019;10(January):1–16.
23. Gallego Muñoz C, Saldarriaga CI, Diez Martínez J. Myocardial fibrosis: towards a new approach. *Rev Colomb Cardiol*. 2019;26(3):142–51.
24. Ferranti-Ramos A, Garza-Garza G, Bátiz-Armenta J, Martínez-Delgado G, De la Garza-Álvarez F, Martínez-Menchaca HR, et al. Metaloproteinasas de la matriz extracelular y su participación en el proceso de cicatrización. *Rev Médicas UIS*. 2017;30(3):55–62.
25. Zhao Z, Yang S, Deng Y, Wang L, Zhang Y, Feng Z, et al. Naringin Interferes Doxorubicin-Induced Myocardial Injury by Promoting the Expression of ECHS1. *Front Pharmacol*. 2022;13(April):1–10.
26. GIL CAYUELA C. ESTUDIO DEL PAPEL FISIOPATOLÓGICO DEL COLÁGENO EN LA INSUFICIENCIA CARDIACA. IMPLICACIONES EN EL REMODELADO VENTRICULAR. Vol. 7, *Journal GEEJ. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA*; 2020.

27. Mancilla TR, Davis LR, Aune GJ. Doxorubicin-induced p53 interferes with mitophagy in cardiac fibroblasts. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(9 September 2020):1–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0238856>
28. Narikawa M, Umemura M, Tanaka R, Hikichi M, Nagasako A, Fujita T, et al. Doxorubicin induces trans-differentiation and MMP1 expression in cardiac fibroblasts via cell death-independent pathways. *PLoS One*. 2019;14(9):1–17.
29. dos Santos Arruda F, Tomé FD, Miguel MP, de Menezes LB, Nagib PRA, Campos EC, et al. Doxorubicin-induced Cardiotoxicity and Cardioprotective Agents: Classic and New Players in the Game. *Curr Pharm Des*. 2019;25(2):109–18.
30. Shaker RA, Abboud SH, Assad HC, Hadi N. Enoxaparin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2018;19(1):1–10.
31. Wali AF, Rashid S, Rashid SM, Ansari MA, Khan MR, Haq N, et al. Naringenin regulates doxorubicin-induced liver dysfunction: Impact on oxidative stress and inflammation. *Plants*. 2020;9(4):1–17.
32. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Vol. 94, *Archives of Toxicology*. 2020. 651–715 p.
33. Dos Santos JM, Alfredo TM, Antunes KÁ, Da Cunha JDSM, Costa EMA, Lima ES, et al. *Guazuma ulmifolia* Lam. Decreases oxidative stress in blood cells and prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018.
34. Milisav I, Ribarič S, Poljsak B. Antioxidant vitamins and ageing. *Subcell Biochem*. 2018;90:1–23.
35. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006;(494):161–72.
36. Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med Leg* [Internet]. 2019;36(1):91–100. Available from: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091

37. Hajra S, Patra AR, Basu A, Bhattacharya S. Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardiotoxicity: Effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation. *Biomed Pharmacother.* 2018;101(February):228–43.
38. Shaker RA, Abboud SH, Assad HC, Hadi N, Xue Y, Sun C, et al. Astaxanthin Attenuates Hypertensive Vascular Remodeling by Protecting Vascular Smooth Muscle Cells from Oxidative Stress-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2020;29(4):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.05.023>
39. Liu X, Xie J, Zhou L, Zhang J, Chen Z, Xiao J, et al. Recent advances in health benefits and bioavailability of dietary astaxanthin and its isomers. *Food Chem.* 2023;404.
40. Wu Q, Zhang XS, Wang HD, Zhang X, Yu Q, Li W, et al. Astaxanthin activates nuclear factor erythroid-related factor 2 and the antioxidant responsive element (nrf2-are) pathway in the brain after subarachnoid hemorrhage in rats and attenuates early brain injury. *Mar Drugs.* 2014;12(12):6125–41.
41. Yamashita E. Astaxanthin as a medical food. *Funct Foods Heal Dis.* 2013;3(7):254–8.
42. Davan I, Fakurazi S, Alias E, Ibrahim N ‘Izzah, Hwei NM, Hassan H. Astaxanthin as a Potent Antioxidant for Promoting Bone Health: An Up-to-Date Review. *Antioxidants.* 2023;12(7):1–26.
43. Fakhri S, Aneva IY, Farzaei MH. *molecules.* :1–19.
44. Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Ianora A, et al. On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives? *Mar Drugs.* 2018;16(8):1–16.
45. QU X, ZHANG Z, HU W, LOU M, ZHAI B, MEI S, et al. Attenuation of the Na/K-ATPase/Src/ROS amplification signaling pathway by astaxanthin ameliorates myocardial cell oxidative stress injury. *Mol Med Rep.* 2020;22(6):5125–34.
46. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012;70(5):257–65.

47. Miyawaki H, Takahashi J, Tsukahara H, Takehara I. Effects of astaxanthin on human blood rheology. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;43(2):69–74.
48. Ghazi HUSSEIN,*, a, b Hirozo GOTO, c Shinobu ODA, c Ushio SANKAWA, a Kinzo MATSUMOTO b and, WATANABE H. Antihypertensive Potential and Mechanism of Action of Astaxanthin: III. Antioxidant and Histopathological Effects in Spontaneously Hypertensive Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020.
49. Sasaki Y, Kobara N, Higashino S, Giddings JC, Yamamoto J. Astaxanthin inhibits thrombosis in cerebral vessels of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res [Internet].* 2011;31(10):784–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2011.09.010>
50. Al-nashar AA, Ezzat WF, Mohammed MA, Al- M, Al-bahet SI. The Potential protective role of astaxanthin on doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. 2021;114:2021.
- 51 Linders, A.N., Dias, I.B., López Fernández, T. et al. A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. *npj Aging* 10, 9 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41514-024-00135-7>
52. van der Zanden, S. Y., Qiao, X. & Neefjes, J. New insights into the activities and toxicities of the old anticancer drug doxorubicin. *FEBS J.* 288, 6095–6111 (2021).
53. Rawat, P. S., Jaiswal, A., Khurana, A., Bhatti, J. S. & Navik, U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed. Pharmacother.* 139, 1–14 (2021).
54. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology.* 2010;115(2):155-62. doi: 10.1159/000265166. Epub 2009 Dec 11. PMID: 20016174; PMCID: PMC2848530
55. Cupit-Link, M. C. et al. Biology of premature ageing in survivors of cancer. *ESMO Open* 2, 1–8 (2017).Return to ref 10 in article
56. Serrano, M. & Blasco, M. A. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 715–722 (2007).

57. Finkel, T., Serrano, M. & Blasco, M. A. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767–774 (2007).
58. Henderson, T. O., Ness, K. K. & Cohen, H. J. Accelerated aging among cancer survivors: from pediatrics to geriatrics. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* 34, e423–e430 (2014).
59. Linders, A. N. et al. Evaluation of Senescence and its prevention in doxorubicin-induced cardiotoxicity using dynamic engineered heart tissues. *JACC Cardio Oncol.* <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2023.03.012> (2023).
60. Shi, J., Guo, Y., Cheng, L., Song, F. & Shu, X. Early change in left atrial function in patients treated with anthracyclines assessed by real-time three-dimensional echocardiography. *Sci. Rep.* 6, 25512 (2016).
61. Gerstenblith, G. et al. Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. *Circulation* 56, 273–278 (1977).
62. Cheng, S. et al. Age-related left ventricular remodeling and associated risk for cardiovascular outcomes the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 2, 191–198 (2009).
63. van Grootel, R. W. J. et al. In-depth echocardiographic analysis of left atrial function in healthy adults using speckle tracking echocardiography and volumetric analysis. *Echocardiography* 35, 1956–1965 (2018).
64. Hausdorf, G. et al. Long term doxorubicin cardiotoxicity in childhood: non-invasive evaluation of the contractile state and diastolic filling. *Heart* 60, 309–315 (1988).
65. Yaylali, Y. T., Saricopur, A., Yurtdas, M., Senol, H. & Gokoz-Dogu, G. Atrial function in patients with breast cancer after treatment with Anthracyclines. *Arq. Bras. Cardiol.* <https://doi.org/10.5935/abc.20160146> (2016).
66. Lefrak, E. A., Pitha, J., Rosenheim, S. & Gottlieb, J. A. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32, 302–314 (1973).
67. Kilickap, S. et al. Early and late arrhythmogenic effects of doxorubicin. *South Med. J.* 100, 262–265 (2007).
68. Go, A. S. et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults. *JAMA* 285, 2370 (2001).
69. Nattel, S. Aging and protein kinase activation is it the missing link between age and atrial fibrillation? *Circ. Res.* 122, 799–801 (2018).
70. Rabkin, S. W. Aging effects on QT interval: implications for cardiac safety of antipsychotic drugs. *J. Geriatr. Cardiol.* 11, 20–25 (2014).

71. Rabkin, S. W., Cheng, X. B. J. & Thompson, D. J. S. Detailed analysis of the impact of age on the QT interval. *J. Geriatr. Cardiol.* 13, 740–748 (2016)
72. Spetz, J., Moslehi, J. & Sarosiek, K. Radiation-induced cardiovascular toxicity: mechanisms, prevention, and treatment. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* 20, 1–1 (2018).
73. Godishala, A., Yang, S. & Asnani, A. Cardioprotection in the modern era of cancer chemotherapy. *Cardiol. Rev.* 26, 113–121 (2018).
74. Agudelo, D., Bourassa, P., Bérubé, G. & Tajmir-Riahi, H. A. Intercalation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by DNA duplex: structural features and biological implications. *Int. J. Biol. Macromol.* 66, 144–150 (2014).
75. Chen, N. T. et al. Probing the dynamics of Doxorubicin-DNA intercalation during the initial activation of apoptosis by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). *PLoS One* 7, 3–10 (2012).
76. Skladanowski, A. & Konopa, J. Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. *Biochem. Pharmacol.* 47, 2269–2278 (1994).
77. Du, Q., Zhu, B., Zhai, Q. & Yu, B. Sirt3 attenuates doxorubicin-induced cardiac hypertrophy and mitochondrial dysfunction via suppression of Bnip3. *Am. J. Transl. Res.* 9, 3360–3373 (2017).
78. Shi, J., Surma, M. & Wei, L. Disruption of ROCK1 gene restores autophagic flux and mitigates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* 9, 12995–13008 (2018).
79. Burridge, P. W. et al. Human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.* 22, 547–556 (2016).
80. Debessa, G., Beatriz, L. & Maifrino, M. Age related changes of the collagen network of the human heart. 122, 1049–1058 (2001).
81. Kakimoto, Y. et al. Myocardial lipofuscin accumulation in ageing and sudden cardiac death. *Sci. Rep.* 9, 3304 (2019).
82. Mancilla, T. R., Davis, L. R. & Aune, G. J. Doxorubicin-induced p53 interferes with mitophagy in cardiac fibroblasts. *PLoS One* 15, e0238856 (2020).
83. Tanaka, R. et al. Reactive fibrosis precedes doxorubicin-induced heart failure through sterile inflammation. *ESC Heart Fail* 7, 588–603 (2020).

84. Adamcova, M., Skarkova, V., Seifertova, J. & Rudolf, E. Cardiac troponins are among targets of doxorubicin-induced cardiotoxicity in hiPCS-CMs. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2638 (2019).

85. Shivakumar P, Rani MU, Reddy AG, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int.* 2012 Sep;19(3):241-4. doi: 10.4103/0971-6580.103656. PMID: 23293460; PMCID: PMC3532767.