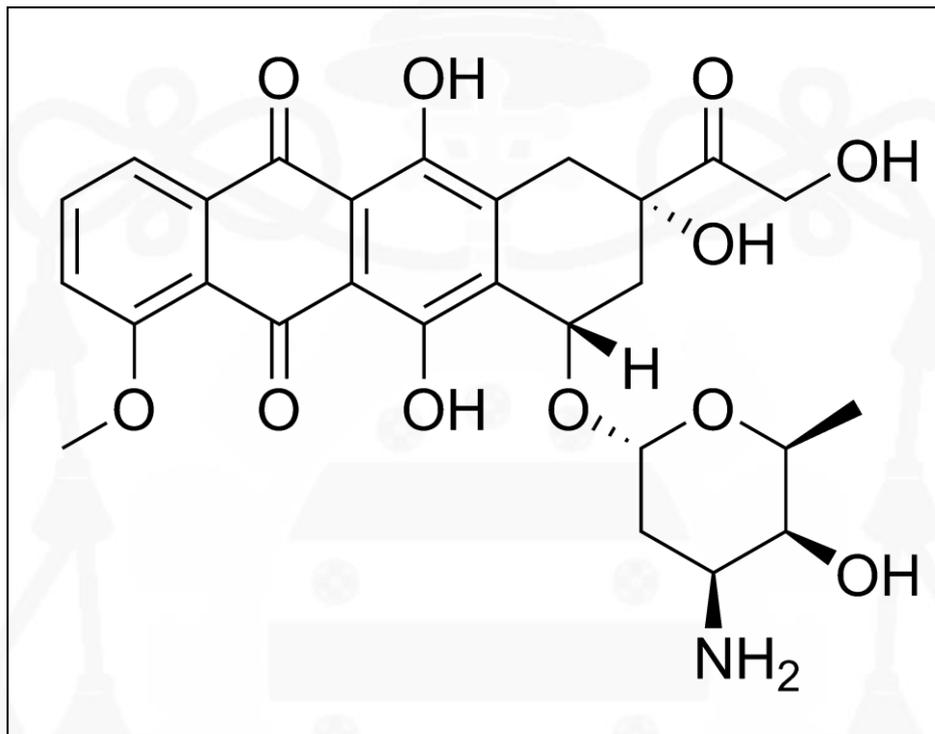


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOLOGÍA

DOXORRUBICINA: PASADO, PRESENTE Y FUTURO EN QUIMIOTERAPIA



Lucía Fernández Álvarez

Departamento de Microbiología/Universidad de Oviedo

Junio/2021



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA



Resumen: La doxorubicina es un antibiótico de la familia de las antraciclinas sintetizado por *Streptomyces peucetius* subs. *caesius* cepa ATCC 27952 ampliamente utilizado en quimioterapia debido a su función como agente intercalante de ADN que le permite inhibir la topoisomerasa II desencadenando la apoptosis de las células. Debido a su gran potencial, a lo largo de los años se ha estudiado su biosíntesis con el objetivo de obtener mayores niveles de doxorubicina; descubriendo que existen tres proteínas que actúan como reguladores positivos: DnrI, DnrN y DnrO y una cuarta proteína que regula negativamente la síntesis; DnrW. A pesar de su implicación en el cáncer, la doxorubicina presenta graves efectos secundarios como la cardiotoxicidad que aparece como consecuencia de la generación de radicales libres. A su vez, las células cancerígenas tratadas con doxorubicina generan resistencia contra el fármaco (MDR). Esto ha hecho que las investigaciones se hayan centrado en la búsqueda de nuevas formulaciones que permitan reducir estos efectos adversos y revertir la resistencia. Se han descubierto nuevos derivados como la epirubicina o la idarrubicina que presentan menos cardiotoxicidad; así como diferentes agentes que tienen función cardioprotectora. Del mismo modo, también se han desarrollado nuevas formas de aplicación para disminuir el daño cardíaco como es el caso de la encapsulación en liposomas. Sin embargo, el futuro de la doxorubicina está en su aplicación mediante nanopartículas que permiten combinar diferentes factores aumentando la eficacia del tratamiento y eliminando la resistencia.

Summary: Doxorubicin is an antibiotic of the anthracycline family synthesized by *Streptomyces peucetius* subs. *caesius* strain ATCC 27952 widely used in chemotherapy to its function as a DNA intercalating agent that allows the inhibition of topoisomerase II, triggering apoptosis of cells. Due to its great potential, its biosynthesis has been studied over the years with the aim of obtaining higher levels of doxorubicin; discovering that there are three proteins that act as positive regulators: DnrI, DnrN and DnrO and a fourth protein which act as negative regulator; DnrW. However, doxorubicin has serious side effects such as cardiotoxicity that appears as a consequence of the generation of free radicals. Moreover, cancer cells treated with doxorubicin generate resistance against the drug. This fact, has focused research on finding new formulations that will reduce these adverse effects and reverse resistance. New derivatives such as epirubicin or idarubicin have been discovered to produce less cardiotoxicity; as well as different agents that have a cardioprotective function. In the same way, new forms of application have also been developed to reduce cardiac damage, such as encapsulation in liposomes. However, the future of doxorubicin will be its application through nanoparticles because combining different factors, increasing the effectiveness of the treatment and eliminating resistance.

Declaración de originalidad

Dña Lucía Fernández Álvarez estudiante del Grado en Biología de la Universidad de Oviedo con DNI 71740350S, **DECLARO:**

Que todos los textos e imágenes presentes en este trabajo son originales, y de no serlo, todas las fuentes utilizadas han sido citadas debidamente dando créditos a los correspondientes autores, siguiendo los procedimientos habituales en este campo de la ciencia.

OVIEDO, A 4 DE JUNIO DE 2021

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	2
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	3
3.	HISTORIA DE LA DOXORRUBICINA	3
4.	BIOSÍNTESIS.....	4
4.1	SÍNTESIS GENERAL	4
4.2	GENES IMPLICADOS	5
4.3	SOBREPRODUCCIÓN DE DOXORRUBICINA	6
5.	MECANISMO DE ACCIÓN	7
6.	CARDIOTOXICIDAD	8
6.1	TIPOS DE CARDIOTOXICIDAD Y FACTORES DE RIESGO	8
6.2	CAUSAS DE LA CARDIOTOXICIDAD	9
6.3	CARDIOPROTECCIÓN	10
6.3.1	<i>Métodos de administración de doxorubicina</i>	<i>10</i>
6.3.2	<i>Derivados de doxorubicina menos cardiotóxicos</i>	<i>11</i>
6.3.2.1	<i>Epirrubicina</i>	<i>11</i>
6.3.2.2	<i>Idarrubicina</i>	<i>12</i>
6.3.3	<i>Agentes cardioprotectores</i>	<i>12</i>
7.	RESISTENCIA A LA DOXORRUBICINA.....	13
7.1	TRANSPORTADORES ABC	14
7.1.1	<i>P-gp.....</i>	<i>14</i>
7.1.2	<i>Mrp</i>	<i>15</i>
7.1.3	<i>BCRP.....</i>	<i>16</i>
7.2	MECANISMOS GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS	16
7.3	REVERSIÓN DE RESISTENCIA.....	17
7.3.1	<i>Rinacantina-C</i>	<i>17</i>
7.3.2	<i>Verapamilo</i>	<i>18</i>
7.3.3	<i>Resveratrol.....</i>	<i>18</i>
7.3.4	<i>Vielanin P.....</i>	<i>18</i>
7.3.5	<i>Ciclosporina A</i>	<i>19</i>
8.	NUEVAS FORMULACIONES DE DOXORRUBICINA	19
8.1	NANOMICELLAS	19
8.2	NANOPARTÍCULAS.....	21
8.2.1	<i>Nanopartículas orgánicas.....</i>	<i>22</i>
8.2.1.1	<i>Nanopartículas de polialquilcianoacrilato (PACA)</i>	<i>22</i>
8.2.1.2	<i>Nanopartículas de MPEG-PLA</i>	<i>22</i>
8.2.2	<i>Nanopartículas inorgánicas.....</i>	<i>23</i>
8.2.2.1	<i>Nanopartículas de oro.....</i>	<i>23</i>
8.2.2.2	<i>Nanopartículas de óxido de hierro supermagnético (SPIONs)</i>	<i>23</i>
8.2.2.3	<i>Nanopartículas de diamante</i>	<i>24</i>
9.	CONCLUSIONES	24
10.	REFERENCIAS	26



1. Introducción

En los últimos años el cáncer ha sido una de las enfermedades más estudiadas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la segunda causa de muerte a nivel mundial y una de cada seis muertes en el mundo se producen como consecuencia de dicha enfermedad (OMS, 2018).

El Instituto Nacional del Cáncer (NIH) explica los diferentes tipos de tratamientos que se emplean para combatir la enfermedad y menciona que es bastante frecuente que se combinen varios de ellos. La elección de un tipo u otro de tratamiento depende de varios factores como el tipo de tumor, la localización etc. Algunos de ellos son: la cirugía en la cual se extirpa el tumor; la radioterapia que utiliza la radiación para eliminar las células cancerígenas y disminuir la dimensión de los tumores; la inmunoterapia que fortalece el sistema inmune para superar la enfermedad; la terapia hormonal la cual ralentiza el crecimiento de aquellos cánceres que se desarrollan mediante hormonas; o incluso el trasplante de células madre donde se reestablecen las células madre en la sangre (Escudero-Ortiz et al., 2012)(NCI, 2020).

Uno de los tratamientos más utilizado es la quimioterapia; donde se utilizan diversos fármacos como, por ejemplo, las antraciclinas, que son un tipo de antibióticos citotóxicos obtenidos a partir de cultivos de bacterias del género *Streptomyces* y que están especialmente indicados para tratar tumores sólidos y hematológicos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las antraciclinas también producen efectos adversos como la cardiotoxicidad (Romero-Barzola et al., 2018)

La doxorubicina es una de las principales antraciclinas usadas en quimioterapia desde su descubrimiento en la década de los 70. Es un medicamento antineoplásico, es decir, inhibe la proliferación celular indiscriminada que se produce cuando hay un cáncer. Tiene un efecto citotóxico que puede conducir a un estrés oxidativo, el cual provoca una muerte celular por apoptosis (Escudero-Ortiz et al., 2012).

Su mecanismo de acción se caracteriza por la intercalación en el ADN. Cuando se intercala impide la síntesis macromolecular porque inhibe la enzima topoisomerasa II (Rivankar, 2014)

En la actualidad se utiliza mucho en su forma liposomal. Cabe destacar que fue el primer medicamento encapsulado en liposomas que tuvo aprobación para usarse contra el cáncer. La forma de clorhidrato de doxorubicina provoca daño en el ADN y en la membrana celular debido a la producción de radicales libres (Rivankar, 2014).



2. Material y métodos

Es un trabajo de índole bibliográfico y para su realización se ha llevado a cabo una investigación mediante el uso de diversos buscadores como PubMed, Web of Science (WOS), Elsevier y Google Académico utilizando como palabras claves: doxorubicina, *Streptomyces peucetius*, anthracyclines, cancer, cardiotoxicity, resistance y nanoparticles. La búsqueda y lectura de artículos científicos se ha realizado en inglés debido a que es la lengua más utilizada en el ámbito científico.

Se han incluido artículos y revisiones con una amplia temporalidad con el fin de conocer los inicios de este fármaco y a su vez reportar las nuevas técnicas que se están investigando y que podrían resolver graves problemas

Por último, con el objetivo de poder gestionar adecuadamente todas las referencias bibliográficas se ha utilizado el editor bibliográfico Mendeley para guardar, citar y referenciar de forma adecuada todas las fuentes consultadas.

3. Historia de la doxorubicina

En la década de los 50 comenzaron a estudiarse diferentes antibióticos antitumorales aislados a partir de *Streptomyces*. No fue hasta una década después cuando producto de esas investigaciones se descubrió que, a partir de la cepa *Streptomyces peucetius* se podía obtener un antibiótico natural con acción antitumoral especialmente indicado para tratar leucemias; este compuesto recibió el nombre de daunorrubicina. Sin embargo, a medida que los estudios avanzaron se detectó que el fármaco generaba una gran toxicidad gastrointestinal y dermatológica, aunque destacaba especialmente la cardiotoxicidad. A su vez también provoca otros efectos secundarios como la alopecia o la estomatitis. Por tanto, los análisis se centraron en encontrar otros compuestos relacionados que resultaran menos tóxicos (Nobili et al., 2009).

En el año 1969 un equipo italiano (Arcamone et al.) aisló un derivado de la daunorrubicina con un grupo hidroxilo en la posición 14, la 14-hidroxi-daunorrubicina a la que se denominó doxorubicina. Sin embargo, la doxorubicina también presenta cierta toxicidad, por lo que en la actualidad se siguen buscando formas de reducir estos efectos adversos (Nobili et al., 2009).

Es de vital importancia el estudio del proceso de biosíntesis de la doxorubicina, ya que determinadas modificaciones en dicho proceso pueden presentar ciertas ventajas, como el aumento de la producción o la síntesis de nuevos compuestos con mayor efectividad. Mediante



la manipulación de determinados genes que intervienen en el proceso de biosíntesis se puede conseguir una mayor producción del fármaco; y a su vez si se introducen ciertos genes heterólogos en mutantes se pueden obtener diferentes derivados mediante fermentación (Marinelli & Molinari, 2012).

4. Biosíntesis

4.1 Síntesis general

Tanto la daunorrubicina como la doxorubicina son producidas por diferentes cepas de *Streptomyces peucetius*. La daunorrubicina se sintetiza de manera natural a través de esta bacteria, cepa ATCC 29050. Sin embargo, la doxorubicina es el producto mayoritario de *S. peucetius* subs. *caesius* cepa ATCC 27952, siendo la daunorrubicina un intermediario de la ruta biosintética. La doxorubicina, por tanto, se obtiene mediante la hidroxilación en el carbono 14 de la daunorrubicina que es su precursor inmediato (Lomovskaya et al., 1999).

En la biosíntesis de antraciclinas interviene un complejo multienzimático denominado policétido sintasa tipo II (PKSII) la cual actúa sobre la unidad de inicio, el propionil-CoA. La finalidad es formar un decaquetido, una cadena de un de 21 carbonos, a partir del propionil-CoA y de nueve unidades de malonil-CoA (Bao et al., 1999).

Una vez formado el decaquetido tienen lugar una serie de condensaciones aldólicas de ciclación y el carbono 12 se oxida lo cual lleva a la formación del ácido aplanónico que es el primer policétido dotado del sistema característico de anillos de la ruta de síntesis de la daunorrubicina (Bao et al., 1999) El ácido aplanónico se convierte en ϵ -rodomicinona la cual se glicosila por la incorporación del deoxyazúcar aminado TDP-daunosamina formando el primer intermediario glicosilado, la rodomicina D. A partir de la rodomicina D se forma la daunorrubicina y posteriormente la doxorubicina. En este proceso intervienen 3 genes: *dnrP*, *dnrK* y *DoxA*. En primer lugar, la rodomicina D sufre una desmetilación mediada por *dnrP* y a continuación una descarboxilación produciendo 13-desoxicarminomicina (DOC). La 13-desoxicarminomicina se metila por la acción de *dnrK* dando lugar a 13-desoxidaunorrubicina (DOD). Mediante *DoxA* se produce una hidroxilación en el carbono 13 y posteriormente una oxidación formándose daunorrubicina. En este momento ya se obtiene la daunorrubicina que puede utilizarse como fármaco antitumoral. Sin embargo, para obtener la doxorubicina es necesario un último paso mediado nuevamente por *DoxA* que hidroxila el carbono 14 creando así la doxorubicina (Figura 1) (Walczak et al., 1999).

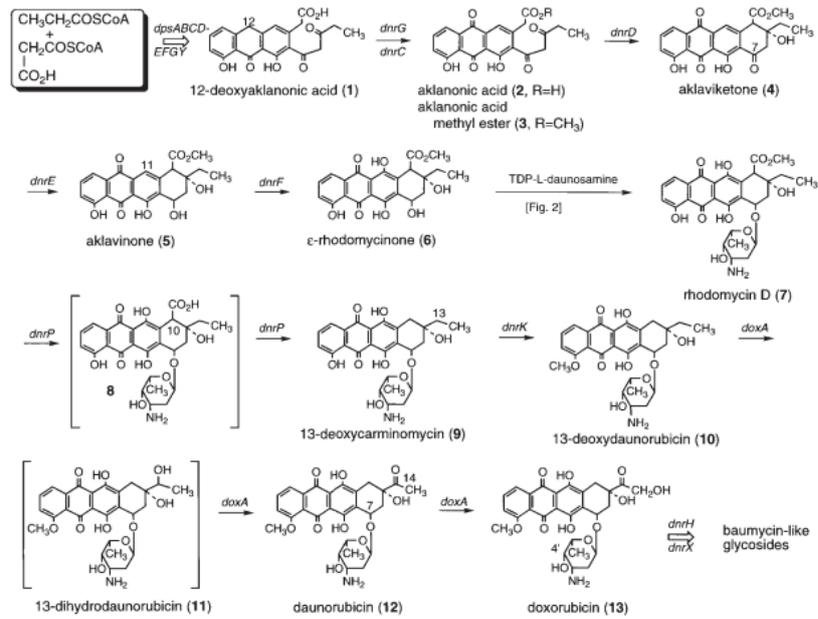


Figura 1- Ruta simplificada del proceso de biosíntesis de doxorubicina. Las flechas abiertas indican varios pasos entre en precursor y el producto final (Hutchinson & Colombo, 1999)

4.2 Genes implicados

Hay tres proteínas que regulan transcripcionalmente la síntesis de doxorubicina: DnrI, DnrN y DnrO. Además, se descubrió una cuarta proteína que actúa como regulador negativo, DnrW. Mediante diferentes estudios se llegó a la conclusión de que la síntesis de doxorubicina está regulada por una retroalimentación gracias a la diferente expresión de los genes que codifican estas proteínas reguladoras (Jiang & Hutchinson, 2006).

La proteína DnrO regula de forma positiva la expresión del gen *dnrN*. A su vez la proteína DnrN activa el gen *dnrI* que es el responsable del inicio de la síntesis de doxorubicina. Se ha demostrado experimentalmente que, si se inactiva el gen *dnrO*, el *dnrN* o el *dnrI*, se bloquea la síntesis de daunorubicina. Por otra parte, también se ha visto que el gen *dnrO* se autoreprime (Otten et al., 2000).

En el caso de la regulación negativa, parece ser que la proteína DnrW actúa como un regulador negativo del gen *dnrI*. Esto tiene grandes implicaciones, puesto que si se elimina gen *dnrW* la transcripción de *dnrI* aumenta, lo cual provoca un incremento en la producción de daunorubicina (Yuan et al., 2011).

En todo el proceso de biosíntesis intervienen múltiples genes que tienen gran importancia a la hora de conseguir la doxorubicina. De hecho, dependiendo de estos genes y sus mutantes podemos obtener mayores cantidades de doxorubicina, o mejorar algunos de los aspectos de su síntesis.



Los genes que codifican la PKSII en el caso de *Streptomyces peucetius* se denominan *dps* y cada uno de ellos presenta distintas funciones. Por ejemplo, los genes *dspA* y *dspB* codifican las subunidades de cetosintasa (KS), mientras que los genes *dspC* y *dspD* codifican proteínas que están implicadas en el establecimiento de la unidad de inicio de la ruta de biosíntesis; y el gen *dpsE* codifica para una cetoreductasa. A lo largo de diferentes estudios se ha visto que estos genes presentan analogías con otros presentes en otras bacterias como *Streptomyces lividans* (Grimm et al., 1994).

Sin embargo, en el proceso de biosíntesis el paso fundamental es el que permite la conversión de daunorrubicina a doxorubicina y esto se consigue mediante la hidroxilación en el carbono 14 de la daunorrubicina y se ejecuta gracias a la acción de *DoxA* un citocromo P-450 monooxigenasa. Además, se ha visto que *DoxA* tiene mucha especificidad de sustrato para antraciclinas glicosiladas y cataliza otros dos procesos de oxidación a lo largo de la síntesis de la doxorubicina, lo que la convierte en una proteína esencial (Walczak et al., 1999).

4.3 Sobreproducción de doxorubicina

El aumento de producción de la doxorubicina supone un gran interés tanto comercial como farmacológico. Por esta razón se han realizado diferentes estudios para conseguir mayores cantidades del fármaco mejorando el proceso de fermentación o modificando la cepa original mediante ingeniería genética (Malla et al., 2009).

La obtención de doxorubicina disminuye principalmente por dos motivos. El primero es que se trata de una sustancia citotóxica y, por tanto, provoca la muerte celular impidiendo el desarrollo del organismo que la produce. El segundo es la transformación de daunorrubicina y doxorubicina en glucósidos denominados baumicinas (Malla et al., 2010).

Para evitar estos problemas y aumentar la síntesis de doxorubicina se han estudiado diferentes mecanismos; uno de ellos implica la mutación del gen *dnrH* que en su forma natural está implicado en la transformación de doxorubicina a baumicinas y la sobreexpresión del gen *dnmT*, un gen que participa en la biosíntesis de la daunosamina. Por tanto, su sobreexpresión permite una mayor producción de rodomicina D y al combinar esto con la mutación del gen *dnrH* se aumenta la síntesis de doxorubicina (Scotti & Hutchinson, 1996).

Por otra parte, el gen *dnrX* tiene una función similar al *dnrH*, y el gen *dnrU* funciona como cetoreductasa y se ha visto que la cepa que combina los genes *dnrX*, *dnrU* y *dnrH* inactivados fue la que consiguió una mayor producción de doxorubicina (Malla et al., 2009).



Los genes reguladores juegan un papel clave en la sobreproducción de doxorubicina. Al estudiar dichos reguladores positivos en *Streptomyces peucetius* se ha visto que tienen un gran impacto en la obtención del antibiótico. Mediante diversos experimentos se comprobó que si se insertan más copias de los genes *dnrN* y *dnrI* aumenta la biomasa y producción de doxorubicina. Además, existe un regulador global que es capaz de activar los genes estructurales del azúcar de tal modo que incrementa la abundancia de daunosamina denominado *afsR*. Debido a esto, si se sobreexpresan de forma conjunta *dnrN*, *dnrI* y *afsR* se maximiza la producción de doxorubicina (Malla et al., 2010).

En cuanto a la proteína reguladora negativa DnrW, se ha visto que si se elimina el gen *dnrW* hay una mayor transcripción de *dnrI* que se traduce en una producción de daunorrubicina hasta ocho veces mayor de la normal. A su vez, también proporciona una mayor resistencia contra la toxicidad propia de la daunorrubicina (Yuan et al., 2011).

Por tanto, para crear cepas que aumenten la síntesis de doxorubicina se necesita el efecto conjunto de dos factores. Por un lado, sobreexpresar genes de azúcares que permitan aumentar la cantidad de daunosamina y por otro, mutar genes que confieran más resistencia a la citotoxicidad de la doxorubicina. Además, también se puede mejorar añadiendo resinas adsorbentes en la fermentación (Malla et al., 2010).

5. Mecanismo de acción

La doxorubicina se intercala en el ADN e inhibe la topoisomerasa II desencadenando en último término una muerte celular programada (Figura 2).

La topoisomerasa II es una enzima que actúa sobre la topología del ADN durante los procesos de replicación y transcripción. Para realizar esta función realiza cortes en las dos hebras del ADN haciendo que un segmento de ADN pase a través de la rotura (mella) para después volver a unir los cortes consumiendo ATP. En este proceso se forma un complejo entre la topoisomerasa II y el ADN. La doxorubicina se fija a este complejo y lo estabiliza impidiendo que la doble hélice de ADN pueda volver a sellarse de modo que bloquea la replicación (Flórez Beledo et al., 2013).

Sin embargo, la doxorubicina también puede actuar contra las células cancerosas debido a que produce radicales libres que generan un estrés oxidativo provocando daños en el ADN y muerte celular (Figura 2). Esto se debe a que la doxorubicina tiene una estructura de quinona que se puede oxidar a un radical semiquinona el cual reacciona con oxígeno formando superóxido y peróxido de hidrógeno que producen daño en el ADN (Yang et al., 2014).

Otra de las acciones de la doxorubicina es que es un quelante del hierro, con el que forma un complejo doxorubicina-hierro. Este complejo interviene en la reacción que transforma el peróxido de hidrógeno en radicales libres de hidroxilo que nuevamente dañan el ADN (Yang et al., 2014).

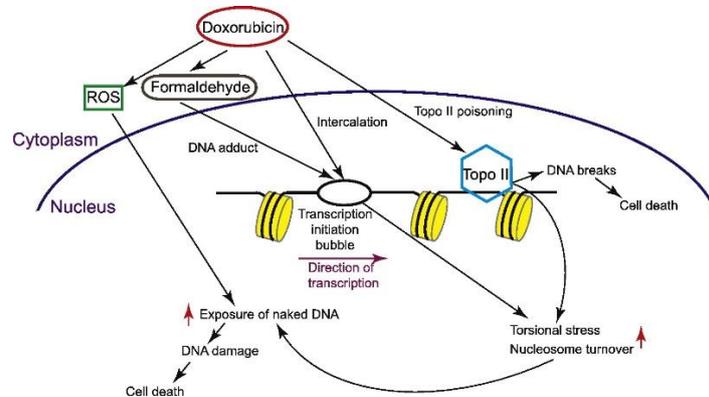


Figura 2- La doxorubicina se intercala en el ADN y atrapa a la topoisomerasa II aumentando la tensión de torsión y produciendo roturas en la doble hebra de ADN que conducen a la muerte celular. A su vez, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que también desencadenan daño celular (Yang et al., 2014).

6. Cardiotoxicidad

6.1 Tipos de cardiotoxicidad y factores de riesgo

La cardiotoxicidad es el principal problema que presenta el tratamiento con doxorubicina en particular y otras antraciclinas en general. Dependiendo del daño que se produzca se diferencian dos tipos de cardiotoxicidad:

1. Aguda: Es poco frecuente y normalmente ocurre tras la aplicación de una dosis del fármaco y los síntomas se presentan en la primera semana de tratamiento. Los pacientes presentan arritmias y pueden llegar a tener pericarditis.
2. Crónica: Es más frecuente. Comienza habitualmente en el primer año de tratamiento debido a la acumulación de dosis y puede continuar una vez finalizado el mismo. Da lugar a miocardiopatías. En ocasiones los efectos aparecen años después de haberse administrado el tratamiento y provocan arritmias e insuficiencia cardíaca (Flórez Beledo et al., 2013)

Es de vital importancia conocer los factores que aumentan el riesgo de padecer cardiotoxicidad inducida por el tratamiento con antraciclinas, ya que eso permite minimizar los riesgos y actuar de forma adecuada según el paciente.



En el caso de la cardiotoxicidad crónica se ha visto que la dosis que se acumula de doxorubicina es un factor de riesgo, por lo que es importante administrar la menor cantidad posible. A su vez, la edad y el sexo también suponen un problema que se agudiza en menores de 4 años. Superada la infancia, con el aumento de la edad se incrementan las probabilidades de sufrir cardiotoxicidad. En cuanto al sexo, las mujeres son más vulnerables que los hombres. Por otra parte, los pacientes que tienen enfermedades cardíacas previas o hipertensión presentan peor pronóstico (Pai & Nahata, 2000).

Para prevenir que se produzcan grandes daños e incluso la muerte hay que llevar a cabo un seguimiento en el paciente para lo que se realizan con frecuencia electrocardiogramas, radiografías de tórax etc. También puede realizarse una biopsia miocárdica que es un método con gran sensibilidad, pero debido a que es invasivo no se puede realizar con frecuencia (Pai & Nahata, 2000).

6.2 Causas de la cardiotoxicidad

La cardiotoxicidad se produce por acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Las enzimas NOS y NOX son las principales responsables de la producción de ROS debido a que son las responsables de que la doxorubicina se transforme en una semiquinona y se formen especies como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Este radical hidroxilo también aumenta como consecuencia de la interacción que se produce entre la doxorubicina y el hierro. La presencia de estos radicales libres va a provocar daño en el ADN y muerte celular (Koleini & Kardami, 2017).

El daño en el miocardio se produce por la presencia de todos estos radicales debido a que presenta poca cantidad de superóxido dismutasa y catalasa por lo que la única manera que tiene para protegerse del daño es mediante la enzima glutatión peroxidasa. El problema radica en que esta enzima se ve disminuida por el tratamiento con doxorubicina (Hurtado et al., 2011).

Las enzimas NOS son las responsables de la producción de óxido nítrico que reacciona con el superóxido dando lugar a peroxinitrito que es un agente oxidante muy reactivo. Existen dos isoformas de Nos: la endotelial (eNOS), y la inducible (iNOS). Ambas isoformas juegan un papel fundamental en la toxicidad que produce la doxorubicina. En un experimento llevado a cabo con ratones se demostró que la eliminación de eNOS disminuía los efectos de la cardiotoxicidad, y, por el contrario, la sobreexpresión de eNOS produce un mayor impacto en los miocardiocitos. Además, también hay algunos experimentos que muestran un efecto similar con iNOS de modo



que los ratones que no expresan este enzima tienen mayor resistencia a la cardiotoxicidad (Koleini & Kardami, 2017).

Hay que tener en cuenta que el ciclo REDOX de la doxorubicina no es el único culpable de la cardiotoxicidad que genera. Cuando se aplica doxorubicina, ésta se une a la topoisomerasa tipo II dando lugar a un mecanismo que provoca la muerte celular. La topoisomerasa II presenta dos isoformas: la alfa y la beta. La doxorubicina forma un complejo uniéndose a la isoforma alfa que es expresada por las células tumorales en altas cantidades. Sin embargo, los cardiomiocitos expresan la isoforma beta. El problema es que la doxorubicina interacciona con esta topoisomerasa II-beta haciendo que se acumulen ROS y desencadenando un gran daño en el miocardio. De hecho, existen evidencias de que la supresión de la topoisomerasa II-beta protege a los cardiomiocitos de la toxicidad (Capetta et al., 2017).

Además, se ha visto que el citocromo CYP2J2 se encarga de transformar el ácido araquidónico (ácido graso) en cuatro regioisómeros de ácidos epoxieicosatrienoicos (EET). Estos EET son cardioprotectores. A su vez, el socio redox de CYP2J, el citocromo P-450 reductasa (CPR) reduce a la doxorubicina dando lugar a 7-deoxydoxorubicin (7-de-aDOX) que inhibe de forma parcial el metabolismo del ácido araquidónico y aumenta la síntesis de unos EET que tienen menos eficacia contra la cardiotoxicidad. Por tanto, esta es otra de las razones por las que aumenta el efecto cardiotóxico de la doxorubicina (Arnold & Das, 2018).

6.3 Cardioprotección

Tal como se ha mencionado anteriormente, la cardiotoxicidad es el principal problema que presenta el uso de doxorubicina. Por esta razón, se han investigado en diversas estrategias que permitan evitar y reducir sus efectos nocivos.

Para llevar a cabo una prevención primaria de la cardiotoxicidad se pueden seguir dos vías diferentes:

1. Disminuir la intensidad cardiotóxica: Esto se consigue utilizando distintos métodos de administración o derivados de la doxorubicina que tengan menor toxicidad.
2. Combinar el tratamiento con el uso de un agente cardioprotector.

6.3.1 Métodos de administración de doxorubicina

La aplicación de doxorubicina en infusión continua disminuye la cardiotoxicidad. En diferentes estudios se ha comprobado que cuando se administra el fármaco de manera estable las



concentraciones de doxorubicina en el corazón disminuyen respecto a la aplicación en bolo. La infusión continua no debe prolongarse mucho en el tiempo ya que puede tener otros efectos adversos. Habitualmente se utiliza una infusión continua de doxorubicina entre 48-72 horas (Vejpongsa & Yeh, 2014). Sin embargo, en un estudio realizado en 2012 en niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) se observó que la infusión continua no confiere ninguna mejora contra la cardiotoxicidad respecto a la aplicación en bolo. Por tanto, no sirve como cardioprotector en la población infantil (Lipshultz et al., 2012).

La encapsulación liposomal permite reducir los niveles de cardiotoxicidad sin que se pierda eficacia respecto al tratamiento con doxorubicina convencional debido a que las moléculas de doxorubicina se encuentran encapsuladas en el interior de esferas con una bicapa lipídica, formando unas vesículas llamadas liposomas. La doxorubicina liposomal se puede administrar de dos formas diferentes (Rivankar, 2014):

1. Doxorubicina liposomal pegilada: El liposoma está rodeado por una capa de polietilenglicol (PEG). Aumenta la vida media del fármaco que, además, se mantiene encapsulado hasta llegar al lugar donde está el tumor. Reduce la cardiotoxicidad, pero produce el síndrome mano-pie (HSF), por lo que solo está aprobado su uso para el cáncer de ovario.
2. Doxorubicina liposomal no pegilada (NPDL): En este caso no está recubierta de PEG por lo que no se produce el HSF. A su vez, también aumenta la vida media respecto a la doxorubicina convencional y disminuye la cardiotoxicidad. Se usa ampliamente para diferentes tipos de cáncer como el de mama.

6.3.2 Derivados de doxorubicina menos cardiotóxicos

Además de la daunorrubicina y de la doxorubicina existen otras antraciclinas que se usan en clínica debido a que presentan ventajas respecto a los niveles de cardiotoxicidad que producen.

6.3.2.1 *Epirrubicina*

Es un epímero de la doxorubicina que se obtiene por la epimerización del grupo hidroxilo en la posición 4 del anillo de daunosamina. Su mecanismo de acción es prácticamente igual que el de la doxorubicina. Sin embargo, se ha demostrado que aplicando dosis equimolares de doxorubicina y de epirrubicina, los pacientes tratados con epirrubicina presentan menos toxicidad lo que permite administrar dosis más altas del fármaco. Su uso está ampliamente aprobado en clínica y se usa, por ejemplo, para tratar el cáncer de mama (Khasraw et al., 2012).



Además, según un estudio realizado en el 2017 primero en ratas y después con pacientes humanos, se ha llegado a la conclusión de que al igual que ocurre con la doxorubicina, si se administra epirrubicina en infusión continua la cardiotoxicidad se reduce aún más (Yang et al., 2017).

6.3.2.2 Idarrubicina

Es un análogo de la daunorrubicina que sustituye un átomo de hidrógeno por un grupo metoxilo presente en el anillo D (4-demetoxi-daunorrubicina), lo que la hace ser más lipofílica. Al igual que la doxorubicina funciona como agente intercalante de ADN, pero desde que comenzó a estudiarse este fármaco se vio que reducía los niveles de cardiotoxicidad, siendo entre cinco y diez veces menos cardiotóxica que la daunorrubicina (Crivellari et al., 2004).

A su vez la idarrubicina también tiene una mayor actividad antitumoral, por lo que se utiliza especialmente para tratar algunos tipos de cáncer como las leucemias agudas en las que aporta muy buenos resultados especialmente si se combina con citarabina.(Hollingshead & Faulds, 1991).

6.3.3 Agentes cardioprotectores

Pese a que las formas de administración de la doxorubicina, o el uso de otras antraciclinas puedan ayudar a disminuir la cardiotoxicidad no solventan el problema, ya que todas estas formas siguen siendo cardiotóxicas, aunque en menor medida. Por esta razón se usan múltiples agentes cardioprotectores con el fin de evitar al máximo los daños.

El agente más usado es el dexrazoxano, un fármaco que se suministra al paciente por vía intravenosa junto con la doxorubicina para reducir los problemas derivados de la cardiotoxicidad que produce la antraciclina. Se aconseja que se inyecte en una proporción 10:1 frente a la doxorubicina. Funciona como un quelante de hierro, interacciona con el hierro libre al cual se une y provoca que haya una menor cantidad de complejos doxorubicina-hierro de modo que reduce la presencia de ROS, disminuyendo a su vez la potencia de la cardiotoxicidad (Eneh & Lekkala, 2020).

Recientemente se ha realizado un estudio para relacionar la cardioprotección que ofrece el dexrazoxano con los miRNA, y se ha demostrado que el miR-17-5p regula la protección frente a la apoptosis que el dexrazoxano aporta a los cardiomiocitos. Esto podría tener grandes



implicaciones en la búsqueda de nuevos tratamientos que protejan al paciente contra la toxicidad de la doxorubicina (Yu et al., 2020).

Existen otros agentes cardioprotectores que presentan muy buenos resultado. Este es el caso de algunos bloqueadores beta como el carvedilol que previene la liberación de radicales libres; de los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) que disminuyen la apoptosis y el estrés oxidativo; y, de las estatinas como la fluvastina que puede reducir el estrés oxidativo aumentando la expresión de la superóxido dismutasa II haciendo que se produzca menos inflamación cardiaca (Cruz et al., 2016).

No obstante, es un tema de plena actualidad y se siguen realizando una gran cantidad de estudios con el objetivo de identificar nuevos agentes que ofrezcan cardioprotección frente a las antraciclinas. Por ejemplo, se ha demostrado experimentalmente con ratas que la oximatrina protege de la cardiotoxicidad producida por doxorubicina debido a que disminuye el estrés oxidativo y la apoptosis por lo que podría usarse en clínica si se comprueba que no se interpone con el efecto antitumoral de la doxorubicina (Zhang et al., 2017).

7. Resistencia a la doxorubicina

El problema principal en el tratamiento farmacológico contra el cáncer es la aparición de resistencias que impiden el correcto funcionamiento del procedimiento. Esta resistencia a la quimioterapia puede ser innata en el caso de que se desarrolle con anterioridad a la existencia de contacto entre el tumor y el fármaco; o puede ser adquirida si se presenta con posterioridad a la administración del medicamento (Paredes et al., 2006).

Las células cancerígenas pueden generar resistencia a múltiples fármacos (MDR). Existen bombas de eflujo MDR que expulsan hacia fuera de las células varios de los fármacos que se suministran para tratar un cáncer; como por ejemplo la doxorubicina. También existe la posibilidad de que capture dichos medicamentos en lisosomas impidiendo la interacción con la diana molecular. Por otra parte, la inestabilidad genómica juega un papel clave en el aumento de las resistencias contra fármacos, de modo que determinados factores como mutaciones o deleciones y translocaciones pueden incrementar la probabilidad de desarrollar resistencia. Esto supone un grave problema debido a que impide que el tratamiento funcione contra el tumor y por tanto, la enfermedad no presenta mejoría (Cao et al., 2020).

7.1 Transportadores ABC

En el caso de las antraciclinas en general y la doxorubicina en particular, la mayoría de las resistencias aparecen por un aumento de las bombas de salida MDR que pertenecen a la familia de transportadores ABC. Está demostrado que la sobreexpresión de algunos transportadores ABC aumenta la resistencia a múltiples fármacos (MDR) lo que conlleva una menor eficiencia de la quimioterapia (Amawi et al., 2019).

Estos sistemas transmembranales, son transportadores que contienen dominios de unión y degradación de ATP, de ahí sus siglas ABC. Constituyen un amplio conjunto de proteínas transmembrana que intervienen en el transporte activo de diferentes sustratos a través de la bicapa de la membrana celular. Normalmente, los transportadores ABC están formados por dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) o dominios de unión a ATP también y por dos dominios transmembrana (TMD) que se encuentran asociados con 6-11 hélices alfa que establecen la especificidad del sustrato (Figura 3) (Amawi et al., 2019).

Destaca principalmente el efecto de 3 proteínas pertenecientes a los transportadores ABC: la glicoproteína P (P-gp), la proteína asociada a la resistencia de múltiples fármacos (MRP1) y la proteína de resistencia contra el cáncer de mama (BCRP).

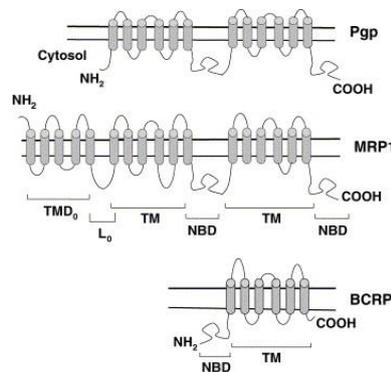


Figura 3-Estructura de las 3 proteínas que forman parte de los transportadores ABC: P-gp, MRP1 Y BCRP (Aouali et al., 2005)

7.1.1 P-gp

La sobreexpresión de la glicoproteína P (P-gp) es el mecanismo más estudiado de MDR. La P-gp es una proteína transmembrana de 170 Kda (también se llama proteína P-17015) que está codificada por el gen MDR1. Actúa como una bomba dependiente de ATP provocando la salida del fármaco al exterior celular, siendo la culpable de que las células cancerígenas sean resistentes a multitud de agentes citotóxicos entre los que se incluye la doxorubicina (Choi et al., 2002).



La P-gp lleva a cabo el eflujo de doxorubicina fuera de las células debido a que fomenta la salida de doxorubicina del núcleo, que es el lugar en el que el antibiótico se une a la topoisomerasa II y al ADN. De este modo, disminuye los niveles de doxorubicina haciendo que no consiga atacar a las células y por tanto, induce la resistencia a múltiples fármacos (MDR). Sin embargo, cuando se produce un bloqueo farmacológico y hay una menor expresión de la P-gp; las células si son sensibles al tratamiento con doxorubicina (Chaikomom et al., 2018).

Hay muchos grupos de investigación cuyo estudio se basa en la búsqueda de nuevos métodos que permitan disminuir los niveles de expresión de P-gp con el objetivo de eliminar la resistencia a doxorubicina que produce. Se ha descubierto que el verapamilo y la ciclosporina A funcionan como inhibidores de la P-gp por lo que podrían usarse en diferentes terapias para reducir esta farmacorresistencia (Paredes et al., 2006).

7.1.2 Mrp

La Mrp es una familia de transportadores celulares que incluye varias proteínas. Además de ser un transportador ABC, también se encuentra en el retículo endoplasmático por lo que estas proteínas están involucradas tanto en la expulsión de los fármacos de las células como en el secuestro de dichos agente antitumorales en vesículas citoplasmáticas (Choi et al., 2002).

MRP1 es una glicoproteína que se encuentra unida a la membrana que es codificada por el gen MRP1 y tiene 190 Kda. Cuando se expresa aumenta la resistencia de las células cancerígenas aportando resistencia a la quimioterapia con diferentes fármacos como las antraciclinas, entre las que destaca la doxorubicina. Estructuralmente es muy similar a la P-gp siendo las únicas diferencias entre ambas proteínas la existencia en MRP1 de un dominio extra que cruza la membrana en el extremo amino terminal; el TMDO. Por otra parte, los sustratos que utiliza la P-gp son compuestos orgánicos neutros, mientras que la MRP1 usa como sustratos compuestos hidrófobos, aniones orgánicos conjugados y agentes aniónicos no conjugados. Por ejemplo, transporta los fármacos que se suministran contra el cáncer cuando están conjugados con glutatión (Amawi et al., 2019).

La MRP1 ofrece resistencia al tratamiento con doxorubicina en distintos tipos de cáncer, pero donde más se ha estudiado es en el cáncer de pulmón; y se ha visto que otra proteína de la familia Mrp, la MRP3 también aporta resistencia a la doxorubicina en pacientes con cáncer de pulmón debido a que contribuye a la resistencia intrínseca de este cáncer contra la quimioterapia (Paredes et al., 2006).



7.1.3 BCRP

La proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP) es otro de los transportadores ABC. Sin embargo, se dice que es un medio transportador porque solo tiene un TMD en el extremo carboxilo terminal y un NBD en el extremo amino terminal. Debido a su papel como medio transportador es necesaria una homodimerización para que la BCRP funcione como transportador plenamente activo. La BCRP tiene 72 Kda y está codificada por el gen ABCG2 (Choi & Yu, 2014).

La BCRP puede utilizar diferentes sustratos entre los que se incluyen agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina. Puesto que es capaz de reconocer y transportar los fármacos usados contra el cáncer, la expresión de BCRP en las células cancerígenas genera múltiples mecanismos de resistencia contra fármacos (MDR) debido a que se produce una salida activa del medicamento (Nakanishi & Ross, 2012).

El descubrimiento de inhibidores que sean capaces de bloquear la salida del fármaco de las células que se produce por la acción de la BCRP es de gran interés para mejorar la eficiencia de los tratamientos y conseguir un mejor pronóstico (Nakanishi & Ross, 2012).

7.2 *Mecanismos genéticos y epigenéticos*

Además de la acción de los transportadores, la resistencia a la quimioterapia también puede producirse como consecuencia de alteraciones en determinados genes o enzimas.

Diferentes estudios han demostrado que una reducción en la expresión de la topoisomerasa II conducen a la quimiorresistencia frente a determinados fármacos como las antraciclinas. Dicha quimiorresistencia también puede surgir como resultado de enzimas aberrantes que actúan arreglando el daño que se produce en el ADN. Existe una relación entre la supresión de los enzimas que reparan estos fallos del ADN (MSH2 y MLH1) y la presencia de un genotipo resistente a inhibidores de la topoisomerasa II como la epirrubcina, la doxorubicina y la mitoxantrona (Fedier et al., 2001).

El hecho de que si existe una pérdida de MSH2 o MLH1 se genere resistencia a doxorubicina indica que la selección de células resistentes a las antraciclinas puede producirse como consecuencia del fallo en la reparación del ADN. En base a esto, diferentes estudios han probado que los fallos en la reparación de los errores de emparejamiento del ADN están involucrados en una disminución de la supervivencia en el cáncer de mama. De hecho, en un experimento en el



que se tomaron muestras de pacientes con cáncer de mama antes y después de recibir un tratamiento de quimioterapia con doxorubicina se verificó una gran reducción de células que expresan MLH1. Por tanto, las células cancerígenas que expresan MLH1 en poca proporción tienen una mayor capacidad de sobrevivir durante la quimioterapia con doxorubicina (Fedier et al., 2001).

Por otra parte, cuando se produce un aumento en la metilación del ADN se pueden incrementar las formas de supervivencia y la evasión de la apoptosis produciendo resistencia. Se ha comprobado que la metilación del ADN puede interactuar con la metilación de histonas dando lugar a cambios epigenéticos que aumentan las metilaciones y acetilaciones en las células del cáncer de mama que son resistentes a doxorubicina. A su vez, la MSH2 al inactivarse epigenéticamente conduce a la desactivación de la vía apoptótica dependiente de MSH2 que genera resistencia a diversos fármacos. Todos estos cambios epigénéticos que se originan en la etapa inicial de resistencia contra los fármacos se incrementan de forma proporcional al aumentar el nivel de resistencia (Ponnusamy et al., 2018).

7.3 Reversión de resistencia

Puesto que la resistencia supone un grave problema en el tratamiento con doxorubicina muchas de las investigaciones realizadas a lo largo de los años se han centrado en la búsqueda de nuevos fármacos o mecanismos inhibitorios que permitan devolver a las células la sensibilidad al fármaco.

7.3.1 Rinacantina-C

La rinacantina-C es un éster de naftoquinona que se encuentra en hojas y raíces de la planta *Rhinacanthus nasutus*. Tiene una acción quimiosensibilizante y se ha visto que la combinación de fármacos citotóxicos como la doxorubicina con fármacos quimiosensibilizantes aportan grandes beneficios en la terapia contra aquellos tipos de cáncer que tienen un fenotipo MDR. La rinacantina-C interacciona con dos de los transportadores ABC: P-gp y MRP2, provocando su inhibición y consiguiendo así un incremento en los niveles intracelulares de doxorubicina. Por tanto, es capaz de aumentar la cantidad de doxorubicina en las células hasta sus niveles citotóxicos haciendo que pueda revertirse la MDR y que las células cancerígenas superen la resistencia a la doxorubicina (Chaisit et al., 2017).



7.3.2 Verapamilo

El verapamilo es un bloqueador de los canales de calcio ampliamente utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades como por ejemplo las cardiovasculares. Además, es un inhibidor de la glucoproteína P-gp, lo que le permite revertir la resistencia que se produce en las células tumorales por la sobreexpresión de P-gp consiguiendo eliminar completamente la MDR cuando se aplica en dosis de entre 5-10 μM . El problema es que cuando la concentración de verapamilo es mayor de 2 μM se genera daño cardiovascular por lo que hay que buscar nuevos sistemas que permitan eliminar la MDR y sin que se produzca este daño cardiaco (Li et al., 2019).

7.3.3 Resveratrol

El resveratrol es una fitoalexina que está presente en la piel de algunas frutas como las uvas y que tiene grandes propiedades en quimioterapia como la inhibición del crecimiento de diferentes tipos de células tumorales. En el caso del tratamiento con doxorubicina resulta de especial interés debido a que la administración de resveratrol produce una bajada en los niveles de la proteína MRP1 y esto hace que las células cancerígenas pierdan la resistencia contra la doxorubicina. Por tanto, el resveratrol permite la reversión del fenotipo MDR en células tratadas con doxorubicina. Puesto que es un compuesto natural que podemos encontrar en muchos alimentos como frutas y verduras se ha propuesto su aplicación como suplemento dietético para aquellos pacientes que presenten resistencia contra la quimioterapia (Kweon et al., 2010).

7.3.4 Vielanin P

El vielanin P es un meroterpenoide presente en las hojas de *Xylopiá vielana*. Este compuesto tiene propiedades importantes para mejorar la resistencia de las células cancerígenas al tratamiento con doxorubicina debido a que reduce los niveles de uno de los transportadores ABC con más relevancia en cuanto a la resistencia: la proteína MRP1, que disminuye de una forma proporcional tanto en función del tiempo como de la concentración a la que se administra el vielanin P. Esta MRP1 disminuye debido a que el vielanin P inhibe la vía de señalización PI3K/Nrf2. Esto provoca un aumento de la concentración intracelular de doxorubicina revertiendo la resistencia a múltiples fármacos (MDR). Además, tiene la gran ventaja de que no aumenta los niveles de citotoxicidad por lo que podría usarse en un futuro como un agente farmacológico contra la quimiorresistencia (Gao et al., 2019).



7.3.5 Ciclosporina A

La ciclosporina A es un modulador de MDR que es capaz de inhibir la actividad ATPasa de P-gp. Cuando la ciclosporina A está presente aumenta la captación de doxorubicina por parte de las células, revirtiendo la resistencia a la quimioterapia (Morjani & Madoulet, 2010). Sin embargo, existe un compuesto derivado de la ciclosporina D, el PSC833 o valsopodar que tiene una efectividad 10 veces superior a la de la ciclosporina A reduciendo la resistencia contra la doxorubicina. Tanto la ciclosporina A como el PSC833 son buenos candidatos para usarse como inhibidores de la glucoproteína P y aumentar la disponibilidad intracelular de fármacos contra el cáncer, eliminando así la resistencia (Aouali et al., 2005).

8. Nuevas formulaciones de doxorubicina

La cardiotoxicidad y la quimiorresistencia son los principales problemas que presenta el tratamiento con doxorubicina. Debido a ello, se han estado desarrollando nuevos métodos de aplicación del fármaco que consigan minimizar al máximo estos efectos secundarios indeseables.

8.1 *Nanomicellas*

El uso de micelas poliméricas que se cargan con doxorubicina combinada con algún otro compuesto que ayude a mejorar sus cualidades está ampliamente extendido como una de las formulaciones más exitosas para revertir la MDR.

Las nanomicellas cargadas con doxorubicina y curcumina pueden disminuir la resistencia en el cáncer de pulmón. La curcumina es un colorante natural procedente de la cúrcuma, especia obtenida del rizoma de la planta del mismo nombre, que tiene múltiples propiedades como la inducción de la apoptosis o la inhibición del crecimiento de células cancerígenas. Por tanto, es un buen candidato para superar la resistencia a múltiples fármacos. Se han generado micelas poliméricas (PM) utilizando PGS₁₀₀₀ (succinato de d-tocoferil polietilenglicol) y DSPE-PEG₂₀₀₀ (1,2-diestearoil-*sn* glicero-3-fosfoetanolamina-*N*-metoxi-poli (etilenglicol)₂₀₀₀) debido a que la curcumina es hidrófoba y si no se administrara en nanomicellas junto a la doxorubicina se degradaría (Figura 4). A su vez, también se necesita que tengan un pequeño tamaño para que

puedan atacar a las células tumorales a través del efecto de mayor permeabilidad y retención (EPR) (Gu et al., 2016)

$$DL (\%) = (M_i/M) \times 100\%$$

$$LE (\%) = (M_i/M_1) \times 100\%$$

(1) Cytotoxicity analysis

Human lung cancer cells, A549 cells (DOX-sensitive),

(2) A549/Adr cells (P-gp overexpressing, DOX-resistant), and

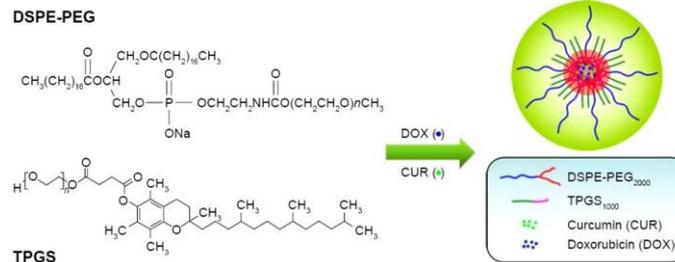


Figure 1 Schematic illustration of (DOX + CUR)-PMs assembled using DSPE-PEG₂₀₀₀ and TPGS₁₀₀₀.
 Abbreviations: CUR, curcumin; DOX, doxorubicin; DSPE-PEG₂₀₀₀, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-methoxy-poly(ethylene glycol)₂₀₀₀; PMs, polymeric micelles; TPGS₁₀₀₀, D-tocopheryl polyethylene glycol₁₀₀₀ succinate.

Figura 4- Estructura de las nanomicelas formadas por doxorubicina, curcumina, TPGS₁₀₀₀ Y DSPE-PEG₂₀₀₀ (Gu et al., 2016)

La curcumina puede eliminar el bombeo de P-gp y el componente PGS₁₀₀₀ de la micela polimérica es capaz de inhibir P-gp. De este modo, la combinación de doxorubicina, curcumina y el componente PGS₁₀₀₀ tienen una actividad sinérgica que permite un aumento de la citotoxicidad hacia las células tumorales ya que aumenta la concentración de doxorubicina en las células y además se incrementa el tiempo de circulación en sangre. A su vez, estas micelas también permiten una reversión de la resistencia generada a la doxorubicina (Gu et al., 2016).

En modelos de ratones se ha demostrado que estas micelas de curcumina y doxorubicina son capaces de inhibir la proliferación de células tumorales en aquellos individuos portadores de tumores, por lo que podrían ser un buen tratamiento futuro para diferentes tipos de cáncer como el de pulmón (Gu et al., 2016).

En el caso del cáncer de ovario se ha visto que las nanomicelas cargadas con doxorubicina y curcumina disminuyen la quimiorresistencia. La curcumina es una antraquinona lipofílica abundante en hierbas con propiedades medicinales. Las micelas poliméricas se han ensamblado gracias a la combinación de PGS₁₀₀₀ y DSPE-PEG₂₀₀₀. La aplicación de estas nanomicelas provoca una liberación del fármaco más lenta de modo que combinándolo con el diminuto tamaño de estas partículas se produce un aumento en el tiempo en el cual está presente en la circulación y como consecuencia aumenta la concentración plasmática del medicamento (Han et al., 2018).

Por otra parte, también se ha comprobado que las nanomicelas cargadas con doxorubicina y curcumina aumentan la citotoxicidad y son capaces de inducir la apoptosis de aquellas células tumorales que son resistentes a la doxorubicina revertiendo así la resistencia a múltiples fármacos (MDR). Este estudio tiene un gran valor debido a que a las mejoras de citotoxicidad y

reversión de la resistencia hay que sumarle que presenta unos niveles de toxicidad bastante bajos por lo que es un buen método sobre el que seguir estudiando para poder prevenir el avance del cáncer de ovario (Han et al., 2018).

Otro estudio ha relevado una gran mejora de los resultados en pacientes que presentan glioblastoma gracias al uso de nanomicellas cargadas con doxorubicina modificadas con borneol. En el tratamiento contra el glioblastoma se utiliza una inyección intracraneal de doxorubicina a través de la arteria carótida interna. El problema radica en que la doxorubicina no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) de forma eficiente y además genera cardiotoxicidad (Meng et al., 2019).

El borneol se obtiene de productos procesados de resinas y aceites volátiles presentes en plantas de la familia *Dipterocarpaceae*. Este compuesto cobra gran interés debido a que es capaz de atravesar la BHE y combinarse con la P-gp bombeándola fuera de la célula y provocando que los fármacos puedan acumularse en el cerebro. Para formar y ensamblar las nanomicellas cargadas con borneol y doxorubicina se usó DSPE-PEG₂₀₀₀. Una vez aplicado este tratamiento se vio que efectivamente había mejorado notablemente el transporte de doxorubicina a través de la BHE y que se acumulaba rápidamente en los tejidos cerebrales. A su vez, el estudio reveló que en los ratones tratados con estas nanomicellas se inhibía el crecimiento tumoral lo que lo convierte en un posible tratamiento futuro contra el glioblastoma muy interesante (Meng et al., 2019).

8.2 Nanopartículas

Las nanopartículas (NP) son un buen enfoque en el tratamiento contra el cáncer debido a que permiten incrementar los niveles de fármaco en el interior de las células lo que contribuye a disminuir los diferentes efectos adversos haciendo que la nanotecnología sea una de las mejores opciones para combatir los actuales problemas que presenta la quimioterapia. En el caso de la doxorubicina, las nanopartículas se clasifican en tres grupos: NP inorgánicas; NP orgánicas y NP integradas (Figura 5) (Shafei et al., 2017).

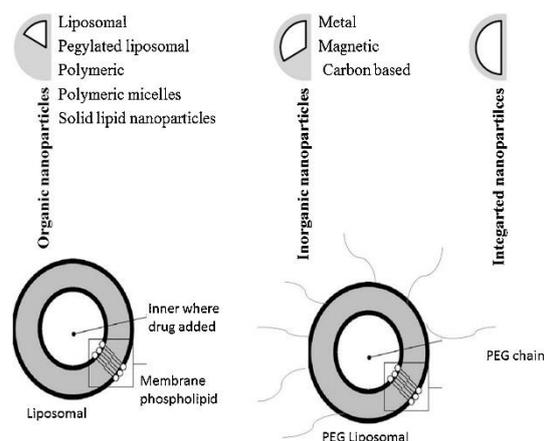


Figura 5- Clasificación y esquema general de las diferentes nanopartículas (NP) (Shafei et al., 2017)



8.2.1 Nanopartículas orgánicas

8.2.1.1 *Nanopartículas de polialquilcianoacrilato (PACA)*

Estas nanopartículas elevan la acción citotóxica de la doxorubicina y además son capaces de disminuir la resistencia a múltiples fármacos (MDR). Sin embargo, su eficacia contra los mecanismos de resistencia no es muy elevada por lo que con el objetivo de revertirla se cargaron las nanopartículas de PACA con ciclosporina A encapsulada con doxorubicina. La ciclosporina A es un fármaco inhibidor de la P-gp por lo que al encapsularla con la doxorubicina se observó una inhibición de la proliferación de las células cancerígenas (Soma et al., 2000).

Estas nanopartículas provocan un aumento en las concentraciones del fármaco a nivel intracelular ocasionando una menor resistencia contra en tratamiento. Además, el estudio mostró que la inhibición de la tasa de crecimiento es superior a la que se obtiene con otros métodos y esto es debido a la sinergia entre la doxorubicina y la ciclosporina A; ya que si se administran sin encapsular su acción es mucho más reducida. Por tanto, este método supone un avance en la mejora del tratamiento y podría implementarse próximamente (Soma et al., 2000).

8.2.1.2 *Nanopartículas de MPEG-PLA*

MPEG-PLA es un polímero anfipático que tiene capacidad biodegradable y a su vez puede formar un complejo de inclusión con diferentes fármacos usados en la terapia contra el cáncer por lo que tiene diversas aplicaciones en dicha terapia. Además, también es capaz de hacer que los compuestos insolubles se solubilizan y mejorar la eficacia de los fármacos una vez que éstos se han administrado al paciente (Zheng et al., 2018).

En un estudio realizado para revertir la resistencia a la quimioterapia en casos de cáncer de ovario se han usado las nanopartículas MPGE-PLA para coencapsular verapamilo y doxorubicina. El verapamilo es un inhibidor de la P-gp cuya sobreexpresión contribuye a que las células cancerígenas presenten resistencia. Por tanto, elimina la P-gp de modo revierte la resistencia contra el fármaco y además aumenta la inhibición del crecimiento del tumor (Zheng et al., 2018).

La administración simultánea de verapamilo y doxorubicina encapsulados en nanopartículas MPEG-PLA incrementa la citotoxicidad haciéndola más efectiva a la vez que disminuye los niveles de toxicidad. Esto sumado a la reversión de la resistencia lo convierte en un tratamiento con mucho potencial para tratar a pacientes con cáncer de ovario (Zheng et al., 2018).



8.2.2 Nanopartículas inorgánicas

8.2.2.1 *Nanopartículas de oro*

Las nanopartículas de oro tienen una serie de características excepcionales como su pequeño volumen o su simplicidad para sintetizarse. Debido a esto y a otros factores como una gran permeabilidad y una citotoxicidad nula, son una herramienta adecuada para suministrar diversos fármacos. En diferentes estudios se ha probado la eficacia de estas nanopartículas para tratar varios tipos de cáncer como el de páncreas o el de mama debido a que la conjugación de estas nanopartículas de oro con agentes antitumorales permite disminuir los efectos secundarios del tratamiento (Coelho et al., 2019)

En un ensayo clínico llevado a cabo en el año 2019 se utilizaron nanopartículas de oro para combatir la leucemia. Para ello se conjugaron las nanopartículas de oro con anti-221 (inhibidor de miR-221) y con AS1411 (oligonucleótido que se expresa en la superficie de las células leucémicas) y se cargaron con doxorubicina. De este modo, gracias a la endocitosis las nanopartículas de oro son capaces de entrar en el interior de las células y mediante el reconocimiento de AS1411 pueden penetrar en aquellas células que presentan resistencia al tratamiento. La doxorubicina se libera del complejo formado por la nanopartícula de oro y AS1411 interaccionando con el ADN impidiendo la proliferación celular y estimulando la apoptosis. A su vez, anti-221 disminuye los niveles de P-gp aumentando la sensibilidad de las células y superando así la resistencia (Deng et al., 2019)

Por tanto, las nanopartículas de oro tienen un gran potencial futuro para combinar diversos factores que puedan ayudar a superar la resistencia contra la doxorubicina haciendo que el tratamiento sea más efectivo y presente menos efectos secundarios.

8.2.2.2 *Nanopartículas de óxido de hierro supermagnético (SPIONs)*

Las SPIONs están formadas por un núcleo magnético de Fe_3O_4 . Gracias a sus propiedades magnéticas, estas nanopartículas se usan para administrar fármacos de forma dirigida ya que mediante la aplicación de un campo magnético se pueden redireccionar hacia diversos tumores en el cuerpo.

Sin embargo, este sistema tiene varios inconvenientes como una baja solubilidad en agua por lo que es necesario combinarlo con PEG de modo que se forma un complejo SPIO-PEG-DOX que permite una menor degradación de la doxorubicina, aumentando su vida media y permitiendo

que la doxorubicina se entrelace con el ADN desencadenando un incremento de la apoptosis de las células cancerígenas (Liang et al., 2016).

A su vez, si se utiliza un campo magnético local, el complejo SPIO-PEG-DOX puede dirigirse al tumor y retenerlo con más facilidad (Figura 6). De este modo se demostró que aplicando un campo magnético local el tamaño del tumor disminuía significativamente y además se lograba reducir la cardiotoxicidad y los efectos secundarios derivados de ésta (Liang et al., 2016).

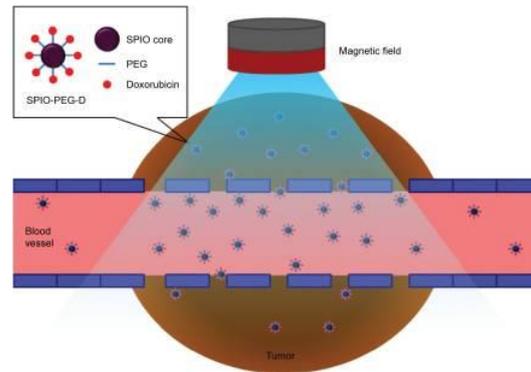


Figura 6- Nanopartículas de SPIO conjugadas con PEG y aplicación de un campo magnético durante el tratamiento con doxorubicina (Liang et al., 2016).

8.2.2.3 Nanopartículas de diamante

Los nanodiamantes son unas de las nanopartículas que menor toxicidad presentan. Por esta razón se ha investigado su uso en nanomedicina para ayudar a la administración dirigida de fármacos por lo que se ha propuesto la combinación de estas nanopartículas con transferrina y doxorubicina (Wang et al., 2015).

La transferrina (Tf) ha servido como marcador específico de las células tumorales debido a que reacciona con receptores de transferrina que están presentes en la superficie de dichas células. De este modo se ha formado el complejo Tf-DOX y se ha conjugado con nanodiamantes, dando lugar a las nanopartículas ND-(Tf-DOX) que pueden actuar de forma específica sobre las células cancerígenas gracias a una endocitosis dependiente de clatrina; lo que impide el desarrollo tumoral y reduce los efectos adversos del tratamiento por lo que es una vía de investigación futura para la quimioterapia con doxorubicina (Wang et al., 2015).

9. Conclusiones

La doxorubicina ha sido desde su descubrimiento un importante agente quimioterapéutico. A pesar de tener grandes desventajas como la cardiotoxicidad, se ha seguido utilizando debido a su gran utilidad en la lucha contra el cáncer. No obstante, las investigaciones científicas se han centrado en reducir al máximo los efectos adversos generados por el fármaco.

Se han descubierto diferentes proteínas reguladoras (DnrO, DnrN, DnrI y DnrW) así como diferentes genes como *afsR*, que es un gen regulador global capaz de activar los otros genes estructurales, que contribuyen a la producción del compuesto por el microorganismo *S.*



peucetius. Estos descubrimientos y muchos otros han hecho posible aumentar las producciones industriales de doxorubicina consiguiendo que el tratamiento sea más favorable en términos económicos.

Mediante el estudio del mecanismo de acción se ha comprobado que al intercalarse con el ADN ataca a la topoisomerasa II, crea especies reactivas de oxígeno e incluso actúa como un quelante de hierro desencadenando la muerte celular de las células. Esto cobra gran relevancia debido a que no solo provoca la apoptosis de las células tumorales, sino que también daña al resto de células del organismo produciendo efectos adversos, siendo el más destacado la cardiotoxicidad. Controlando la dosis que se aplica del fármaco se pueden reducir los niveles de cardiotoxicidad. A su vez, se han desarrollado nuevas formulaciones como la encapsulación en liposomas o nuevos derivados sintéticos como la epirrubicina e idarrubicina que disminuyen este problema. Sin embargo, no se ha logrado eliminar la cardiotoxicidad totalmente, por lo que en la actualidad se investiga en agentes cardioprotectores como el dexrazoxano y nuevas formas de aplicación para lograr su desaparición.

El otro gran problema que presenta la doxorubicina es la aparición de MDR, producida especialmente por la sobreexpresión de transportadores ABC (P-gp, MRP1, y BCRP). Actualmente ya se han encontrado compuestos que actúan como inhibidores de estos transportadores como el verapamilo o la ciclosporina A, pero todavía no está extendido su uso.

Todo esto nos conduce al futuro en el tratamiento con doxorubicina, ya que la prioridad es solventar todos los problemas que se han expuesto (cardiotoxicidad, resistencia, etc.). Esto puede lograrse mediante el uso de la nanomedicina. Hay gran cantidad de estudios que reflejan que mediante el uso de nanomicelas o nanopartículas conjugadas con doxorubicina se puede reducir la citotoxicidad, disminuyendo el daño cardíaco y aumentando la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento. Es un amplio campo de investigación, ya que pueden utilizarse desde nanopartículas poliméricas hasta nanopartículas metálicas (oro, diamante, etc.).

Por tanto, la doxorubicina es un agente quimioterapéutico muy utilizado que tiene una alta eficacia y que en un futuro logrará sin ninguna duda, superar todos los problemas que presenta en la actualidad, mejorando notablemente la calidad de vida de los pacientes.



10. Referencias

- Amawi, H., Sim, H. M., Tiwari, A. K., Ambudkar, S. v., & Shukla, S. (2019). ABC transporter-mediated multidrug-resistant cancer. *Advances in experimental medicine and biology* 1141, 549–580. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_12
- Aouali, N., Eddabra, L., Macadré, J., & Morjani, H. (2005). Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Critical reviews in oncology/hematology* 56(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.12.010>
- Arnold, W. R., & Das, A. (2018). An Emerging Pathway of Doxorubicin Cardiotoxicity Mediated through CYP2J2. *Biochemistry* 57(16), 2294–2296. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00337>
- Bao, W., Sheldon, P. J., Wendt-Pienkowski, E., & Hutchinson, C. R. (1999). The Streptomyces peuceletii dpsC gene determines the choice of starter unit in biosynthesis of the daunorubicin polyketide. *Journal of bacteriology*, 181(15), 4690–4695. <https://doi.org/10.1128/jb.181.15.4690-4695.1999>
- Cao, X., Hou, J., An, Q., Assaraf, Y. G., & Wang, X. (2020). Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resistance Updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 49, 100671. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.100671>
- Cappetta, D., De Angelis, A., Sapio, L., Prezioso, L., Illiano, M., Quaini, F., Rossi, F., Berrino, L., Naviglio, S., & Urbanek, K. (2017). Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: A common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 1521020. <https://doi.org/10.1155/2017/1521020>
- Chaikomom, K., Chattong, S., Chaiya, T., Tiwawech, D., Sritana-Anant, Y., Sereemasapun, A., & Manotham, K. (2018). Doxorubicin-conjugated dexamethasone induced MCF-7 apoptosis without entering the nucleus and able to overcome MDR-1-induced resistance. *Drug design, development and therapy*, 12, 2361–2369. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S168588>
- Chaisit, T., Siripong, P., & Jianmongkol, S. (2017). Rhinacanthin-C enhances doxorubicin cytotoxicity via inhibiting the functions of P-glycoprotein and MRP2 in breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 795, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.12.002>
- Choi, J. H., Lim, H. Y., Joo, H. J., Kim, H. S., Yi, J. W., Kim, H. C., Cho, Y. K., Kim, M. W., & Lee, K. B. (2002). Expression of multidrug resistance-associated protein 1, p-glycoprotein, and thymidylate synthase in gastric cancer patients treated with 5-fluorouracil and doxorubicin-based adjuvant chemotherapy after curative resection. *British journal of cancer*, 86(10), 1578–1585. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600305>
- Choi, Y. H., & Yu, A. M. (2014). ABC Transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Current pharmaceutical design*, 20(5), 793–807. <https://doi.org/10.2174/138161282005140214165212>
- Coelho, S. C., Reis, D. P., Pereira, M. C., & Coelho, M. (2019). Doxorubicin and varlitinib delivery by functionalized gold nanoparticles against human pancreatic adenocarcinoma. *Pharmaceutics*, 11(11), 551. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110551>



- Crivellari, D., Lombardi, D., Spazzapan, S., Veronesi, A., & Toffoli, G. (2004). New oral drugs in older patients: A review of idarubicin in elderly patients. *Critical reviews in oncology/hematology*, 49(2), 153-163. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(03\)00120-3](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(03)00120-3)
- Cruz, M., Duarte-Rodrigues, J., & Campelo, M. (2016). Cardiotoxicity in anthracycline therapy: Prevention strategies. *Portugese journal of cardiology*, 35(6), 359-371. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2015.12.004>
- Deng, R., Ji, B., Yu, H., Bao, W., Yang, Z., Yu, Y., Cui, Y., Du, Y., Song, M., Liu, S., Meguellati, K., & Yan, F. (2019). Multifunctional gold nanoparticles overcome microRNA regulatory network mediated-multidrug resistant leukemia. *Scientific Reports*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41866-y>
- Eneh, C., & Lekkala, M. R. (2020). Dexrazoxane. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32809394>
- Escudero-Ortiz, V., Ramón-López, A., Duart, M. J., Pérez-Ruixo, J. J., & Valenzuela, B. (2012). Farmacocinética poblacional de doxorubicina aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farmacia hospitalaria*, 36(4), 282-291. <https://doi.org/10.1016/j.farma.2011.05.006>
- Fedier, A., Schwarz, V. A., Walt, H., Carpini, R. D., Haller, U., & Fink, D. (2001). Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *International journal of cancer*, 93(4), 571-576. <https://doi.org/10.1002/ijc.1356>
- Flórez Beledo, J., Armijo Simón J. A., & Mediavilla Martínez, Á. (2014). *Farmacología humana 6ª edición*. Elsevier Masson <https://www.elsevier.com/books/farmacologia-humana/florez-beledo/978-84-458-2316-3>
- Gao, H. L., Xia, Y. Z., Zhang, Y. L., Yang, L., & Kong, L. Y. (2019). Vielanin P enhances the cytotoxicity of doxorubicin via the inhibition of PI3K/Nrf2-stimulated MRP1 expression in MCF-7 and K562 DOX-resistant cell lines. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 58, 152885. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152885>
- Grimm, A., Madduri, K., Ali, A., & Hutchinson, C. R. (1994). Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene*, 151(1-2), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90625-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90625-4)
- Gu, Y., Li, J., Li, Y., Song, L., Li, D., Peng, L., Wan, Y., & Hua, S. (2016). Nanomicelles loaded with doxorubicin and curcumin for alleviating multidrug resistance in lung cancer. *International journal of nanomedicine*, 11, 5757-5770. <https://doi.org/10.2147/IJN.S118568>
- Han, N. N., Li, X., Tao, L., & Zhou, Q. (2018). Doxorubicin and rhein loaded nanomicelles attenuates multidrug resistance in human ovarian cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 498(1), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.042>
- Hollingshead, L. M., & Faulds, D. (1991). Idarubicin: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs*, 42(4), 690-719. <https://doi.org/10.2165/00003495-199142040-00010>
- Hutchinson, C. R., & Colombo, A. L. (1999). Genetic engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peucetius*: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 647-652. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900673>



- Hurtado, S. N., María, A., Mejía, C., & Sanabria, A. C. (2011). Cardiotoxicidad por quimioterapia Un enfoque práctico para el clínico. *Insuf Card*, 6(6), 131–143. <http://www.insuficienciacardiaca.org>
- Jiang, H., & Hutchinson, C. R. (2006). Feedback regulation of doxorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Research in microbiology*, 157(7), 666–674. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.02.004>
- Khasraw, M., Bell, R., & Dang, C. (2012). Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 21(2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.12.012>
- Koleini, N., & Kardami, E. (2017). Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget*, 8(28), 46663–46680. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16944>
- Kweon, S. H., Song, J. H., & Kim, T. S. (2010). Resveratrol-mediated reversal of doxorubicin resistance in acute myeloid leukemia cells via downregulation of MRP1 expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 395(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.147>
- Li, P., Zhong, D., & Gong, P. Y. (2019). Synergistic effect of paclitaxel and verapamil to overcome multi-drug resistance in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 516(1), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.189>
- Liang, P. C., Chen, Y. C., Chiang, C. F., Mo, L. R., Wei, S. Y., Hsieh, W. Y., & Lin, W. L. (2016). Doxorubicin-modified magnetic nanoparticles as a drug delivery system for magnetic resonance imaging-monitoring magnet-enhancing tumor chemotherapy. *International journal of nanomedicine*, 11, 2021–2037. <https://doi.org/10.2147/IJN.S94139>
- Lipshultz, S. E., Miller, T. L., Lipsitz, S. R., Neuberger, D. S., Dahlberg, S. E., Colan, S. D., Silverman, L. B., Henkel, J. M., Franco, V. I., Cushman, L. L., Asselin, B. L., Clavell, L. A., Athale, U., Michon, B., Laverdière, C., Schorin, M. A., Larsen, E., Usmani, N., & Sallan, S. E. (2012). Continuous versus bolus infusion of doxorubicin in children with ALL: Long-term cardiac outcomes. *Pediatrics*, 130(6), 1003–1011. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-0727>
- Lomovskaya, N., Otten, S. L., Doi-Katayama, Y., Fonstein, L., Liu, X. C., Takatsu, T., Inveni-Solari, A., Filippini, S., Torti, F., Colombo, A. L., & Hutchinson, C. R. (1999). Doxorubicin overproduction in *Streptomyces peucetius*: Cloning and characterization of the *dnrU* ketoreductase and *dnrV* genes and the *doxA* cytochrome P-450 hydroxylase gene. *Journal of bacteriology*, 181(1), 305–318. <https://doi.org/10.1128/jb.181.1.305-318.1999>
- Malla, S., Niraula, N. P., Liou, K., & Sohng, J. K. (2009). Enhancement of doxorubicin production by expression of structural sugar biosynthesis and glycosyltransferase genes in *Streptomyces peucetius*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 108(2), 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.03.002>
- Malla, S., Niraula, N. P., Liou, K., & Sohng, J. K. (2010). Improvement in doxorubicin productivity by overexpression of regulatory genes in *Streptomyces peucetius*. *Research in microbiology*, 161(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.12.003>
- Marinelli, F., & Molinari, F. (2012). Las fermentaciones en la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*.



- Meng, L., Chu, X., Xing, H., Liu, X., Xin, X., Chen, L., Jin, M., Guan, Y., Huang, W., & Gao, Z. (2019). Improving glioblastoma therapeutic outcomes via doxorubicin-loaded nanomicelles modified with borneol. *International journal of pharmaceutics*, 567, 118485. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118485>
- Morjani, H., & Madoulet, C. (2010). Immunosuppressors as multidrug resistance reversal agents. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 596, 433-446. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-416-6_19
- Nakanishi, T., & Ross, D. D. (2012). Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chinese journal of cancer*, 31(2), 73-99. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10320>
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological research*, 59(6), 365-378. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.01.017>
- Otten, S. L., Olano, C., & Hutchinson, C. R. (2000). The *dnrO* gene encodes a DNA-binding protein that regulates daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by controlling expression of the *dnrN* pseudo response regulator gene. *Microbiology*, 146(6), 1457-1468. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-6-1457>
- Pai, V. B., & Nahata, M. C. (2000). Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug safety*, 22(4), 263-302. <https://doi.org/10.2165/00002018-200022040-00002>
- Paredes, A., Blanco, J. L., & Echenique-Elizondo, M. (2006). Expression of multidrug resistance (MDR)-associated proteins in solid tumors. *Cirugía Española*, 79(4), 202-214. [https://doi.org/10.1016/S0009-739X\(06\)70855-7](https://doi.org/10.1016/S0009-739X(06)70855-7)
- Ponnusamy, L., Mahalingaiah, P., Chang, Y. W., & Singh, K. P. (2018). Reversal of epigenetic aberrations associated with the acquisition of doxorubicin resistance restores drug sensitivity in breast cancer cells. *European journal of pharmaceutical sciences*, 123, 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.07.028>
- Romero-Barzola, M. Yamina, & Sierra-Santos, Lucía. (2018). Tratamiento con antraciclinas, un antecedente sospechoso. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 11(1), 28-30
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(4), 853-858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Scotti, C., & Hutchinson, C. R. (1996). Enhanced antibiotic production by manipulation of the *Streptomyces peucetius* *dnrH* and *dnmT* genes involved in doxorubicin (adriamycin) biosynthesis. *Journal of bacteriology*, 178(24), 7316-7321. <https://doi.org/10.1128/jb.178.24.7316-7321.1996>
- Shafei, A., El-Bakly, W., Sobhy, A., Wagdy, O., Reda, A., Aboelenin, O., Marzouk, A., El Habak, K., Mostafa, R., Ali, M. A., & Ellithy, M. (2017). A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 95, 1209-1218. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.059>



- Soma, C. E., Dubernet, C., Bentolila, D., Benita, S., & Couvreur, P. (2000). Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials*, *21*(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00125-8)
- Vejpongsa, P., & Yeh, E. T. H. (2014). Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: Challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology*, *64*(9), 938–945. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1167>
- Walczak, R. J., Dickens, M. L., Priestley, N. D., & Strohl, W. R. (1999). Purification, properties, and characterization of recombinant *Streptomyces* sp. strain C5 DoxA, a cytochrome P-450 catalyzing multiple steps in doxorubicin biosynthesis. *Journal of bacteriology*, *181*(1), 298–304. <https://doi.org/10.1128/jb.181.1.298-304.1999>
- Wang, Z., Tian, Z., Dong, Y., Li, L., Tian, L., Li, Y., & Yang, B. (2015). Nanodiamond-conjugated transferrin as chemotherapeutic drug delivery. *Diamond and Related Materials*, *58*, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2015.06.008>
- Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J., & Henikoff, S. (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et biophysica acta*, *1845*(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.12.002>
- Yang, F., Lei, Q., Li, L., He, J. C., Zeng, J., Luo, C., Yeung, S. C. J., & Yang, R. (2017). Delivery of epirubicin via slow infusion as a strategy to mitigate chemotherapy-induced cardiotoxicity. *PLoS ONE*, *12*(11) e0188025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188025>
- Yu, X., Ruan, Y., Shen, T., Qiu, Q., Yan, M., Sun, S., Dou, L., Huang, X., Wang, Q., Zhang, X., Man, Y., Tang, W., Jin, Z., & Li, J. (2020). Dexrazoxane protects cardiomyocyte from doxorubicin-induced apoptosis by modulating miR-17-5p. *BioMed research international*, *2020*, 5107193. <https://doi.org/10.1155/2020/5107193>
- Yuan, T., Yin, C., Zhu, C., Zhu, B., & Hu, Y. (2011). Improvement of antibiotic productivity by knock-out of *dauW* in *Streptomyces coeruleobidus*. *Microbiological research*, *166*(7), 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.10.006>
- Zhang, Y. Y., Yi, M., & Huang, Y. P. (2017). Oxymatrine ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cellular physiology and biochemistry*, *43*(2), 626–635. <https://doi.org/10.1159/000480471>
- Zheng, W., Li, M., Lin, Y., & Zhan, X. (2018). Encapsulation of verapamil and doxorubicin by MPEG-PLA to reverse drug resistance in ovarian cancer. *Biomedicine and pharmacotherapy*, *108*, 565–573. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.039>