

ÍNDICE

Abreviaturas	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	15
1. La cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.....	17
1.1 Descubrimiento y tipos de antraciclinas.....	17
1.2 La cardiotoxicidad inducida por antraciclinas en pacientes pediátricos.....	18
1.3 Detección de la cardiotoxicidad	22
1.3.1 Técnicas de imagen	22
1.3.2 Biomarcadores sanguíneos.....	23
1.3.3 Variantes genéticas asociadas con la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas.....	24
1.4 Mecanismos de cardiotoxicidad de las antraciclinas.....	25
1.4.1 Estrés oxidativo	25
1.4.2 Daño mitocondrial	27
1.4.3 Daño en el ADN.....	27
1.4.4 Alteración del flujo autofágico	28
1.4.5 Alteración del calcio	28
1.4.6 Apoptosis.....	29
1.4.7 Fibrosis.....	30
1.5 Prevención de la cardiotoxicidad	30
2. Las células madre pluripotentes inducidas como modelos de enfermedad cardiovascular	32
2.1 Concepto de célula madre y tipos de células madre	32

2.2 Contexto histórico de las células madre pluripotentes inducidas	34
2.3 Aplicaciones de las células madre pluripotentes inducidas en el ámbito de la biomedicina	38
2.3.1 Uso de las iPSC en la terapia celular	39
2.3.2 Ensayos toxicológicos.....	40
2.3.3 Modelado de enfermedades empleando iPSC derivadas de pacientes.....	40
2.3.4 Modelado de la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas empleando iPSC.....	45
3. Los microARNs en la patología cardiovascular	47
3.1 Descubrimiento de los microARNs y origen evolutivo	47
3.2 Biogénesis y función de los miARNs.....	48
3.3 Los miARNs en la enfermedad cardíaca	50
3.3.1 Papel de los miARNs como biomarcadores en la enfermedad cardíaca.....	51
3.3.2 Potencial terapéutico de los miARNs en la enfermedad cardíaca.....	52
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
1. Hipótesis	59
2. Objetivos.....	59
MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. Pacientes	63
2. Declaración ética animal	63
3. Cultivo celular	63
3.1 Medios de cultivo	63

3.2 Células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) .	65
3.3 Diferenciación cardíaca	65
3.4 Cultivos primarios	66
3.4.1 Aislamiento de cardiomiocitos neonatales de rata	66
3.4.2 Aislamiento y cultivo de fibroblastos cardíacos de rata	67
3.4.3 Cultivo de fibroblastos cardíacos humanos	68
4. Análisis de marcadores cardíacos por citometría de flujo	68
5. Tratamiento con doxorubicina <i>in vitro</i>	69
6. Inmunofluorescencia en células	69
7. Ensayos de citotoxicidad y apoptosis <i>in vitro</i>	70
7.1 Ensayo de viabilidad celular CCK8	70
7.2 Ensayo de lactato deshidrogenasa	70
7.3 Tinción de anexina-V y DAPI	71
7.4 Actividad caspasa 3/7	71
8. Ensayos de estrés oxidativo <i>in vitro</i>	72
8.1 DCFH-DA	72
8.2 MitoSOX	72
8.3 Glutación reducido	73
9. Estudio del potencial de membrana mitocondrial	73
10. Transfección celular	73
11. Métodos de biología molecular	74
11.1 Extracción de ARN	74
11.2 Retrotranscripción de ARN	74

11.3 RT-qPCR de ARN	75
11.4 Extracción de miARN.....	77
11.5 Retrotranscripción de miARN	77
11.6 RT-qPCR de miARN	78
11.7 Extracción de proteína	78
11.8 Cuantificación de proteínas mediante ensayo de BCA	78
11.9 Western Blot	79
11.9.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	79
11.9.2 Transferencia a membrana de PVDF	80
11.9.3 Inmunodetección.....	80
12. Modelado experimental de la cardiotoxicidad inducida por doxorrubicina <i>in vivo</i>	82
12.1 Animales	82
12.2 Tratamiento con doxorrubicina y administración <i>in vivo</i> del miR-4732-3p.....	82
12.3 Ecocardiografía en ratas	83
12.4 Sacrificio de los animales y fijación por perfusión	83
12.5 Histología.....	84
12.5.1 Inclusión en parafina y corte de los corazones	84
12.5.2 Desparafinación del tejido	84
12.5.3 Tricrómico de Masson	85
12.5.4 Rojo sirio	86
12.5.5 Inmunofluorescencia en tejido	86
12.5.6 Cuantificación de la apoptosis por TUNEL	87
12.5.7 Medida del área transversal de los cardiomiocitos mediante tinción con WGA	88

13. Análisis de ontología génica de genes diana del miR-4732-3p	88
14. Análisis de interactoma	88
15. Análisis estadístico.....	89
RESULTADOS	91
1. Selección de pacientes oncológicos pediátricos con cardiotoxicidad inducida por antraciclinas y derivación de hiPSC específicas de paciente	93
2. Diferenciación de las hiPSC a cardiomiocitos	94
3. Caracterización de hiPSC-CM de pacientes pediátricos que experimentaron cardiotoxicidad temprana frente al daño por doxorubicina	97
3.1 Los hiPSC-CM CTX tienen unos mayores niveles de citotoxicidad inducida por doxorubicina y apoptosis que los hiPSC-CM CTRL	97
3.2 Los hiPSC-CM CTX tienen unos niveles superiores de estrés oxidativo comparado con los hiPSC-CM CTRL tras el tratamiento con doxorubicina	100
3.3 Los hiPSC-CM CTX tienen unos mayores niveles de daño genotóxico y mitocondrial que los hiPSC-CM CTRL tras el tratamiento con doxorubicina.....	102
3.4 Daño sarcomérico causado por la doxorubicina en hiPSC-CM CTRL y CTX.....	104
3.5 Diferencias en la expresión génica entre hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina	107
3.6 Diferencias en la expresión de miARNs entre hiPSC-CM CTRL y CTX tratados con doxorubicina	111

4. Estudio de miARNs diferencialmente expresados entre pacientes con cáncer de mama positivas y negativas para la cardiotoxicidad inducida por antraciclinas	113
5. Estudio del papel cardioprotector del miR-4732-3p <i>in vitro</i>	114
5.1 Efecto del miR-4732-3p frente al daño por doxorubicina en cardiomiocitos neonatales de rata	114
5.2 Efecto del miR-4732-3p frente al daño por doxorubicina en fibroblastos cardíacos de rata	118
6. Estudio del papel cardioprotector del miR-4732-3p <i>in vivo</i>	119
6.1 Expresión del miR-4732-3p en diferentes órganos	119
6.2 Efecto del miR-4732-3p sobre la función cardíaca después del tratamiento con doxorubicina	120
6.3 El miR-4732-3p disminuye el estrés oxidativo y la apoptosis causadas por la doxorubicina en el corazón	121
6.4 Efecto del miR-4732-3p en la vascularización del corazón tras el tratamiento con doxorubicina	123
6.5 Efecto del miR-4732-3p en el área transversal de los cardiomiocitos tras el tratamiento con doxorubicina	123
6.6 El miR-4732-3p produce una disminución de la fibrosis intersticial causada por la doxorubicina	124
7. Identificación y validación de genes diana del miR-4732-3p	126
8. Efecto de la sobreexpresión del miR-4732-3p sobre la viabilidad de los cardiomiocitos CTRL y CTX tratados con doxorubicina	129

DISCUSIÓN	131
1. Los hiPSC-CM CTX recapitulan la susceptibilidad al daño por doxorubicina observada en los pacientes pediátricos	133
2. Papel cardioprotector del miR-4732-3p frente al daño inducido por doxorubicina	141
3. Efecto del miR-4732-3p sobre el daño inducido por doxorubicina en cardiomiocitos derivados de hiPSC ..	146
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153