UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES NUCLEARES

ININ

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

Efecto de la astaxantina sobre la captación de ^{99m}Tc-iFAP y 2-DG-IRDye800CW en miocardio de ratones con estrés crónico evaluado por imagen molecular

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN FÍSICA MÉDICA

P R E S E N T A

Christian Uriel Fuentes Alcantara

Comité de Tutores: Dr. Rigoberto Oros Pantoja

Dra. Nallely Patricia Jiménez Mancilla

Dra. Myrna Alejandra Luna Gutiérrez

Contenido

Resumen 9
Abstract 11
Abreviaturas 13
Índice de figuras 17
Índice de tablas 18
Capítulo 1: Introducción 19
Capítulo 2: Estado del arte 21
2.1. Estado del Arte 21
2.2. Pregunta de investigación 23
2.3. Hipótesis 23
2.3.1 Hipótesis nula 24
2.4. Objetivos 24
2.4.1. Objetivo General 24
2.4.2. Objetivos Específicos 24
Capítulo 3: Marco Teórico 25
3.1 Estrés y Respuesta Neuroendocrina 25
3.2 Estrés Oxidativo 26
3.3 Daño Metabólico Cardíaco 28
3.4 Daño Proinflamatorio y Fibrosis 29
3.5 Astaxantina: propiedades antioxidantes y antiinflamatorias 31
3.6 Transporte de Glucosa en Miocardio 32
3.7 Cadena Metabólica 33
3.8 Función de la 2-deoxiglucosa (2-DG) 34
3.9 Principios Físicos de la Imagen Óptica 36
3.9.1 El Fluoróforo 2DG-IRDye800CW 36
3.9.2 Propiedades Ópticas del 2DG-IRDye800CW 36
3.10 Principios Físicos de la Medicina Nuclear Diagnóstica 37
3.10.1 El Radiofármaco: Principio del Trazador 37
3.10.2 El Radionúclido: Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc) 38
3.10.3 Física de Detección: Radioluminiscencia (Sistema Híbrido) 38
3.10.4 Principios de Dosimetría Interna (Formalismo MIRD) 39
3.11 El radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP 40
3.12 Modelo de Estrés Crónico 41
3.13 Aplicabilidad del Modelo Murino 42

Capítulo 4: Metodología 45
4.1 Diseño del estudio 45
4.2 Operacionalización de variables 45
Tabla 1. Variables Independientes 45
Tabla 2. Variables Dependientes 45
Tabla 3. Variables Intervinientes 47
4.3 Entorno de trabajo y muestra 48
4.4 Instrumento de investigación 48
4.5 Desarrollo del proyecto 48
4.5.1 Condiciones de Alojamiento y Cuidado Animal 48
4.5.2 Inducción de Estrés Crónico por Restricción de Movimiento 48
4.5.3 Esquema de Suplementación con Astaxantina 49
4.6 Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación 49
4.6.1 Criterios de inclusión 49
4.6.2 Criterios de exclusión 49
4.6.3 Criterios de eliminación 49
4.7 Procedimientos Experimentales 49
4.7.1 Administración de 2-DG-IRDye800CW y ^{99m}Tc-iFAP 50
4.7.2 Biodistribución 50
4.7.3 Eutanasia 50
4.7.4 Disección 50
4.7.5 Adquisición de Imagen Molecular 51
4.7.6 Cuantificación biocinética ex vivo 51
4.7.7 Determinación del peso de las muestras 51
4.8 Procesamiento de Imágenes 52
4.8.1 Imagen Molecular Fluorescente 52
4.8.2 Imagen Molecular Radioisotópica 52
4.9 Modelo Biocinético 53
4.9.1 Porcentaje de Dosis Inyectada por Gramo de Tejido 53
4.9.2 Porcentaje de Dosis Inyectada 53
4.10 Estimación Dosimétrica Interna (Formalismo MIRD) 53
4.10.1 Caracterización de la Biocinética en el Corazón 53
4.10.2 Modelado Matemático e Integración Temporal 54
4.10.3 Cálculo de la Dosis Absorbida 54
4.11 Análisis Estadístico ANOVA 54
4.12 Límite de Tiempo, Infraestructura y Apoyo Técnico Disponible 55

4.13 Cronograma de Actividades *55*
4.14 Diseño de Análisis *55*
4.15 Implicaciones Bioéticas *55*
4.16 Diagrama de flujo metodológico experimental (Figura 7) *56*
Capítulo 5: Resultados y Discusión *57*
5.1 Resultados *57*
5.1.1. Evaluación Metabólica del Miocardio por Imagen Molecular (2DG-IRDye800CW) *57*
5.1.2 Evaluación de Inflamación/Fibrosis (^{99m}Tc-iFAP) *59*
5.1.2.1 Captación por Imagen Molecular *59*
5.1.2.2 Captación en Corazón por Biocinética (%I.D./g) *62*
5.1.2.3 Captación en Corazón por Biocinética (%ID) *65*
5.1.3 Captación en Sangre por Biocinética (%I.D./g) *67*
5.1.4 Resultados de la Estimación Dosimétrica Interna (Formalismo MIRD) *69*
5.2 Discusión *71*
5.2.1 Alteraciones Metabólicas y Protección con Astaxantina *71*
5.2.2 Activación de Fibroblastos (FAP) *72*
5.2.3 Biocinética sanguínea *74*
5.2.4 Estimación Dosimétrica e Impacto del Formalismo MIRD *75*
5.2.5 Hallazgos no anticipados *76*
5.2.6 Síntesis integradora *77*
Capítulo 6: Conclusiones y trabajo futuro *78*
6.1 Conclusiones *78*
6.2 Trabajo futuro *79*
Capítulo 7: Referencias *80*
Anexos *82*

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial y en México. Uno de los principales factores de riesgo es el estrés neuroendocrino crónico, en donde la sobreactivación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y del Sistema Nervioso Simpático provoca la secreción sostenida de glucocorticoides y catecolaminas. Esto conduce a sobrecarga alostática debido a estrés oxidativo, alteraciones del metabolismo energético y procesos proinflamatorios, los cuales a su vez pueden causar que fibrosis miocárdica.

El presente trabajo evaluó el efecto cardioprotector de la astaxantina, un carotenoide de gran capacidad antioxidante y antiinflamatoria cuyas propiedades polares le permiten proteger ambos lados de la bicapa lipídica celular, lo que podría atenuar el daño causado por estrés crónico. Se emplearon 32 ratones machos CD1, distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos (n=8): 1. Control (CT); 2. Sometidos a estrés crónico por restricción de movimiento (ST), 3 horas por día, dos veces por semana durante 6 meses; 3. Suplementados con astaxantina por vía oral (5 mg/kg/d) por seis meses (ASTX); y 4. Con estrés + astaxantina (ST+ASTX). Al término del estudio se evaluaron imágenes moleculares multimodales (óptica y radioisotópica) ex vivo del corazón. Se emplearon dos biomarcadores: 1. Sonda fluorescente 2-DG-IRDye800CW, para cuantificar la captación indirecta de glucosa como indicador del metabolismo energético del miocardio, y 2. Radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP, para evaluar la expresión de la Proteína de Activación de Fibroblastos (FAP), considerada un biomarcador temprano de fibrosis miocárdica incipiente. Adicionalmente, se estimó la dosis absorbida de radiación mediante el formalismo MIRD, a partir de los modelos radiofarmacocinéticos obtenidos de la biodistribución de ^{99m}Tc-iFAP en cada grupo experimental.

Los resultados de imagen molecular indican que el estrés crónico provoca restricción metabólica de la glucosa miocárdica. Respecto al grupo control, los ratones estresados presentaron menor captación miocárdica de 2-DG-IRDye800CW. De manera contraria, en los ratones estresados y suplementados con astaxantina, los niveles de captación de este biomarcador se preservaron, lo que sugiere un efecto cardioprotector sobre el metabolismo energético.

Respecto a los grupos CT y ST, la suplementación con astaxantina (grupos ASTX y ST+ASTX) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) los niveles captación del radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP tanto el análisis por imagen molecular como el biocinético, lo que sugiere una menor activación de fibroblastos y menor expresión de FAP. Este comportamiento se corroboró en la captación sanguínea, donde los grupos suplementados mantuvieron niveles menores que los no suplementados, con mayor relevancia a las 3 horas ($p < 0.05$), tiempo en el que la astaxantina redujo significativamente los niveles de captación. Contrario a lo esperado, la captación del grupo ST presentó niveles más bajos respecto al grupo CT, esto podría atribuirse al efecto inmunosupresor de los glucocorticoides. Es posible que estas hormonas permanecieran elevadas, además, los ratones fueron sometidos a estrés 30 minutos previos a la administración del radiofármaco. Por tanto, se

requieren estudios adicionales para evaluar la actividad de los fibroblastos tras cesar los efectos de las hormonas del estrés. Es posible que, en tiempos superiores a 24 horas, se incremente la expresión de FAP una vez que se hayan atenuado los efectos agudos de los glucocorticoides.

Finalmente, la estimación dosimétrica mediante el formalismo MIRD determinó dosis absorbidas en el rango de los µGy, lo que indica que la contribución de la radiación ionizante fue mínima y que los cambios observados pueden atribuirse principalmente al proceso biológico evaluado, más que a la exposición al radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP.

En conclusión, la astaxantina ejerce una protección dual a nivel cardiovascular al preservar el metabolismo energético mediante 2-DG-IRDye800CW y atenuación en la expresión de FAP, evidenciada por menor captación de ^{99m}Tc-iFAP. Además, este estudio demuestra el potencial de integrar imagen molecular multimodal, biocinética y dosimetría como una estrategia no invasiva para el diagnóstico temprano y el seguimiento preclínico de diversas cardiomiopatías. Si bien, estas herramientas se emplean rutinariamente en medicina nuclear oncológica, también podrían tener un uso potencial para el estudio de enfermedades cardiovasculares.

Abstract

Cardiovascular diseases are the leading cause of death globally and in Mexico. One of the main risk factors is chronic neuroendocrine stress, where the overactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system triggers the sustained secretion of glucocorticoids and catecholamines. This leads to allostatic overload due to oxidative stress, energy metabolism alterations, and pro-inflammatory processes, which in turn can lead to myocardial fibrosis.

This study evaluated the cardioprotective effect of astaxanthin, a carotenoid with high antioxidant and anti-inflammatory capacity whose polar properties enable it to protect both sides of the cell's lipid bilayer, potentially attenuating the damage caused by chronic stress. Thirty-two male CD1 mice were utilized and randomly distributed into four groups (n=8): 1. Control (CT); 2. Subjected to chronic stress via restraint (ST), 3 hours a day, twice a week for 6 months; 3. Supplemented orally with astaxanthin (5 mg/kg/d) for six months (ASTX); and 4. Stress + astaxanthin (ST+ASTX). At the end of the study, ex vivo multimodal molecular imaging (optical and radioisotopic) of the heart was evaluated. Two biomarkers were employed: 1. The fluorescent probe 2-DG-IRDye800CW, to quantify indirect glucose uptake as an indicator of myocardial energy metabolism, and 2. The radiopharmaceutical ^{99m}Tc-iFAP, to evaluate fibroblast activation protein (FAP) expression, considered an early biomarker of incipient myocardial fibrosis. Additionally, the absorbed radiation dose was estimated using the MIRD formalism, based on the radiopharmacokinetic models derived from the biodistribution of ^{99m}Tc-iFAP in each experimental group.

Molecular imaging results indicate that chronic stress induces metabolic restriction of myocardial glucose. Compared to the CT group, stressed mice exhibited lower myocardial uptake of 2-DG-IRDye800CW. Conversely, in stressed mice supplemented with astaxanthin, the uptake levels of this biomarker were preserved, suggesting a cardioprotective effect on energy metabolism.

Regarding the CT and ST groups, astaxanthin supplementation (ASTX and ST+ASTX groups) significantly decreased ($p < 0.05$) the uptake levels of the radiopharmaceutical ^{99m}Tc-iFAP in both molecular imaging and biokinetic analyses, suggesting diminished fibroblast activation and reduced FAP expression. This behavior was corroborated in blood uptake, where the supplemented groups maintained lower levels than the non-supplemented ones, showing greater relevance at 3 hours ($p < 0.05$), a time point where astaxanthin significantly reduced uptake levels. Contrary to expectations, the uptake in the ST group showed lower levels compared to the CT group; this could be attributed to the immunosuppressive effect of glucocorticoids. It is possible that these hormones remained elevated; furthermore, the mice were subjected to stress 30 minutes prior to radiopharmaceutical administration. Therefore, additional studies are required to evaluate fibroblast activity once the effects of stress hormones have subsided. It is plausible that, at time points beyond 24 hours, FAP expression increases once the acute effects of glucocorticoids have attenuated.

Finally, dosimetric estimation using the MIRD formalism determined absorbed doses in the µGy range, indicating that the contribution of ionizing radiation was minimal and that the observed changes can be primarily attributed to the evaluated biological process rather than to the exposure to the ^{99m}Tc-iFAP radiopharmaceutical.

In conclusion, astaxanthin exerts dual cardiovascular protection by preserving energy metabolism via 2-DG-IRDye800CW and attenuating FAP expression, evidenced by the lower uptake of ^{99m}Tc-iFAP. Furthermore, this study demonstrates the potential of integrating multimodal molecular imaging, biokinetics, and dosimetry as a non-invasive strategy for the early diagnosis and preclinical monitoring of various cardiomyopathies. Although these tools are routinely employed in oncological nuclear medicine, they could also have a potential application in the study of cardiovascular diseases.

Abreviaturas

%I.D./g	Porcentaje de la Dosis inyectada por gramo de Tejido
%ID	Porcentaje de dosis inyectada
$\tilde{A}$	Actividad acumulada
ANOVA	Análisis de Varianza
AP-1	Proteína Activadora 1
·OH	Radical Hidroxilo
-OH	Grupo hidroxilo
2-DG	2-desoxi-D-glucosa
2-DG-6-P	2-desoxi-d-glucosa-6-fosfato
^{99m}Tc-iFAP	Radiofármaco (Tecnecio-99 metaestable unido a una molécula iFAP)
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Glándulas Suprarrenales/ Glándulas Adrenales
ASTX	Astaxantina
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bq	Becquerel
Ca^{2+}	Ion de Calcio
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio
CMS	Modelo de estrés crónico leve
CO_2	Dióxido de Carbono
CORT	Corticosterona
CPM	Cuentas por Minuto
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
CRS	Estrés Crónico por Restricción
CT	Control
EAC	Enfermedad Arterial Coronaria
ECV	Enfermedades Cardiovasculares
EDDA	Ácido Etilendiaminodiacético
eNOS	Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
^{18}F	Flúor-18
$FADH_2$	Dinucleótido de Flavina y Adenina
FAP	Proteína de Activación de Fibroblastos

FAPI/iFAP	Inhibidor de FAP
FGF21	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21
G-6-P	Glucosa-6-Fosfato
GLUT/GLUTs	Transportadores Facilitadores de Glucosa
GPI	Fosfo-Glucosa Isomerasa
Gy	Gray
GTP	Trifosfato de Guanosina
$H_2 O_2$	Peróxido de Hidrógeno
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad
HK	Hexoquinasa
HMIT1	Transportador de Mioinositol o GLUT13.
HPA	Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal/ Hipotálamo-Pituitario-Adrenal
HYNIC	Ácido-6-hidrazinopiridin-3-carboxílico/ Hidrazinonicotinamida
IL-(1α, 1β)	Interleucina-1 (alfa, beta)
IL-	Interleucinas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ININ	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
IRDye800CW	Colorante o sonda fluorescente de infrarrojo cercano (NIR)
Lanider	Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad
LGE-CMR	Realce Tardío de Gadolinio - Resonancia Magnética Cardiovascular
Bq	Megabequerel
MIRD	Dosis de Radiación Interna Médica
mGy/MBq	Miligray por Megabecquerel
MOBY	Modelo 3D en software que representa la anatomía de ratones de laboratorio
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NIR	Fluoróforos de Infrarrojo Cercano
NF-κB	Factor Nuclear kappa B
NLRP3	Dominio de Pirina de la familia del receptor tipo NOD 3, también llamado inflamasoma NLRP3
NOX	NADPH oxidasas
O_2^-	Anión Superóxido

O2	Oxígeno molecular
OLINDA/EXM	Software de dosimetría estándar para cálculos de dosis uniformes para radiofármacos de diagnóstico y terapéuticos.
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud (OPS / Oficina regional de la OMS)
p	Valor de probabilidad (del inglés, p-value) de ANOVA/Tukey
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
Prob > F	Valor de probabilidad (del inglés, p-value), un valor menor a 0.05 indica significancia estadística
R^2	Coeficiente de determinación (del inglés, R-squared).
RNA	Ácido Ribonucleico
ROI	Regiones de Interés
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
S	Factor ponderado según el modelo MIRD
SGLT/SGLTs	Cotransportador de Sodio-Glucosa
SiRNA	ARN pequeño de interferencia
SIRT1	Sirtuina1
SLC2A	Familia de Portadores de Solutos 2
SNS	Sistema Nervioso Simpático/ Sistema Nervioso Autónomo
SOD	Superóxido Dismutasa
SPECT	Tomografía Computarizada por Emisión de Fotón Único
ST	Estrés crónico
ST+ASTX	Estrés crónico y suplementación con Astaxantina
T3 y T4	Hormonas Tiroideas
TAC	Constricción Aórtica Transversa
TBARS	Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico
^{99m}Tc	Tecnecio 99 metaestable
TCA	Ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico)
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TRAIL	El ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral
UAEMéx	Universidad Autónoma del Estado de México

Valor F	Estadística de prueba del análisis de varianza (del inglés, F-value), que representa la razón entre la varianza entre los grupos y la varianza dentro de los grupos.
α	Nivel de significancia. Valor crítico de probabilidad preestablecido para rechazar la hipótesis nula; en este trabajo se fijó en 0.05 para todas las pruebas.
µGy/MBq	Microgray por Megabecquerel
τ_e	Periodo de semidesintegración efectivo
λ_e	Constante de decaimiento efectiva

Índice de figuras

Figura	Título	Pág.
Figura 1.	Cascada hormonal de la respuesta neuroendocrina ante el estrés crónico.	26
Figura 2.	Mecanismo fisiopatológico del estrés oxidativo y su progresión a enfermedad cardiovascular.	30
Figura 3.	Estructura química y mecanismo de protección de la astaxantina.	31
Figura 4.	Estructura química de la 2-deoxy-D-Glucosa (2-DG).	35
Figura 5.	Atrapamiento metabólico de la 2-DG en el citosol celular.	35
Figura 6.	Estructura química del inhibidor de FAP (iFAP).	40
Figura 7.	Diagrama de flujo del protocolo metodológico experimental.	56
Figura 8.	Imagen molecular ex vivo de la captación miocárdica de 2-DG-IRDye800CW.	57
Figura 9.	Cuantificación del flujo de fotones de la captación de 2-Deoxi-Glucosa en miocardio.	58
Figura 10.	Evolución temporal de la captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular.	60
Figura 11	Cuantificación del flujo de fotones del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio.	62
Figura 12	Captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP por biocinética (%I.D./g).	64
Figura 13	Captación total en miocardio de ^{99m}Tc-iFAP por biocinética (%ID)	67
Figura 14	Captación sanguínea de ^{99m}Tc-iFAP por biocinética (%I.D./g).	69
Figura 15	Modelo biocinético de captación y eliminación de ^{99m}Tc-iFAP.	70

Índice de tablas

Tabla	Título	Pág.
Tabla 1.	Variables Independientes	45
Tabla 2	Variables Dependientes.	45
Tabla 3	Variables Intervinientes.	47
Tabla 4	Grupos, ratones y tiempos de biodistribución según el agente administrado.	50
Tabla 5	ANOVA y Tukey de la captación en miocardio de 2-DG-IRDye800CW (3 h).	59
Tabla 6	ANOVA y Tukey de la captación de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular (30 min).	60
Tabla 7	ANOVA y Tukey de la captación de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular (3 h).	61
Tabla 8	ANOVA y Tukey de la captación de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular (24 h).	61
Tabla 9	ANOVA y Tukey de biocinética (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (30 min).	63
Tabla 10	ANOVA y Tukey de la biocinética (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (3 h).	63
Tabla 11	ANOVA y Tukey de la biocinética (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (24 h).	64
Tabla 12	ANOVA y Tukey de la biocinética total (%ID) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (30 min).	65
Tabla 13	ANOVA y Tukey de la biocinética total (%ID) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (3 h).	65
Tabla 14	ANOVA y Tukey de la biocinética total (%ID) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (24 h).	66
Tabla 15	ANOVA y Tukey de la biocinética en sangre (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP (30 min).	67
Tabla 16	ANOVA y Tukey de la biocinética en sangre (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP (3 h).	68
Tabla 17	ANOVA y Tukey de la biocinética en sangre (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP (24 h).	68
Tabla 18	Dosis absorbida y ajuste biexponencial biocinético-farmacocinético en corazón.	70

Capítulo 1: Introducción

En México, las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte, por encima de la diabetes y el cáncer, y se prevé que su prevalencia continúe en aumento (INEGI, 2026). Entre sus factores de riesgo, el estrés se ha identificado como uno de los más relevantes (IMSS, 2024), junto con dietas inadecuadas, inactividad física y tabaquismo (OPS, 2023). El estrés psicológico es un fenómeno generalizado en la población mexicana, originado por la sobrecarga laboral, baja remuneración económica, violencia social, acoso laboral, tráfico vehicular y los conflictos familiares o de pareja. Según el IMSS (2026) y la OMS (2019), cerca del 75 % de los mexicanos padece estrés laboral, la cifra más alta reportada a nivel mundial, superior a la de países como China y Estados Unidos. La exposición sostenida a estos agentes estresantes por periodos prolongados y con alta intensidad provoca el estrés crónico [1–3].

Estos antecedentes resaltan la necesidad de desarrollar estrategias dirigidas a prevenir o atenuar los efectos cardiovasculares asociados al estrés crónico [4]. El estrés crónico se origina por sobreactivación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA) y del Sistema Nervioso Simpático (SNS) [2, 3, 5–7], lo que produce una hipersecreción de glucocorticoides y catecolaminas. Estas hormonas regulan la respuesta de lucha o huida, pero su liberación sostenida afecta de forma adversa al sistema cardiovascular y genera una sobrecarga alostática [1–3, 5, 8–10].

El presente estudio se enfocó en dos efectos del estrés sobre el miocardio: metabólicos e inflamatorios [1, 8, 9, 11–14]. Aunque la fuente energética primaria del miocardio depende de ácidos grasos (60-90%), el daño metabólico se origina el uso exclusivo de estos, en donde aumenta la síntesis de ácidos grasos y la peroxidación lipídica, que favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de un mayor flujo de electrones en la cadena de transporte mitocondrial y de la β-oxidación. Este proceso bloquea la entrada de glucosa, culmina en lipotoxicidad y aporta nuevas ROS derivadas del daño celular [6, 7, 10, 14]. El incremento del estrés oxidativo activa mecanismos proinflamatorios y promueve vías de reparación poco eficientes, como la fibrosis, que conducen a la pérdida de función y al aumento del riesgo cardiovascular [4–9, 11–17]. De manera simultánea, la liberación persistente de catecolaminas y glucocorticoides contribuye de forma independiente a la producción de ROS, lo que retroalimenta el círculo vicioso en que las ROS producen procesos proinflamatorios e inversamente. Así se consolida el estrés oxidativo, considerado causa primaria o secundaria de numerosas ECV y estrechamente relacionado con la resistencia a la insulina en el corazón [1, 4, 5, 8–12, 14, 15, 17–20]. Dado que el corazón adulto posee una capacidad regenerativa limitada, la inflamación sostenida promueve la activación de la Proteína de Activación de Fibroblastos (FAP), que induce una deposición excesiva de colágeno (tipos I y III) en la matriz extracelular. Este proceso culmina en fibrosis, genera rigidez del tejido cardíaco, compromete su función y provoca un remodelado cardíaco adverso [12, 14, 15, 18, 19, 21, 22]. A su vez, la inflamación

endotelial incrementa la generación de ROS mediante citocinas, macrófagos y proteínas y genes proinflamatorios, lo que intensifica aún más el estrés oxidativo [4, 6, 7, 15, 20, 23].

La astaxantina, un carotenoide natural reconocido por su potente actividad antioxidante y antiinflamatoria, como candidato para reducir el daño generado por el estrés [4, 10, 14–17, 19, 20]. El propósito de esta investigación fue evaluar el efecto de la astaxantina mediante imagen molecular, empleando dos indicadores: la FAP, cuantificada con el radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP como marcador de inflamación y fibrosis, y la captación de glucosa, evaluada con la sonda fluorescente 2-DG-IRDye800CW como indicador del daño metabólico [14, 22, 24–26].

A pesar de la gran cantidad de información de la relación entre el estrés y el daño cardíaco, esta aun limitada para entender integralmente los procesos fisiopatológicos implicados, por tanto, el presente objetivo tiene por objeto, analizar las aéreas de oportunidad que carecen de estudios suficientes:

1. Falta de caracterización mediante imagen molecular. No existen estudios que evalúen el daño miocárdico inducido por estrés, en particular, la alteración en la captación de glucosa y la activación de FAP con herramientas de imagen molecular de medicina nuclear.
2. Efecto de la astaxantina como atenuante del daño por estrés crónico. Son escasos los estudios que evalúan su efecto sobre la disfunción cardíaca y la fibrosis, y no se ha documentado su acción sobre la fibrosis cardíaca derivada del estrés crónico.
3. Limitaciones de las herramientas diagnósticas actuales. Técnicas como la tomografía computarizada suelen detectar el daño cardíaco cuando ya es avanzado e irreversible, lo que hace necesario validar nuevos trazadores, como el ^{99m}Tc-iFAP, capaces de detectar la activación fibrótica en etapas incipientes.
4. Ausencia de estudios integrados. No se dispone de trabajos que combinen modelos biocinéticos asociados a la astaxantina y al estrés crónico con la estimación de la dosis absorbida en el corazón, ni que respalden mediante análisis de varianza (ANOVA/Tukey) los resultados de imagen molecular atribuibles al efecto de la astaxantina.
5. Los estudios que emplean herramientas de medicina nuclear dirigidos al estudio de enfermedades cardiovasculares son limitados y de gran importancia.

Para responder a lo anterior, se empleó un modelo murino sometido a estrés crónico, para determinar mediante imagen molecular si la suplementación con astaxantina previene o revierte alteraciones en el metabolismo de la glucosa y en la activación de fibroblastos en el miocardio. Para descartar los posibles daños generados por el uso de un radiotrazador, se realizó el cálculo de dosis absorbida mediante el formalismo MIRD, garantizando que los daños provengan por estrés y para confirmar la seguridad radiológica de la implementación de estas herramientas.

Capítulo 2: Estado del arte

2.1. Estado del Arte

La información científica ha establecido una estrecha relación entre el estrés psicológico crónico y el daño cardiovascular, mediado en gran medida por el estrés oxidativo a través de las alteraciones metabólicas y la inflamación del miocardio [1–3, 5, 8, 11, 14, 15, 18]. En la búsqueda de estrategias cardioprotectoras, la astaxantina (ASTX) ha surgido como un compuesto de interés por sus potentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [4, 16, 19, 20]. Diversos estudios en animales indican que su administración reduce de forma significativa el área de infarto y el daño al miocardio, como se detalla a continuación:

a) Monroy-Ruiz y cols. (2011), evaluaron la ASTX en dieta como agente antihipertensivo, dado el papel del estrés oxidativo en el daño vascular de la hipertensión. Ratas con hipertensión espontanea (SHR) de doce semanas, con hipertensión establecida, fueron suplementadas con astaxantina en la dieta (75 o 200 mg/kg/día) durante ocho semanas. La presión arterial sistólica disminuyó de forma dependiente de la dosis desde la primera semana y la hipertrofia ventricular izquierda se redujo significativamente en ambos grupos tratados. La ASTX también disminuyó el grosor y el área seccional de la capa media en aorta y arterias intrarrenales, además se redujo significativamente la producción de anión superóxido (•O2-) estimulada por NADPH, sin modificar la basal [17].

b) Nakao y cols. (2010), evaluaron el uso de ASTX en la dieta para reducir el estrés oxidativo y mejorar la función cardíaca, y la describieron como un cardioprotector potencial con propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y anticancerígenas [4, 19]. En su estudio, ratones hembra BALB/c recibieron dietas con 0, 0.02 o 0.08 % de ASTX durante ocho semanas. La concentración plasmática de ASTX aumentó de forma dependiente de la dosis, sin afectar significativamente las concentraciones de glutatión en sangre ni el potencial de membrana mitocondrial de los linfocitos. Los ratones que recibieron 0.08 % de ASTX mostraron un potencial de membrana mitocondrial cardíaco y un índice de contractilidad significativamente mayores que el grupo control [19]. Además, la ASTX inhibió la producción de TNF-α, cuya expresión se asocia a la cardiotoxicidad y a la fisiopatología de las ECV [19, 24].

c) Heidari y cols. (2023), aplicaron ASTX para tratar la aterosclerosis, principal causa de la enfermedad arterial coronaria (EAC), originada en gran medida por el estrés oxidativo y la inflamación [1, 11, 20]. En un ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, 50 pacientes con EAC se dividieron en dos grupos: uno recibió 12 mg/día de ASTX y el otro placebo, durante ocho semanas. Al inicio y al final del estudio se determinaron el perfil lipídico, los parámetros de glucosa, los índices antropométricos, la composición corporal y los niveles de Sirtuina1 (SIRT1) y (TNF-α) [15]. No se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos en composición corporal, índices glucémicos ni niveles séricos de TNF-α o SIRT1 [20]. Sin embargo,

dentro del grupo tratado con ASTX se observó una reducción significativa del colesterol total y del colesterol LDL respecto a sus valores basales, mientras que los triglicéridos y el colesterol HDL no se modificaron de forma relevante [20].

d) Zhang y cols. (2017), demostraron que la ASTX mejora la función cardíaca y atenúa la fibrosis, en parte mediante la activación de SIRT1, una proteína deacetilasa implicada en procesos como la fibrosis y en la respuesta al estrés oxidativo [4]. La ASTX redujo el aumento inducido por la cirugía de constricción aórtica transversa (TAC) en la fosforilación y acetilación de las R-SMAD (SMAD2 y SMAD3) y restringió su actividad [4]. El estudio indujo fibrosis y disfunción cardíaca por TAC en ratones macho C57BL/6, que recibieron ASTX (200 mg/kg/día por vía oral) o un inhibidor específico de SIRT1 (EX-527) durante 12 semanas tras la cirugía. Un seguimiento in vitro con fibroblastos cardíacos humanos estimulados con TGF-β confirmó estos hallazgos al inhibir SIRT1 con EX-527 o con RNA de interferencia (siRNA) [4, 15].

e) El libro Astaxanthin Abstract Book (Cyanotech, 2013) describe numerosos efectos benéficos de la ASTX a nivel sistémico, antiinflamatorio y cardioprotector, así como en enfermedades crónico-degenerativas [4, 16, 19]. Desde entonces, la información básica y clínica ha aumentado de forma considerable; no obstante, los mecanismos por los cuales actúa siguen sin esclarecerse por completo, en particular su acción sobre el daño metabólico y proinflamatorio inducido por estrés crónico [1, 16, 19].

De forma paralela, la imagen molecular ha buscado agentes capaces de detectar el daño cardíaco. La Proteína de Activación de Fibroblastos (FAP) se ha identificado como un marcador clave de la fibrosis activa: bajo condiciones de estrés, células inmunes, vasculares y cardiomiocitos pueden adquirir un fenotipo fibrogénico y activar a los fibroblastos [21]. El uso de inhibidores de FAP (FAPI) radiomarcados permite identificar los fibroblastos activados y monitorizar su actividad a lo largo del tiempo y en respuesta al tratamiento; su ventaja radica en que se dirigen a la actividad endopeptidasa específica de la FAP, lo que les confiere una alta especificidad [22, 25].

En esta línea, Trujillo-Benítez y cols. (2022), reportaron el diseño y la evaluación preclínica del ^{99m}Tc-iFAP, un radiofármaco que permite visualizar in vivo la activación de fibroblastos y, con ello, detectar procesos fibróticos incipientes antes de que el daño estructural sea irreversible [25]. Por su parte, Diekmann y cols. (2022), demostraron una buena concordancia entre la captación de FAPI y el miocardio infartado: en una cohorte de 35 pacientes evaluados hasta 11 días después del infarto, el volumen de captación de FAPI se correlacionó positivamente con el realce tardío de gadolinio en la resonancia magnética cardíaca y superó el área de perfusión [22].

En el ámbito metabólico, el uso de análogos de la glucosa, como la 2-desoxi-D-glucosa (2-DG), constituye una técnica robusta y validada para evaluar el daño metabólico mediante imagen no invasiva [24, 26]. La 2-DG es transportada al interior de la célula y fosforilada a 2-DG-6-P, forma en la que queda atrapada [24]. Ferté y cols. (2021), reconfirmaron su utilidad para medir el transporte de glucosa mediado por GLUT [13, 26]: cuando se acopla a sondas fluorescentes de infrarrojo cercano, como en el 2-DG-IRDye800CW, permite cuantificar este proceso por imagen óptica no invasiva [26].

Por último, los modelos animales de estrés crónico además de estar validados también están justificados. El modelo de estrés crónico por restricción (CRS, chronic restriction stress) se reconoce como un método simple y eficiente para activar el eje HPA de manera primordial y el sistema nervioso simpático en menor medida, esto provoca una respuesta neuroendocrina sostenida que replica los efectos del estrés psicológico crónico [6, 7, 27–29]. El primer protocolo de estrés psicológico, propuesto por Katz y desarrollado por Willner y cols. (1981), consistía en un modelo de estrés crónico leve que combinaba factores como ruido, inclinación de la jaula, cama húmeda, alteración de los ciclos de luz-oscuridad, natación forzada y derrota social; sin embargo, resultaba poco replicable e ineficiente en tiempo y energía [27]. Por ello se propuso el modelo CRS, más simple y aplicable tanto en machos como en hembras [27–29]; la restricción es bien tolerada por ratas y ratones y puede emplearse en estudios de estrés crónico intermitente durante semanas o meses [28].

2.2. Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la suplementación con astaxantina sobre la captación miocárdica de: ^{99m}Tc-iFAP, radiofármaco capaz de medir indirectamente el FAP precursor de daños por inflamación/fibrosis; y 2-DG-IRDye800CW como indicador de daño metabólico; en ratones CD1 sometidos a estrés crónico evaluado por imagen molecular?

2.3. Hipótesis

Si el estrés crónico provoca respuestas neuroendocrinas relacionadas con estrés oxidativo, inflamación y subsecuentemente alteraciones en el metabolismo de la glucosa y procesos promotores de fibrosis en el miocardio, entonces la suplementación con astaxantina que tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios podría tener efectos cardioprotectores al limitar o reducir estos efectos del estrés sobre el miocardio. Por tanto, captación del radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP (biomarcador de fibrosis) y la sonda 2-DG-IRDye800CW (biomarcador indirecto del metabolismo de la glucosa) podrían ser evaluados mediante imagen molecular.

2.3.1 Hipótesis nula

La suplementación con astaxantina, no tendrá efectos significativos sobre la captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP ni de 2-DG-IRDye800CW en ratones CD1 sometidos a estrés crónico por restricción y respecto a los los grupos no suplementados.

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo General

- Determinar mediante imagen molecular el efecto de la suplementación con astaxantina sobre la captación de ^{99m}Tc-iFAP y de 2-DG-IRDye800CW en el miocardio de ratones CD-1 sometidos a estrés crónico.

2.4.2. Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la ASTX sobre la captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP y 2-DG-IRDye800CW en ratones CD1 con estrés crónico respecto al grupo control.
- Comparar los niveles de captación de ^{99m}Tc-iFAP y 2-DG-IRDye800CW en miocardio entre los grupos experimentales para inferir los efectos protectores de la ASTX.

Capítulo 3: Marco Teórico

3.1 Estrés y Respuesta Neuroendocrina

El estrés psicológico es uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares (ECV), entre las que se incluyen la hipertensión, el infarto y las arritmias [1]. El estrés prolongado altera la homeostasis del organismo mediante una serie de respuestas fisiológicas, tanto neurológicas como endocrinas, que producen y secretan hormonas [1–3]. Dicha respuesta se origina por una cadena de estímulos: el factor estresante activa el núcleo paraventricular del hipotálamo, que expresa la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La CRH actúa sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA), en particular sobre la hipófisis, donde estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), cuyo blanco es la corteza de las glándulas suprarrenales (AG) [1–3, 5–7]. De manera simultánea, el hipotálamo que es el órgano central de la regulación de la homeostasis, la cual activa el sistema nervioso simpático (SNS), que actúa sobre la médula suprarrenal. Una vez estimulada, la médula libera catecolaminas al sistema circulatorio, principalmente adrenalina y noradrenalina, hormonas implicadas en la respuesta de lucha o huida [1–3, 5, 8, 28]. Por su parte, la estimulación de la corteza suprarrenal produce hormonas esteroideas, entre ellas los glucocorticoides, cuyo principal representante es el cortisol, asociado a la respuesta al estrés [1–3, 5, 8]. Este proceso se representa en la Figura 1.

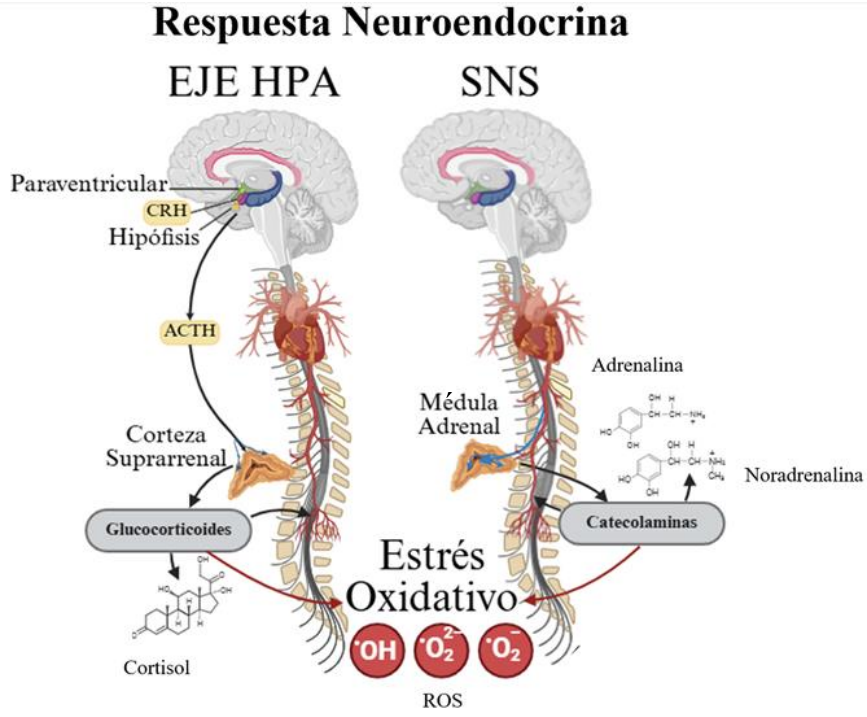


Figura 1. **Cascada hormonal de la respuesta neuroendocrina ante el estrés crónico**. Representación esquemática de las vías de activación fisiológica inducidas por estímulos estresantes. A la izquierda, 1) Vía de acción lenta a través del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA), donde la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) culmina en la secreción de glucocorticoides (cortisol/corticosterona) en la corteza suprarrenal. A la derecha, 2) Vía de acción rápida (mediada por el Sistema Nervioso Simpático (SNS), que estimula la médula adrenal para la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Ambas vías convergen en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la alteración de la homeostasis energética cardiovascular.

La liberación prolongada de catecolaminas y glucocorticoides a la sangre afecta al corazón [1, 2, 5, 6]. En mamíferos, la administración crónica de glucocorticoides suele suprimir los sistemas antioxidantes enzimáticos y aumentar la peroxidación lipídica en órganos como el hígado y el corazón, a diferencia de otros modelos animales, como las aves, que presentan mecanismos de defensa distintos [6, 21]. El corazón de los mamíferos experimenta así una carga alostática que, de mantenerse de forma crónica, puede manifestarse en desequilibrios químicos o atrofia de estructuras cardiovasculares y cerebrovasculares. Esta carga genera efectos adversos acumulativos, como aterosclerosis, hipertensión, enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca [1–3, 5, 19–22]. Cuando estas respuestas fisiológicas se vuelven crónicas, pierden su carácter adaptativo y desgastan al organismo: la hipertensión sostenida daña los vasos sanguíneos y altera los barorreceptores y los centros de control del tronco encefálico, lo que aumenta la fluctuación de la presión arterial y el riesgo de ECV [1–3, 5, 10]. Además, los factores de estrés fisiológicos y patológicos modulan la señalización de la insulina en las respuestas cardíacas [10].

3.2 Estrés Oxidativo

La cascada hormonal de catecolaminas y glucocorticoides contribuye de forma directa a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el corazón: 1. mediante la activación neuroendocrina y de las NADPH oxidasas (NOX), enzimas de membrana cuya función es generar ROS; 2. las mitocondrias también actúan como fuente de ROS y son responsables del deterioro de la capacidad respiratoria mitocondrial, de la menor producción de ATP y del daño celular [1, 2, 9–12, 14, 15, 18, 21]. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción y acumulación de ROS y la capacidad del sistema biológico para neutralizar estos productos reactivos [14, 15].

El estrés oxidativo se considera causa primaria o secundaria de numerosas ECV [15]. El corazón es más sensible al estrés que otros órganos: ante un estímulo estresor inmediato, el tejido cardíaco incrementa con rapidez la actividad del superóxido dismutasa (SOD) para contrarrestar la formación de radicales libres, una respuesta crítica dada su alta demanda metabólica [7, 11, 12, 14–16]. Entre las ROS derivadas del oxígeno molecular (O_2) se encuentran el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno ($H_2 O_2$) y el radical

hidroxilo (·OH), todas ellas moléculas muy reactivas. Las mitocondrias constituyen la principal fuente de ROS, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, y su producción aumenta cuando son disfuncionales o cuando el óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) se desacopla y genera O_2^- en lugar de óxido nítrico. [8, 9, 15, 18, 19, 21]. Las células del corazón productoras de ROS son los cardiomiocitos, fibroblastos, células del músculo liso, células endoteliales e incluso macrófagos del fenotipo M1; por la cadena de transporte de electrones, las NOX, la disfunción mitocondrial o la autofagia [9, 11, 15, 18, 21]. Este desequilibrio redox tiene consecuencias directas, pues la homeostasis interna depende de un balance entre agentes prooxidantes y antioxidantes; cuando estos los prooxidantes son mayores, tienden generar daño a nivel celular [6, 7, 9, 18, 23]. Las ROS dañan macromoléculas esenciales [15]: 1. Los lípidos de las membranas sufren peroxidación, lo que compromete su integridad y función, lo que resulta crítico para las células endoteliales y para la modificación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) en la aterosclerosis [9, 20]; 2. Las proteínas, enzimas y componentes estructurales del corazón se oxidan y pierden función; 3. El ADN mitocondrial se deteriora. En conjunto, la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y el daño al ADN producen un deterioro contráctil y favorecen la autofagia y la apoptosis en el miocardio [9, 11, 12, 14, 15, 19, 24]. Las ROS también alteran el manejo del calcio, provocan arritmias y contribuyen al remodelado cardíaco mediante la hipertrofia y la muerte celular, con lo que se establece un círculo vicioso entre estrés oxidativo e inflamación [1, 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18–23]. Por tanto, las ROS actúan como desencadenante inicial de la respuesta inflamatoria: al activar el factor NF-κB y el inflamasoma NLRP3, promueven la secreción de citocinas proinflamatorias IL-1β, IL-4, IL-6 e IL-18; en particular, la IL-1α induce la degradación del colágeno (tipos I y III) y la remodelación del tejido cardíaco. Estos procesos inflamatorios, a su vez, generan más ROS, sobre todo por la acción de las células inmunes infiltrantes [12, 18–23].

Es importante distinguir entre el efecto a corto plazo y la exposición crónica. Mientras la exposición crónica desequilibra el balance redox, el efecto a corto plazo activa una respuesta protectora eficiente [6, 7, 29]. En aves, Lin y cols. (2004), demostraron que la administración crónica de corticosterona (CORT) induce alteraciones asociadas al estrés oxidativo en pollos de engorda (Gallus gallus domesticus); no obstante, en los primeros tiempos de exposición, la elevación temporal de CORT no provocó lesiones oxidativas inmediatas e incluso se asoció con una disminución de la peroxidación lipídica plasmática (evaluada mediante TBARS), lo que sugiere la supresión temporal de mecanismos inflamatorios y de reparación [6, 7]. En mamíferos, en cambio, la administración crónica de glucocorticoides induce peroxidación lipídica, disminuye la capacidad antioxidante no enzimática y suprime los sistemas antioxidantes enzimáticos en hígado, eritrocitos, corazón, bazo, músculo esquelético y órganos linfoides [6]. Esto evidencia que, en etapas tempranas, las catecolaminas y los glucocorticoides provocan inmunosupresión mediante la alteración de citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6) y profibróticas (TGF-β), la

modulación de genes proinflamatorios (NF-κB y AP-1), la disminución del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) y la reducción de los macrófagos asociados [12, 18–23, 30].

3.3 Daño Metabólico Cardíaco

El corazón es un órgano con demandas energéticas excepcionalmente altas y continuas, necesarias para sostener su función contráctil, el transporte iónico a través de las membranas y la homeostasis intracelular del calcio (Ca^{2+}) [8, 31]. Para satisfacerlas, produce y consume a diario alrededor de 6 kg de ATP, una cantidad que supera con creces su propio peso, a partir principalmente de ácidos grasos y carbohidratos (glucosa y lactato) [5, 31].

El estrés crónico actúa de forma análoga a una sobrecarga de lípidos y puede propiciar una cardiomiopatía electrolito-esteroidea, caracterizada por necrosis derivada de desequilibrios de potasio y sodio en el miocardio; esto es relevante porque el estrés psicológico se asocia al aumento de ácidos grasos libres en suero y, por tanto, a la peroxidación lipídica [1, 3, 5–7, 10, 12]. No todos los eventos cardíacos agudos se deben a trombos oclusivos: en algunos casos se originan en insuficiencia cardíaca no oclusiva o en infartos metabólicos [21, 22, 31]. Los lípidos, las catecolaminas y los glucocorticoides pueden ejercer una doble acción: por un lado, predisponen al miocardio a la necrosis al interferir con el metabolismo de la célula muscular cardíaca; por otro, provocan una entrada masiva y descontrolada de Ca^{2+}, cuyo exceso es altamente tóxico, activa las NOX y daña las mitocondrias hasta ocasionar necrosis [11, 18, 19, 21, 31]. En el corazón, las catecolaminas y los glucocorticoides estimulan la oxidación de las grasas almacenadas cuando escasean las externas, efecto que se inhibe cuando estas son abundantes [1, 3, 5, 31]. Así, bajo estrés psicológico, el corazón desarrolla una desregulación metabólica asociada a la acumulación de lípidos neutros y al aumento de ROS, en concordancia con el estrés oxidativo [31].

En condiciones normales, el corazón obtiene la mayor parte de su energía de la oxidación de ácidos grasos (60–90 % de la producción de ATP), mientras que la glucosa y el lactato aportan entre el 10 y el 40 % [1–3, 5, 8, 10, 12, 14, 18, 31, 32]. Sin embargo, en situaciones de hipoxia, ejercicio, estrés, resistencia a la insulina o peroxidación lipídica, aumentan los requerimientos de glucosa. Una reducción en su metabolismo ya sea por resistencia a la insulina o por peroxidación lipídica durante el estrés crónico, este agrava el déficit energético del corazón y disminuye su eficiencia [1, 5, 8, 10, 12, 14]. Cabe señalar que durante la resistencia a la insulina, se altera la translocación de GLUT4 y reduce la captación de glucosa, lo que interrumpe su metabolismo normal e incrementa el estrés oxidativo y del retículo endoplásmico, con la consiguiente generación de especies reactivas que dañan el ADN, el ARN y las proteínas [10, 26, 31, 33].

Una característica del corazón sano es su notable flexibilidad metabólica, es decir, su capacidad de ajustar el uso de sustratos según las condiciones fisiológicas [14]. Esta flexibilidad es clave para mantener la producción de ATP y la función cardíaca ante cambios a corto plazo [31], pero puede perderse o volverse

perjudicial bajo estrés crónico o enfermedad, de modo que la deficiencia energética llega a ser causa y consecuencia de la insuficiencia cardíaca [14, 21, 22, 31]. En estos escenarios, el corazón se vuelve metabólicamente inflexible y adopta un perfil de sustrato menos eficiente o incluso tóxico [4]. La lipotoxicidad cardíaca, es causante de disfunción celular y apoptosis por acumulación excesiva de lípidos en los cardiomiocitos; que a su vez, produce ROS por disfunción mitocondrial y se suman a las generadas por la respuesta neuroendocrina [9, 10, 14, 19]. Ocurre cuando la captación de ácidos grasos supera la capacidad de oxidarlos o de almacenarlos de forma segura como triglicéridos; el exceso se desvía entonces hacia vías no oxidativas y genera intermediarios tóxicos, como ceramidas y diacilgliceroles [5, 10, 12]. Por lo cual, la disminución de la captación de glucosa en el miocardio puede emplearse como indicador de daño cardíaco [13, 24].

3.4 Daño Proinflamatorio y Fibrosis

El estrés oxidativo también desencadena procesos inflamatorios en el corazón [9, 11, 12, 14, 18]. El problema principal es que el miocardio adulto de los mamíferos posee una capacidad regenerativa insignificante y repara mediante la formación de cicatriz; por ello, la inflamación puede activar células productoras de tejido cicatricial, rasgo característico de la fibrosis [15, 21]. Este proceso conduce a un remodelado del miocardio y a la pérdida de sus funciones primarias [12, 21, 22]. Las principales causas inflamatorias en el corazón se relacionan con dos fenómenos: 1. la retroalimentación entre estrés oxidativo e inflamación, que crea un ciclo dañino promotor de ECV; 2. la acción de las hormonas adrenocorticales, divididas en mineralocorticoides (inhiben la inflamación) y glucocorticoides, que en ciertas condiciones la intensifican [5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 21].

La proteína responsable de la acumulación de colágeno que endurece el tejido cardíaco y reduce su función (fibrosis) es la Proteína de Activación de Fibroblastos (FAP) [14, 15, 18, 21, 22]. La FAP es una enzima que se expresa sobre todo en los fibroblastos activados, células que participan en la reparación del tejido inflamado y en el mantenimiento de la integridad estructural de la cámara cardíaca [22]. Cuando la FAP se activa en amplias regiones del miocardio, previene complicaciones mecánicas catastróficas, como la ruptura cardíaca, pero puede favorecer un infarto transmural. Dado que los fibroblastos cardíacos detectan el estrés mecánico mediante receptores mecanosensibles, canales iónicos e integrinas; la FAP puede emplearse como indicador de daño cardíaco [21]. Por su parte, la estimulación con el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) genera ROS mitocondriales e induce NADPH oxidasas que elevan los niveles de ROS [4, 21].

Existe evidencia que vincula el estrés psicológico crónico y el aislamiento social con un aumento de los marcadores de estrés oxidativo, tanto sistémicos como cardiovasculares, que desemboca en daño por alteraciones metabólicas e inflamatorias [5, 9, 11, 12, 18]. Kovar y cols. (2009) reportaron que, durante la diferenciación de los fibroblastos, la expresión del transportador GLUT1 en la superficie celular puede

disminuir hasta un 75 %, lo que sugiere una reducción importante de la captación de glucosa asociada a cambios en el estado celular [26]. Por su parte, Ebrahimi y cols. (2021) evaluaron el antagonismo de la IL-1 mediante anakinra en pacientes con obesidad y síndrome metabólico [30]. El tratamiento redujo de forma transitoria los niveles de FGF21 (marcador relacionado con inflamación, resistencia a la insulina y alteraciones metabólicas), aunque el efecto no se mantuvo tras 28 días; los autores atribuyen esta pérdida de eficacia, en parte, a reacciones en el sitio de inyección y a mecanismos compensatorios inflamatorios, como la participación de otras citocinas, entre ellas el TNF-α [30]. La Figura 2 ilustra el mecanismo fisiopatológico del estrés oxidativo y su función en la progresión de las ECV.



Figura 2. **Mecanismo fisiopatológico del estrés oxidativo y su progresión hacia la enfermedad cardiovascular**. El esquema ilustra el desequilibrio redox iniciado en diversas estirpes celulares (cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y macrófagos) derivado de la disfunción mitocondrial, la sobreexpresión de NADPH oxidasas (NOX) y la disminución de actividad del superóxido dismutasa (SOD). La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) compromete la integridad estructural mediante la peroxidación lipídica, el daño al ADN/proteínas y la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, desencadenando vías de muerte celular (apoptosis y autofagia). Este microambiente prooxidante activa una respuesta inflamatoria mediada por citocinas (TNF-α, IL-1, IL-6, TGFβ) y factores de transcripción (NF-κB, AP-1), lo que promueve la síntesis de colágeno tipos I y III y el depósito excesivo de matriz extracelular. El proceso culmina en fibrosis intersticial, comprometiendo la función contráctil y exacerbando el desarrollo de la ECV.

3.5 Astaxantina: propiedades antioxidantes y antiinflamatorias

Inhibir el estrés oxidativo es esencial para amortiguar las alteraciones que provoca la liberación sostenida de hormonas y proteínas durante el estrés prolongado [11]. La astaxantina (ASTX) es un carotenoide de la clase de las xantofilas (fórmula química $C_{40}H_{52}O_4$), reconocido por sus potentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, entre ellas la restauración de la sensibilidad a la insulina en el corazón [4, 10, 16, 19, 20]. Se trata de un pigmento rojo presente en una concentración cercana al 80 % en microalgas marinas [4, 16, 20] y se considera uno de los antioxidantes más eficientes del medio natural: su capacidad para neutralizar el oxígeno singlete llega a ser hasta 6 000 veces mayor que la de la vitamina C y 18 veces superior a la del Pycnogenol [15, 16]. La estructura química de la ASTX se muestra en la Figura 3.

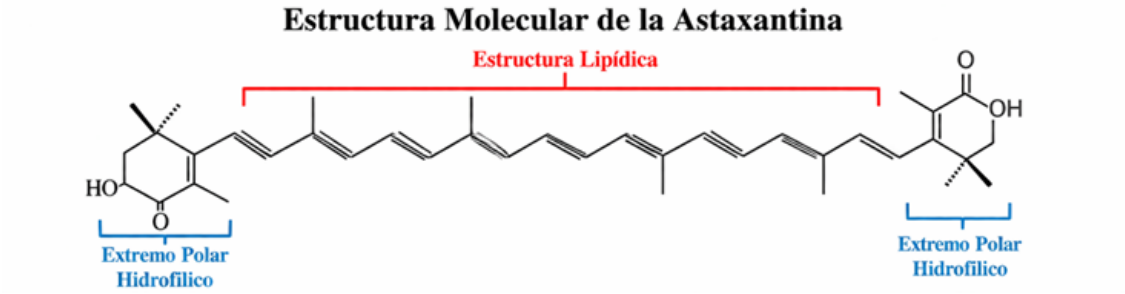


Figura 3. **Estructura química y mecanismo de protección molecular de la astaxantina**. Estructura molecular de la astaxantina $C_{40}H_{52}O_4$, destacando su configuración polar única que incluye componentes liposolubles e hidrosolubles [16]. Esta arquitectura permite al carotenoide atravesar y estabilizar la bicapa lipídica celular, protegiendo simultáneamente el interior y el exterior de los cardiomiocitos. Se resalta su capacidad para neutralizar radicales libres en las mitocondrias, restaurar la sensibilidad a la insulina y mitigar la activación de vías profibróticas como el TGF-β.

A diferencia de la mayoría de los carotenoides, que se acumulan sobre todo en el hígado, la ASTX se absorbe y distribuye a todos los órganos (incluidos el cerebro, el corazón, los músculos y la piel), donde combate la oxidación y la inflamación; esta es una de sus características más distintivas [16]. Su estructura química le confiere propiedades polares que le permiten atravesar la membrana celular y proteger de forma simultánea las regiones hidrosolubles y liposolubles de la célula, lo que potencia su acción frente al daño oxidativo: inhibe las ROS, elimina los radicales libres en las mitocondrias, mejora la captación de glucosa y restaura el equilibrio redox [16, 20]. En este contexto, considerando el modelo aviar de Lin y cols. (2004), reporta una adaptación al estrés tras tres días mediante el aumento de antioxidantes endógenos, como el ácido úrico y la ceruloplasmina [6].

La ASTX también protege a los cardiomiocitos del daño mitocondrial y reduce la activación de vías profibróticas, como la del TGF-β, que promueven la expresión de proteínas asociadas a la fibrosis, entre ellas la FAP [4, 15, 19]. Sus efectos protectores se han demostrado en varios modelos animales: disminuye

la oxidación lipídica en úlceras gástricas inducidas por naproxeno, contrarresta el estrés oxidativo cardíaco inducido por hipertensión al aumentar las enzimas antioxidantes y, como pretratamiento, reduce el tamaño del infarto en casos de oclusión de la arteria coronaria [15, 19]. Sin embargo, aún no existen estudios que evalúen si la ASTX inhibe de manera conjunta el daño metabólico y el proinflamatorio inducido por estrés crónico.

3.6 Transporte de Glucosa en Miocardio

La entrada de glucosa a los cardiomiocitos es un paso fundamental y estrictamente regulado, mediado principalmente por dos familias de proteínas transportadoras: 1. los transportadores facilitadores de glucosa (GLUT) y, con un papel más controvertido en el transporte directo; 2. los cotransportadores de sodio-glucosa (SGLT) [10, 13, 24, 26, 32, 33]. Los GLUT pertenecen a la familia de portadores de solutos 2 (SLC2A) y comprenden 14 isoformas conocidas en humanos (GLUT1–GLUT14) [13, 33]. Se trata de proteínas integrales de membrana que transportan glucosa a favor de su gradiente de concentración mediante difusión facilitada, un proceso que no consume ATP de forma directa. Según la homología de secuencias, se clasifican en tres clases: Clase I (GLUT1–4 y GLUT14), Clase II (GLUT5, 7, 9 y 11) y Clase III (GLUT6, 8, 10, 12 y HMIT1/GLUT13. Para la captación de glucosa cardíaca, los GLUT de Clase I (en particular GLUT1 y GLUT4) tienen la mayor relevancia fisiológica [12, 13, 26, 32, 33].

El GLUT1 (gen SLC2A1) es clave para la captación basal en numerosas células, incluidos los cardiomiocitos; aunque su expresión disminuye en el corazón adulto, puede reactivarse de forma notable bajo estrés (hipoxia, isquemia o hipertrofia) como respuesta adaptativa para aumentar la disponibilidad de glucosa cuando escasean otros sustratos o el oxígeno [12–15, 26, 31–33]. El GLUT4 (gen SLC2A4) es el transportador principal sensible a la insulina en cardiomiocitos, músculo esquelético y adipocitos [10, 13, 26, 33]; resulta indispensable para incrementar la captación de glucosa en respuesta a la insulina y a otros estímulos, como el aumento del trabajo cardíaco, la contracción y la isquemia [1, 13–15, 32, 33]. La contracción muscular, la hipoxia o isquemia y las catecolaminas, a través de los receptores β-adrenérgicos; promueven su translocación al sarcolema [10, 14]. En términos generales, los GLUT1 y GLUT4 son los principales mediadores de la entrada de glucosa a los cardiomiocitos y aseguran tanto un suministro basal como la capacidad de respuesta rápida ante las fluctuantes demandas energéticas del corazón [10, 13, 14, 31–33].

Otras isoformas se han identificado en el tejido cardíaco, aunque su contribución al flujo global de glucosa suele ser menor: el GLUT3 (SLC2A3) posee alta afinidad por la glucosa y se expresa sobre todo en neuronas [13, 33]; el GLUT5 (SLC2A5) transporta principalmente fructosa, con un papel mínimo en el transporte directo de glucosa cardíaca [13, 33]; el GLUT7 (SLC2A7) transporta glucosa y fructosa con alta afinidad, aunque su aporte cardíaco no está bien definido [13, 33]; el GLUT8 (SLC2A8) es intracelular y

sensible a la insulina, con un papel cardíaco aún en estudio [13, 33]; el GLUT12 (SLC2A12), también sensible a la insulina, contribuye menos que el GLUT4 [1, 13, 31–33]. Por su parte, el SGLT1 (gen SLC5A1), miembro de la familia de cotransportadores de sodio-glucosa, impulsa el transporte secundario de glucosa hacia el interior celular en contra de su gradiente [13, 24, 32, 33].

Un ejemplo de la utilidad de la 2-desoxiglucosa para medir la captación de glucosa es el trabajo de Ferté y cols. (2021), que buscó esclarecer el papel del SGLT1 en el corazón, hasta entonces desconocido y controvertido [24, 32]. Los autores emplearon ratones modificados genéticamente carentes del transportador SGLT1 (knockout) y los compararon con ratones normales (wild-type), midiendo la captación de glucosa tanto en células cardíacas aisladas como in vivo mediante micro-PET con [^{3}H]-2-desoxiglucosa, técnica que evalúa principalmente el transporte mediado por GLUT [26, 32, 34]. Concluyeron que el SGLT1 cardíaco no contribuye a la captación total de glucosa, aunque su inhibición protege al corazón de la lesión por isquemia-reperfusión al reducir la activación de la NADPH oxidasa (NOX2) y la producción de ROS [32].

3.7 Cadena Metabólica

Una vez que la glucosa ingresa al cardiomiocito a través de GLUT1 y GLUT4 [9, 12–14, 24, 26, 31–33], se somete a una serie de transformaciones metabólicas destinadas a extraer energía en forma de ATP y a generar intermediarios para otras vías biosintéticas. Este proceso puede dividirse en cuatro fases:

1) Glucólisis. La glucosa es la fuente de energía celular más común y el sustrato de numerosos procesos bioquímicos; el organismo la obtiene sobre todo de los carbohidratos de la dieta, aunque también puede sintetizarla mediante gluconeogénesis [5, 13, 24]. Dada su naturaleza hidrófila, no atraviesa libremente las membranas y requiere de los transportadores GLUT para entrar a la célula [5, 13, 24]. El primer paso es la fosforilación: la hexoquinasa emplea una molécula de ATP para convertir la glucosa en glucosa-6-fosfato (G-6-P), reacción irreversible que atrapa el azúcar dentro de la célula [13, 24]. La G-6-P puede continuar en la glucólisis o desviarse hacia la vía de las pentosas fosfato, donde la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa la metaboliza para producir NADPH, esta es esencial en la protección frente al estrés oxidativo, y precursores para la síntesis de nucleótidos. Para la producción de energía, la fosfoglucosa isomerasa convierte la G-6-P en fructosa-6-fosfato, a la que siguen otra fosforilación dependiente de ATP y la ruptura de la molécula de seis carbonos en dos de tres carbonos [5, 12–14, 21, 24].

2) Conversión de Piruvato a Acetil-CoA. El piruvato generado en el citosol se transporta a la matriz mitocondrial, donde el complejo piruvato deshidrogenasa cataliza su descarboxilación oxidativa irreversible. Este complejo convierte el piruvato (3 carbonos) en acetil-CoA (2 carbonos), libera una molécula de CO_2 y reduce una molécula de NAD^+ a NADH [5, 12, 13].

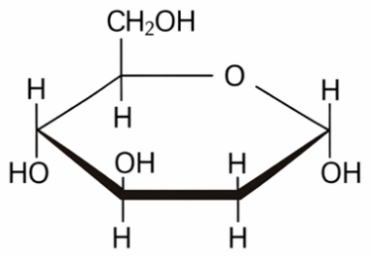
3) Ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico, TCA). El acetil-CoA, derivado del piruvato o de la β-oxidación de ácidos grasos, ingresa a una serie cíclica de ocho reacciones enzimáticas en la matriz mitocondrial. Su propósito es completar la oxidación de los carbonos del acetil-CoA a CO_2 y capturar la energía liberada en forma de equivalentes reductores (NADH y $FADH_2$) y una molécula de GTP (o ATP por fosforilación a nivel de sustrato) [5, 12–14, 31, 32].

4) Fosforilación Oxidativa. Es el proceso por el cual la energía almacenada en el NADH y el $FADH_2$ se convierte en ATP. Ocurre en la membrana mitocondrial interna y consta de dos componentes acoplados: la cadena de transporte de electrones y la quimiosmosis mediada por la ATP sintasa [5, 12, 32]. Sun y cols. (2024) señalan que esta vía es central en el metabolismo energético del miocardio, pues genera cerca del 95 % del ATP que utiliza [12]; asimismo, Ilkun y Boudina (2013) indican que entre el 0.4 y el 4 % del oxígeno se reduce de forma incompleta y forma ROS, principalmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones [14].

El estrés psicológico altera de manera significativa este metabolismo, sobre todo al afectar la captación y la utilización de la glucosa. Dado que el GLUT4 es el principal transportador sensible a la insulina [10, 12, 13, 24, 26, 31–33], la resistencia a la insulina compromete directamente su translocación a la membrana y, con ello, la entrada de glucosa [9, 12–14, 24, 33]. Esta alteración representa un cambio metabólico perjudicial pero cuantificable, que puede evaluarse con la 2-DG como marcador de daño metabólico.

3.8 Función de la 2-deoxiglucosa (2-DG)

La captación de glucosa en el metabolismo del miocardio se evaluó con 2-desoxiglucosa (2-DG), ampliamente empleada en estudios de metabolismo celular [24, 26]. La 2-DG es un análogo de la glucosa con una modificación clave: en el carbono 2 posee un átomo de hidrógeno (-H) en lugar de un grupo hidroxilo (-OH). Gracias a esta similitud, las células la reconocen como glucosa y la internalizan mediante los transportadores GLUT; sin embargo, la ausencia del hidroxilo impide su isomerización, de modo que no se metaboliza por completo y se acumula en el interior celular [24, 26]. La estructura química de la 2-DG se muestra en la Figura 4 [24].



2-deoxy-D-glucosa

Figura 4. **Estructura química de la 2-Deoxiglucosa (2-DG).** Representación molecular de la 2-Deoxy-D-Glucosa (2-DG), un análogo sintético de la glucosa donde el grupo hidroxilo (-OH) en el carbono 2 ha sido sustituido por un átomo de hidrógeno (-H) [24]. Esta modificación estructural es fundamental para su función como biomarcador diagnóstico, ya que permite que la molécula sea reconocida y transportada hacia el interior celular por los canales GLUT, pero impide su isomerización y posterior metabolización por glucólisis.

El mecanismo que permite emplear la 2-DG como marcador del metabolismo de la glucosa, representado en la Figura 5, comprende cuatro etapas:

1) Transporte Celular. Al igual que la glucosa, la 2-DG es reconocida por los transportadores GLUT y es internalizada [13, 24, 26].
2) Fosforilación Inicial. Ya dentro, la hexoquinasa (HK) la fosforila a 2-desoxi-glucosa-6-fosfato (2-DG-6-P); esta reacción consume ATP y "atrapa" la molécula dentro de la célula [13, 24, 34].
3) Bloqueo Metabólico. En esto consiste su utilidad: la fosfoglucosa isomerasa (GPI) requiere el -OH del carbono 2 para convertir la glucosa-6-fosfato en fructosa-6-fosfato. Como la 2-DG-6-P carece de ese grupo, no puede ser metabolizada por la GPI [24, 34].
4) Acumulación Celular. En consecuencia, la 2-DG-6-P no continúa por la glucólisis ni se desvía con eficiencia a otras rutas, y se acumula en proporción a la tasa de captación de glucosa y a la actividad de la hexoquinasa [13, 24, 34].

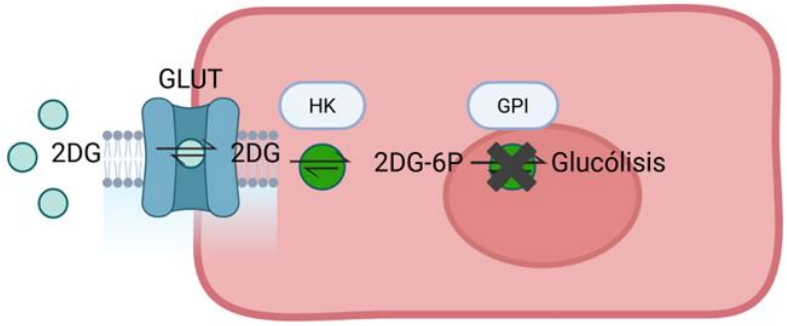


Figura 5. **Atrapamiento metabólico de la 2-DG en el citosol celular**. Esquema de la entrada intracelular de la 2-DG basado en el modelo de Kubota (2001) [34]. Tras ingresar a la célula mediante los transportadores GLUT, la enzima hexoquinasa (HK) fosforila la molécula para formar 2-DG-6-fosfato. Debido a la ausencia del grupo hidroxilo en el carbono 2, la fosfoglucosa isomerasa (GPI) no puede procesar el sustrato, provocando la acumulación de 2-DG-6-P en el citoplasma. Esta retención es proporcional a la tasa de captación de glucosa, permitiendo su uso como indicador de la flexibilidad energética miocárdica.

Diversos estudios han descrito efectos adicionales de la 2-DG: Shutt y cols. (2010) demostraron que la privación de glucosa que induce también estimula la producción de ROS y la autofagia, aumenta el estrés

del retículo endoplásmico y disminuye los niveles de ATP [24], mientras que Xu y cols. (2005) reportaron que promueve la apoptosis mediada por TRAIL [14, 24].

En este trabajo, las propiedades de transporte de la 2-DG se aprovecharon mediante la sonda fluorescente comercial 2-DG-IRDye800CW, cuyas propiedades ópticas se describen en la sección 3.9.2. La adquisición se realizó con el sistema Bruker In-Vivo Xtreme, capaz de capturar imágenes fluorescentes mediante una cámara CCD retroiluminada de 4 MP (f/1.1–f/16, lente fija de 58 mm) equipada con 28 filtros de banda ancha (410–750 nm) y 6 de alta longitud de onda hasta 830 nm.

3.9 Principios Físicos de la Imagen Óptica

3.9.1 El Fluoróforo 2DG-IRDye800CW

La cuantificación de la sonda 2-DG-IRDye800CW no es trivial, pues depende de los principios físicos de la interacción de la luz con el tejido biológico. Su componente de señalización es el fluoróforo de infrarrojo cercano (NIR) IRDye 800CW, con una absorción 774 nm y una emisión máxima de 789 nm, conjugado con 2-DG [26]. Un fluoróforo es una molécula capaz de absorber fotones de una longitud de onda específica (excitación), lo que promueve sus electrones a un estado excitado inestable; al retornar a su estado basal, libera el exceso de energía como luz (emisión) de mayor longitud de onda [26, 35]. Los fluoróforos NIR presentan una excelente relación señal-ruido en animales completos y permiten adquisiciones más prolongadas que las sondas radiomarcadas; al reducir el ruido de fondo, aumentan la sensibilidad y la profundidad de penetración, lo que mejora la calidad de imagen [26, 35].

Se eligió este fluoróforo, entre otras razones, por su desplazamiento de Stokes (Stokes shift) [35], es decir, la diferencia espectral entre los picos máximos de absorción y de emisión. Un desplazamiento de Stokes adecuado es determinante para la instrumentación, ya que permite separar ópticamente la luz de excitación de la señal de fluorescencia, con lo que se minimiza la interferencia de fondo y se mejora la relación señal-ruido [35].

3.9.2 Propiedades Ópticas del 2DG-IRDye800CW

La capacidad de la luz para penetrar un tejido, interactuar con sus componentes y escapar de él para ser detectada es fundamental en las aplicaciones diagnósticas [36]. El 2-DG-IRDye800CW demostró ser un fluoróforo altamente eficiente para la imagen in vivo en este modelo murino gracias a sus propiedades ópticas, entre las que destacan [26]:

- Posición espectral: opera dentro de la ventana terapéutica del infrarrojo cercano (NIR-I, 650-900 nm).
- Máximo de absorción/excitación: cercano a 774 nm en PBS y 778 nm en metanol.
- Máximo de emisión: cercano a 794 nm.

- Desplazamiento de Stokes: pequeño, de aproximadamente 15 nm en PBS y 16 nm en metanol.
- Forma de la banda de absorción: ancha y suave, de tipo cianina.
- Forma de la banda de emisión: banda NIR relativamente estrecha, desplazada hacia el rojo.

En esta región espectral, la autofluorescencia tisular es mínima y la absorción por cromóforos endógenos, como la hemoglobina y el agua, se reduce de forma drástica, lo que permite una penetración tisular profunda y la detección sensible de estructuras internas, como el miocardio [26]. En el tejido biológico, la dispersión de la luz se rige por dos regímenes físicos [36]: 1. la dispersión de Rayleigh, que ocurre cuando las estructuras dispersoras son mucho menores que la longitud de onda ($<<\lambda$), como las membranas celulares y las macromoléculas; y 2. la dispersión de Mie, cuando las partículas tienen un tamaño comparable o mayor a la longitud de onda ($\geq\lambda$), como las mitocondrias y los núcleos celulares. Al emplear una longitud de onda de excitación de 774 nm (NIR), la dispersión de Rayleigh se reduce de forma notable respecto a la luz visible, lo que aumenta la profundidad de penetración de los fotones y la nitidez de la señal proveniente del miocardio [26, 35, 36].

3.10 Principios Físicos de la Medicina Nuclear Diagnóstica

3.10.1 El Radiofármaco: Principio del Trazador

Un radiofármaco es un compuesto formado por dos partes unidas: un radionúclido (un isótopo radiactivo) y una molécula farmacéutica no radiactiva que actúa como vector. Esta última se elige por su comportamiento biológico, es decir, por su tendencia a concentrarse en ciertos órganos o a participar en procesos fisiológicos específicos [37]. Para su uso en diagnóstico por imagen, un radiofármaco debe reunir varias características [37]:

1. Comportamiento biológico. La parte farmacéutica debe dirigir el compuesto al proceso fisiológico que se desea estudiar.
2. Vida media efectiva corta, resultado de la desintegración radiactiva y la eliminación biológica: suficientemente prolongada para permitir la adquisición de imágenes, pero lo bastante breve para minimizar la dosis al paciente.
3. Tipo de emisión adecuado. Para imagenología, el radionúclido debe emitir rayos gamma de energía apropiada (generalmente 100–200 keV) y no partículas (alfa o beta), que aumentan la dosis sin contribuir a la imagen.
4. Alta actividad específica, de modo que baste una pequeña masa del compuesto para no perturbar el proceso biológico medido (principio del trazador).
5. Seguridad. El compuesto debe ser estéril, apirógeno y carente de toxicidad farmacológica.

3.10.2 El Radionúclido: Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc)

El ^{99m}Tc es el radionúclido más utilizado en medicina nuclear diagnóstica gracias a su periodo de semidesintegración de 6 horas y a su emisión de rayos gamma de 140 keV. Estas propiedades lo convierten en un isótopo idóneo para la implementación de trazadores FAPI en sistemas de imagen, principalmente gammacámaras y tomografía por emisión de fotón único (SPECT) [22, 37].

3.10.3 Física de Detección: Radioluminiscencia (Sistema Híbrido)

Los sistemas de gammacámara y SPECT detectan directamente los rayos gamma de alta energía del ^{99m}Tc mediante cristales de centelleo gruesos y tubos fotomultiplicadores [22, 37]. En este estudio, sin embargo, la adquisición se realizó con el sistema Bruker In-Vivo Xtreme, por su alta sensibilidad para imagen preclínica y su capacidad de captar imágenes de fluorescencia, luminiscencia, radioisotópicas, de rayos X y de reflectancia. A diferencia de las gammacámaras convencionales, este equipo emplea una configuración indirecta basada en un dispositivo de carga acoplada (CCD) de alta sensibilidad. Dado que los sensores CCD de silicio interactúan poco con la radiación gamma de 140 keV, se requiere un material centelleador (pantalla de fósforo) que actúe como transductor de energía [37].

El proceso de detección se inicia cuando los rayos gamma interactúan con la red cristalina del centelleador y transfieren su energía a los electrones del material mediante dos mecanismos:

- Efecto fotoeléctrico. Predomina para fotones de baja energía y materiales de alto número atómico (Z) [38]. El rayo gamma transfiere toda su energía (hv) a un electrón de una capa interna (K o L), que es eyectado con una energía cinética ($E_e = hv - E_b$), donde E_b es la energía de enlace [37–39]. Este fotoelectrón, muy energético, provoca una cascada de ionizaciones secundarias al atravesar el cristal [39].
- Dispersión Compton. En este proceso de dispersión inelástica, el rayo gamma transfiere solo una fracción de su energía a un electrón de una capa externa (electrón de retroceso); el fotón dispersado continúa con menor energía en otra dirección, mientras el electrón deposita su energía cinética en el medio [37–39].

Ambos mecanismos generan electrones secundarios que excitan los átomos del cristal, elevan electrones de la banda de valencia a la de conducción y crean pares electrón-hueco [37, 39] La desexcitación posterior, mediada por centros de activación o impurezas de la red, libera la energía absorbida como fotones de luz visible (~400–700 nm) de baja energía [37, 39]. Este fenómeno, la radioluminiscencia, convierte un solo fotón gamma de 140 keV en miles de fotones de luz visible [39], que inciden sobre la cámara CCD y son

absorbidos por el silicio para generar la carga eléctrica que forma la imagen digital, lo que permite localizar espacialmente la biodistribución del radiofármaco.

3.10.4 Principios de Dosimetría Interna (Formalismo MIRD)

La optimización dosimétrica es un aspecto crítico, incluso para isótopos de diagnóstico como el ^{99m}Tc, ya que se requieren cálculos cuidadosos para minimizar la toxicidad en órganos sanos [22, 37, 40]. Para estimar la dosis absorbida en los órganos de los ratones se empleó el formalismo MIRD, desarrollado por el Comité de Dosis de Radiación Interna Médica [37, 40]. Este método ofrece un marco matemático estandarizado para calcular la energía depositada en un tejido (órgano blanco) proveniente de fuentes de radiación distribuidas internamente (órganos fuente) [37]. La dosis absorbida media se calcula mediante la ecuación (1) [37, 40]:

$$\overline{D}(r_k \leftarrow r_h) = \tilde{A} \times S(r_k \leftarrow r_h) \qquad (1)$$

Donde $\overline{D}$ es la dosis absorbida promedio, r_h es el órgano fuente, r_k es el órgano blanco, $\tilde{A}$ es la actividad acumulada en el órgano fuente y S la dosis media por unidad de actividad acumulada (factor de dosis). Sus componentes se definen así:

I. Actividad Acumulada ($\tilde{A}$). También llamada actividad integrada en el tiempo representa el número total de desintegraciones que ocurren en el órgano fuente (r_h) durante un periodo de interés. En términos matemáticos, es el área bajo la curva de actividad-tiempo $A(t)$ del radiofármaco en dicho órgano, expresado como la ecuación (2) [37].

$$\tilde{A} = \int_0^\infty A(t)\, dt \qquad (2)$$

Depende exclusivamente de la cinética biológica (biodistribución y excreción) y física (vida media) del radiofármaco [37].

II. Valor S. El factor $S(r_k \leftarrow r_h)$ engloba toda la física de la interacción de la radiación con la materia y la geometría anatómica. Representa la dosis absorbida media en el órgano blanco r_k por unidad de actividad acumulada en el órgano fuente r_h (mGy/MBq·s). El valor S se define como la ecuación (3) [37].

$$S(r_k \leftarrow r_h) = \frac{1}{m_k} \sum_i \phi_i\,(r_k \leftarrow r_h)\,\Delta_i \qquad (3)$$

Donde m_k es la masa del órgano blanco,$\phi_i\,(r_k \leftarrow r_h)$ a fracción de energía emitida en la fuente que se absorbe en el blanco y Δ_i la energía media emitida por desintegración para el tipo de radiación i.

El factor S (1.48×10^{-5} mGy/MBq-s) para el modelo murino de 25 g se obtuvo directamente de la base de datos interna del código OLINDA/EXM versión 2.1 (Vanderbilt University, 2012).

3.11 El radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP

Puesto que la FAP se sobreexpresa específicamente en los fibroblastos activados, los radiofármacos dirigidos a ella, como el ^{99m}Tc-iFAP, pueden acoplarse a la proteína y, mediante su ligando emisor de radiación, cuantificar su expresión incluso en etapas tempranas [22]. Esto es relevante porque la activación de los fibroblastos es un evento temprano en la respuesta a la lesión y precede a la deposición masiva de colágeno tipos I y III que caracteriza la fibrosis madura [14, 21, 22]; por ello, su detección temprana ofrece una ventana diagnóstica y terapéutica antes de que el daño estructural sea extenso e irreversible [22, 25].
El inhibidor de FAP (iFAP) es el ácido ((R)-1-((6-hidrazinilnicotinoil)-D-alanil) pirrolidin-2-il) borónico [22, 25], diseñado para interactuar de forma específica con el sitio activo de la FAP y bloquear su función enzimática. La inclusión de un grupo de ácido borónico es una estrategia bien establecida para inhibir serina proteasas, pues forma un aducto covalente reversible con la serina catalítica del sitio activo e impide la actividad proteolítica [25]. La estructura química del iFAP se muestra en la Figura 6 [25].

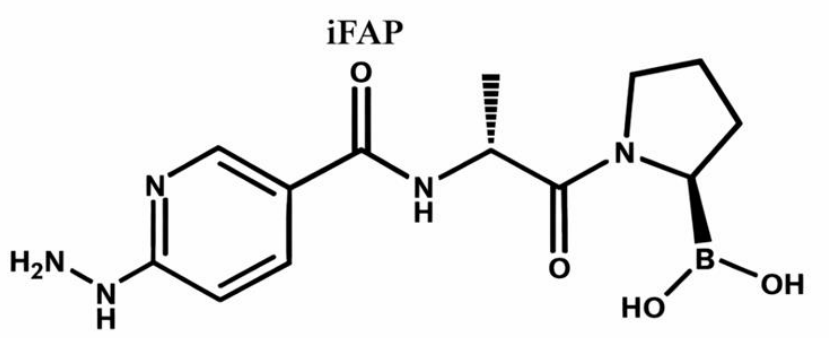


Figura 6. **Estructura química del inhibidor de FAP (iFAP)**. Configuración química del iFAP diseñado para la detección de procesos fibróticos activos. Se destaca el grupo de ácido borónico, encargado de formar un aducto covalente reversible con la serina catalítica del sitio activo de la FAP. Asimismo, la presencia de nitrógenos de hidrazina en el grupo HYNIC potencia la afinidad de la molécula mediante interacciones de Van der Waals y enlaces de hidrógeno. El HYNIC actúa además como agente quelante para el radiomarcaje con ^{99m}Tc-iFAP, permitiendo la visualización in vivo de la activación fibroblástica incipiente [25].

La especificidad y la afinidad del iFAP por la FAP son cruciales para su utilidad como agente de imagen molecular dirigido [22]. El radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP, más formalmente denominado ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-iFAP, se prepara a partir de una formulación liofilizada diseñada para un marcaje sencillo y eficiente [25]. Su desarrollo se describe en detalle en Trujillo-Benítez y cols. (2022): el grupo HYNIC cumple una doble función, ya que actúa como quelante para "sujetar" el ^{99m}Tc y, mediante los dos átomos de nitrógeno de su

grupo hidrazina, aporta interacciones adicionales con el sitio activo de la FAP que mejoran la afinidad del inhibidor [25].

Al estar marcado con ^{99m}Tc, la acumulación del radiofármaco en las áreas de activación fibroblástica [22], puede detectarse externamente mediante técnicas de medicina nuclear, como por ejemplo el más común el SPECT e incluso el sistema Bruker In-Vivo Xtreme como fue en este proyecto; lo que permite visualizar y, potencialmente, cuantificar de forma no invasiva la extensión e intensidad de estos procesos in vivo [25]. El ^{99m}Tc-iFAP ofrece ventajas frente a los marcadores séricos tradicionales y a otras técnicas de imagen cardíaca [22, 25]: identifica fibroblastos activados (fibrosis activa o en desarrollo) al dirigirse a la actividad endopeptidasa específica de la FAP, y tras unirse a ella se internaliza de forma rápida y casi completa en los fibroblastos FAP+, con mínima liberación al tejido circundante [22, 25]. Esto contrasta con el realce tardío de gadolinio en la resonancia magnética cardíaca (LGE-CMR), excelente para detectar fibrosis establecida o cicatrices, pero limitado para evaluar la actividad dinámica de la fibrinogénesis o para distinguir entre fibrosis activa y cicatriz residual inactiva [21]. Al reflejar la actividad biológica de los fibroblastos, la imagen con FAPI permite rastrear esa actividad a lo largo del tiempo, evaluar la respuesta al tratamiento y comprender mejor la dinámica del remodelado cardíaco [22].

3.12 Modelo de Estrés Crónico

El estrés por restricción limita el movimiento del animal mediante un dispositivo (tubo o contenedor de malla) que restringe el desplazamiento sin fijar las extremidades, en un espacio lo bastante reducido para impedir que el ratón se mueva o gire [27]. Este modelo activa el eje HPA y eleva los niveles de corticosterona (CORT), prácticamente el único glucocorticoide en roedores [29]. Cuando el estrés se vuelve crónico, puede provocar disfunción del eje HPA, con efectos negativos sobre el cerebro, la conducta y la salud general. En comparación con el modelo de estrés crónico leve (CMS), el de estrés crónico por restricción (CRS) es más simple y eficiente; además, es bien tolerado por ratas y ratones y puede emplearse en estudios de estrés crónico intermitente durante semanas o meses [27, 28].

Entre los factores que pueden influir en la prueba de CRS se encuentran [27, 28].

1) Cepa animal. El grado de respuesta al estrés varía según la cepa.

2) Factores ambientales, como la luz, el ruido, la temperatura, la humedad y las condiciones de alojamiento.

3) Aislamiento social, que puede modificar los resultados.

4) Sexo. Se recomienda usar machos, ya que los comportamientos emocionales y cognitivos de las hembras se ven afectados por el ciclo estral; no obstante, las hembras son relativamente más susceptibles a los trastornos relacionados con el estrés.

La restricción es un factor estresante complejo, con dimensiones físicas y psicológicas. El esfuerzo mental y muscular que implica equivale al ejercicio físico intenso, que daña el corazón a través de la respiración mitocondrial y la activación de la xantina oxidasa [15, 19, 27, 28]; a ello se suman el rango limitado de movimiento y la exposición en un área abierta, importantes fuentes de estrés psicológico [28]. El factor estresante debe ser lo bastante intenso para que se hiperexpresen los sistemas biológicos de respuesta al estrés y se generen los daños descritos en las secciones 3.2, 3.3 y 3.4 (lipotoxicidad, estrés oxidativo, carga alostática, arritmias, inflamación y afectación metabólica) [1–3, 5, 6, 8–12, 14, 15, 18, 21, 28]. Aunque pueden combinarse otros factores, como la exposición al frío [28], el modelo de restricción tiene una limitación importante: no permite graduar la intensidad del estímulo, a diferencia del estrés por descarga eléctrica o por frío [1, 28]. Otra limitación es la posible adaptación de los animales, que tras un tiempo dejan de luchar y permanecen inmóviles hasta que una perturbación sensorial, por ejemplo, un ruido repentino reactiva la respuesta [27, 28].

La implementación de un modelo de estrés crónico de seis meses resulta crucial para evaluar la cronicidad del daño en mamíferos. En aves se ha observado una "meseta" adaptativa: la peroxidación lipídica (TBARS) aumenta al inicio, pero no se agrava tras los primeros días, debido a un incremento compensatorio de antioxidantes no enzimáticos, como el ácido úrico y la ceruloplasmina [6, 7]. Un periodo de seis meses en ratones permite determinar si el daño miocárdico en mamíferos es verdaderamente acumulativo o si también existe una fase de adaptación, y evaluar el papel de la ASTX para reducir el daño que supera esa posible meseta.

3.13 Aplicabilidad del Modelo Murino

El modelo murino es una herramienta fundamental y valiosa en la investigación biomédica [1, 2, 4, 10, 15, 23, 25, 40, 41]. Su utilidad radica en la notable similitud genética, fisiológica y anatómica entre el ratón y el ser humano, que permite estudiar enfermedades, probar tratamientos y comprender procesos biológicos complejos de forma controlada y ética [1, 2, 4, 23]. La secuenciación de ambos genomas indica que solo unos 300 genes parecen ser exclusivos de una u otra especie [23]. Además, la posibilidad de manipular genéticamente a los ratones para replicar patologías humanas, junto con su ciclo de vida corto y su rápida reproducción, los hace idóneos para la experimentación.

De la amplia diversidad de cepas disponibles, se seleccionó la CD1 por sus características particulares. A diferencia de las cepas consanguíneas, genéticamente idénticas (como la C57BL/6), la CD1 es exogámica [23], por lo que presenta mayor heterogeneidad genética y refleja mejor la diversidad de la población humana; esta variabilidad favorece la generalización de los resultados. Es una cepa común en estudios de toxicología y farmacología y como modelo de propósito general, idónea para evaluar respuestas biológicas en un sistema no restringido genéticamente [1, 2, 4, 10, 15, 23, 25].

Los sistemas cardiovasculares del ratón y el humano comparten numerosas características, como un corazón de cuatro cámaras con predominio del ventrículo izquierdo [41]. Pese a la diferencia de tamaño, la proporción entre el peso del corazón y el corporal, así como el grosor relativo de las paredes ventriculares, son similares; buena parte de los exámenes que en humanos se realizan a nivel macroscópico se efectúan mejor a nivel microscópico en el ratón [41]. En ambas especies, la mayor parte de la masa cardíaca corresponde a cardiomiocitos, junto con células endoteliales, fibroblastos y leucocitos [41]. Aunque las similitudes fisiológicas y genómicas validan su uso como modelo, es fundamental reconocer las diferencias anatómicas para interpretar correctamente los hallazgos [41]:

1) Anatomía General y Fisiología
   - Forma y Posición: El corazón del ratón tiene una forma ovalada y no descansa sobre el diafragma, mientras que el humano es cónico y sí se apoya en él.
   - Frecuencia Cardíaca: Existe una diferencia masiva en el ritmo del ratón el cual late entre 350 y 700 veces por minuto, en comparación con el humano que es de 60 a 100.
   - Surco Interventricular y Grasa: El ratón no presenta un surco interventricular distintivo y casi no posee grasa epicárdica, la cual es abundante en los humanos.
   - Capa del pericardio: En ratones es muy delgado (pocas capas celulares) y fácil de perder durante la necropsia, a diferencia del humano que es una estructura más sustancial (1-3 mm de grosor).
   - Esqueleto fibroso del corazón: Este aísla y da soporte al sistema de conducción, es mucho menos conspicuo en ratones que en humanos.
2) Vasculatura y Cavidades Estructura de las válvulas.
   - Venas Cavas: Los ratones poseen dos venas cavas craneales (izquierda y derecha), a diferencia del humano que solo tiene una (superior).
   - Venas Pulmonares: En el ratón, las venas se fusionan antes de entrar a la aurícula izquierda y en los humanos son cuatro venas independientes se unen a la aurícula.
   - Arterias Coronarias: En el ratón son intramiocárdicas (están dentro del músculo), por lo que no se ven en la superficie, mientras que en humanos son epicárdicas.
3) Histología y Microestructura
   - Núcleos de los Cardiomiocitos: La mayoría de las células musculares del ratón tienen dos núcleos, mientras que en humanos la mayoría tiene solo uno.
   - Esqueleto Cardíaco: El ratón tiene un esqueleto fibroso poco definido, a diferencia de la estructura robusta y clara del corazón humano.
   - Válvulas Cardíacas: Las válvulas del ratón están compuestas por una cortina más continua, sin capas histológicas distintas, mientras que las humanas tienen valvas claras con tres capas (atrialis/ventricularis, spongiosa y fibrosa).

- El intersticio cardíaco (tejido conectivo entre cardiomiocitos): En ratones contienen fibroblastos, células endoteliales de capilares, y escasos leucocitos y adipocitos, mientras que en humanos son abundantes.

Todas estas diferencias son anatómicas y no genómicas, por lo que se garantiza que el metabolismo del corazón murino es similar al humano y lo que conlleve los daños de uno pueden replicarse en el otro; así mismo, los procesos inflamatorio y profibróticos mantienen la misma validación.

Capítulo 4: Metodología

5.1 Diseño del estudio

Ensayo experimental cuantitativo, aleatorizado y controlado.

5.2 Operacionalización de variables

Las variables independientes, dependientes e intervinientes del estudio se describen en las Tablas 1, 2 y 3, respectivamente.

Tabla 1. Variables Independientes

Variables Independientes	Tipo de variable	Definición Teórica	Definición Operacional	Nivel de medición	Indicador
Suplementación con Astaxantina	Cualitativa	Moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.	Dosis de antioxidante suplementada en ratones en determinado tiempo	De razón	Miligramos por kilogramo (mg/kg)

Tabla 2. Variables Dependientes

Variables Dependientes	Tipo de variable	Definición Teórica	Definición Operacional	Nivel de medición	Indicador
Captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular	Cuantitativa	Grado de concentración del radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP en el tejido miocárdico, que actúa como indicador de la expresión de FAP para la detección de procesos de inflamación-fibrosis	Determinación mediante la detección de la señal de radioluminiscencia en el corazón ex vivo utilizando el sistema multimodal Bruker In-Vivo Xtreme. El procesamiento se realizó con el BMI,	De razón	Flujo medio de fotones (P/s/mm^2)

		incipiente.	delimitando ROI's sobre la silueta cardíaca para cuantificar el flujo medio de fotones.		
Captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP por contador de Pozo	Cuantitativa	Nivel de acumulación del radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP en el tejido miocárdico ex vivo. Refleja la actividad del FAP y la intensidad de los procesos de inflamación/fibrosis incipiente.	Medición a través del registro de las CPM netas del corazón utilizando un contador de pozo Auto In-V-tron 4010. La cuantificación se calcula en función de la actividad total inyectada y la masa del órgano.	De razón	Porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%I.D./g) y porcentaje de dosis inyectada total (%ID)
Captación miocárdica de 2-DG-IRDye800CW por imagen molecular	Cuantitativa	Nivel de acumulación de la sonda fluorescente NIR 2-DG-IRDye800CW en tejido miocárdico. Variable indicativa de la tasa de transporte de glucosa a los requerimientos glucoenergético del miocardio.	Determinación mediante la detección de la señal de radioluminiscencia en el corazón ex vivo utilizando el sistema multimodal Bruker In-Vivo Xtreme. El procesamiento se realizó con el BMI, delimitando ROI's sobre la silueta cardíaca para cuantificar el flujo medio de fotones.	De razón	Flujo medio de fotones (P/s/mm²)

Tabla 3. Variables Intervinientes

Variables Dependientes	Tipo de variable	Definición Teórica	Definición Operacional	Nivel de medición	Indicador
Edad de los ratones	Cuantitativa	Etapa de desarrollo de los animales al inicio del estudio.	Selección de animales dentro de un rango de edad específico (adultos jóvenes de 8 a 10 semanas) para todos los grupos.	De razón	Semanas
Masa/Peso de ratones	Cuantitativa	Masa corporal de los animales.	Registro del peso al inicio del estudio para asegurar homogeneidad entre grupos, con monitorización periódica durante el experimento para detectar cambios significativos que puedan indicar problemas de salud o adaptación.	De razón	Gramos (g)
Tiempo de biodistribución	Cuantitativa	Intervalo entre la administración del trazador (2-DG-IRDye800CW o ^{99m}Tc-iFAP) y la adquisición de la imagen molecular.	Empleo de 3 tiempos de biodistribución (30 min, 3 h, 24 h) para ^{99m}Tc-iFAP y (3 h) para 2-DG-IRDye800CW	De razón	Minutos (min, ‘) y horas (h, hrs)

4.3 Entorno de trabajo y muestra

Se emplearon 32 ratones macho, distribuidos de forma aleatoria en cuatro grupos experimentales (n=8 cada uno):

1. Control (CT)
2. Estrés crónico por restricción de movimiento (ST)
3. Suplementación con astaxantina (ASTX)
4. Estrés crónico y suplementación con astaxantina (ST+ASTX)

4.4 Instrumento de investigación

La población de estudio estuvo constituida por ratones macho de la cepa CD1, de 8 a 10 semanas de edad y un peso aproximado de 30 a 35 g, adquiridos en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado Morelos.

4.5 Desarrollo del proyecto

4.5.1 Condiciones de Alojamiento y Cuidado Animal

Todos los animales se alojaron en jaulas de acrílico, con alimento (Rodent Diet, LabDiet, cat. 5001) y agua a libre demanda. Las condiciones ambientales se controlaron de forma rigurosa: ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas, temperatura de 20-24 °C y humedad relativa del 40-60 %. Todas las prácticas de manejo y cuidado se realizaron conforme a los principios éticos internacionales y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Para su seguimiento, los ratones se etiquetaron y se clasificaron en sus respectivos grupos de trabajo.

4.5.2 Inducción de Estrés Crónico por Restricción de Movimiento

Los (16/32) ratones de los grupos ST y ST+ASTX se colocaron de forma individual en contenedores cilíndricos de acrílico (1 pulgada de diámetro por 3 de longitud, con orificios de ventilación en el extremo nasal), que permitían una ligera rotación del animal sin llegar a la inmovilización completa. El procedimiento se aplicó durante 3 horas, dos veces por semana, a lo largo de seis meses, mientras se mantenían las mismas condiciones de cuidado que en los grupos control (CT y ASTX). Para asegurar la consistencia y anular los efectos del ciclo circadiano, todos los procedimientos se iniciaron en un horario matutino fijo (entre las 8:00 y las 10:00 h). Además, con el fin de evitar la habituación, cada 30 minutos se aplicaron estímulos intermitentes de ruido, tacto, inclinación y rotación del dispositivo.

4.5.3 Esquema de Suplementación con Astaxantina

A los grupos ASTX y ST+ASTX se les administró astaxantina (BioAstin® Vegetarian Beadlets, Item #100602) en microperlas al 2 %, por vía oral, dos veces por semana, a una dosis de 5 mg/kg/día. Dado que la astaxantina es liposoluble, se preparó una suspensión hidrosoluble mediante homogeneización con Tween-20 al 2 %; la mezcla se diluyó y homogeneizó en 2 mL de agua con ayuda de un mortero para asegurar una suspensión uniforme. La administración se realizó por vía oral con micropipeta, sujetando a los animales con la precaución de minimizar el estrés por manipulación. La suplementación inició cuando los animales cumplieron entre 8 y 10 semanas de edad y se prolongó hasta la conclusión del proyecto.

4.6 Criterios de Inclusión, Exclusión y Eliminación

4.6.1 Criterios de inclusión

- Ratones machos de la cepa CD1.
- Edad adulta joven al inicio del estudio (8 a10 semanas de edad, con un peso de 30-35 g).
- Animales sanos al inicio del periodo de aclimatación.

4.6.2 Criterios de exclusión

- Animales con signos de enfermedad o estrés agudo antes del inicio de los procedimientos.
- Hembras, para evitar la variabilidad asociada al ciclo estral.
- Animales que no se adaptaran al periodo de aclimatación.

4.6.3 Criterios de eliminación

- Muerte prematura por causas ajenas a los procedimientos evaluados.
- Complicaciones severas (heridas o infecciones graves) que impidieran la continuación del animal o alteraran los resultados.
- Pérdida de más del 20% del peso corporal o signos de sufrimiento extremo, conforme a las directrices bioéticas.

4.7 Procedimientos Experimentales

Concluidos los seis meses de intervención con estrés crónico y suplementación, se realizó el estudio por imagen molecular en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (Lanider-ININ), conforme a los procedimientos que se describen a continuación.

4.7.1 Administración de 2-DG-IRDye800CW y ^{99m}Tc-iFAP

La administración se realizó por vía intravenosa (i.v.) con jeringas de insulina de 30 G × 13 mm, con el fin de minimizar el riesgo de infiltración. A 8 de los 32 ratones (dos por grupo experimental) se les administró la sonda fluorescente 2-DG-IRDye800CW (LICORbio, cat. 926-08946) en una dosis de 0.55 mL. De forma independiente, a los 24 ratones restantes (dos por tiempo y grupo) se les administró el radiofármaco ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-iFAP (Lanider-ININ, México), con una actividad de 223 a 298 µCi en 100 µL, preparado con una carga constante de 100 µL (0.1 g) por dosis.

4.7.2 Biodistribución

Posterior a la administración de los trazadores, se respetaron los tiempos de biodistribución indicados en la Tabla 4, seleccionados para garantizar la distribución de los trazadores mediante el aclaramiento sanguíneo y su fijación tisular en el corazón. Estos tiempos permiten el desarrollo de los procesos proinflamatorios y profibróticos responsables de la activación de la FAP, de modo que la señal detectada por el ^{99m}Tc-iFAP sea proporcional a su inhibición; asimismo, otorgan el tiempo suficiente para que la señal fluorescente del 2-DG-IRDye800CW corresponda a su fijación en el metabolismo celular.

Tabla 4. Grupos, ratones y tiempos de biodistribución según el agente administrado.

Trazador	Biodistribución	CT	ST	ASTX	ST+ASTX
2-DG-IRDye800CW	3 horas	2	2	2	2
^{99m}Tc-iFAP	30 minutos	2	2	2	2
	3 horas	2	2	2	2
	24 horas	2	2	2	2

4.7.3 Eutanasia

Cumplidos los intervalos de biodistribución, se practicó la eutanasia de los animales, libre de sufrimiento, mediante una cámara de dióxido de carbono (CO_2) regulada a una presión de 20 mmHg y un flujo de 2-2.5 L/min, lo que produjo un desplazamiento del 20 % de O_2 por minuto. Este método, avalado por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria, se aplicó para atenuar cualquier efecto estresante en los roedores y evitar que esta variable se introdujera en los grupos control (CT y ASTX).

4.7.4 Disección

Posterior al sacrificio, se realizó un corte longitudinal sobre la línea alba de los músculos abdominales y se abrió la caja torácica hasta la línea medioclavicular. A continuación, se extrajo sangre con una jeringa heparinizada y se depositó en tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente pesados; los tubos se pesaron de

nuevo con la sangre y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. El plasma obtenido se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL y se congeló. De forma paralela, se extrajeron el corazón y los órganos de interés, que se lavaron de inmediato con agua destilada y se colocaron sobre placas de acetato para la posterior adquisición de imagen molecular.

4.7.5 Adquisición de Imagen Molecular

Con los corazones colocados sobre las placas de acetato, se adquirieron las imágenes ex vivo en un sistema de imagen preclínica multimodal equipado con una cámara CCD (Bruker In-Vivo Xtreme, Billerica, MA, EE. UU.), obteniendo tanto la imagen de reflectancia como la de luminiscencia. Para permitir la comparación directa entre condiciones, las muestras se dispusieron en un mismo campo de adquisición siguiendo un orden fijo por grupo experimental:



Este orden se mantuvo constante en todas las adquisiciones para conservar la correspondencia espacial entre las muestras y sus grupos.

4.7.6 Cuantificación biocinética ex vivo

Este procedimiento se aplicó únicamente a los grupos administrados con ^{99m}Tc-iFAP. Tras la adquisición de imagen, los corazones se guardaron en bolsas de celofán plano (peso promedio de 0.1930 g), previamente etiquetadas, y se midió el número de cuentas por minuto (CPM) con un detector de centelleo de cristal tipo pozo (Auto In-V-tron 4010; NML Inc., Houston, TX, EE. UU.). La geometría de conteo se ajustó según el tiempo de biodistribución: los órganos de los grupos de 30 minutos y 3 horas se colocaron sobre una placa de Petri por encima de la ventana de detección, para evitar la saturación del contador y la consiguiente generación de datos erróneos, mientras que los de 24 horas se introdujeron dentro de la ventana, geometría que mejora el registro de cuentas. En cada medición se registró el fondo y se tomaron tres lecturas por órgano; del mismo modo, se replicó la misma metodología para las muestras de sangre contenidas en los tubos Eppendorf de 1.5 mL.

4.7.7 Determinación del peso de las muestras

Concluida la lectura de los CPM, se determinó el peso del corazón y de la fuente estándar (empleada en la ecuación 6) con una balanza analítica (Analytical Plus; OHAUS Inc., Parsippany, NJ, EE. UU.); del mismo modo, se pesaron las muestras de sangre contenidas en los tubos Eppendorf de 1.5 mL y se registraron todas

las lecturas. Por último, los corazones se conservaron en frascos etiquetados con formol tamponado al 10 %, preparado con 100 mL de formaldehído (solución concentrada al 37–40 %), 900 mL de agua destilada, 4 g/L de fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) y 6.5 g/L de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4).

4.8 Procesamiento de Imágenes

La cuantificación de la captación se realizó con los programas Bruker Molecular Imaging (BMI) y OriginPro 2024.

4.8.1 Imagen Molecular Fluorescente

Para el procesamiento del 2-DG-IRDye800CW se definieron regiones de interés (ROI) sobre la silueta cardíaca, empleando la imagen de reflectancia como base para delimitar el margen del corazón sobre la imagen de luminiscencia, que contiene la intensidad de los fotones registrados. En cada corazón se trazó la ROI al menos cinco veces; con estos valores se calcularon el promedio y la desviación estándar. Para mejorar la visualización de las regiones de mayor intensidad, la escala predeterminada "Gray scale" se sustituyó por "Rainbow", con límites de intensidad de captación de (4,669,000 a 23,800,000 P/s/mm^2), aplicados de forma uniforme a todas las imágenes del 2-DG. Para la presentación de las imágenes se utilizó la herramienta "Mask", que elimina el fondo externo y conserva únicamente la captación dentro de las ROI; las imágenes se exportaron en formatos .bmp, .png y .tif, con ajustes estéticos que no alteraron los valores numéricos de captación.

Para el análisis cuantitativo, la herramienta "Análisis" del BMI proporcionó la intensidad media del flujo (Mean P/s/mm^2). El programa calcula la intensidad de cada ROI mediante la conversión digital de los electrones generados en cada píxel del sensor CCD al incidir los fotones, con una conversión calibrada de la señal; posteriormente suma, promedia y normaliza los valores según el tiempo de adquisición y el área de la ROI. El flujo de fotones (P/s/mm^2) se describe mediante la ecuación 4:

$$\text{Mean P/s/mm}^2 = \frac{(Cuentas\ en\ la\ ROI - Fondo) \times K}{t \times A \times \eta} \qquad (4)$$

donde K es el factor de calibración específico del sistema, que convierte la señal electrónica (cuentas) en unidades físicas de luz (fotones); t es el tiempo de exposición en segundos, que elimina el efecto del brillo por exposición prolongada; A es el área física de la ROI en mm², que compensa el tamaño de la región analizada; y η es el factor de apertura y binning, que ajusta el valor según la apertura del lente y la agrupación de píxeles, de modo que una imagen tomada en f/1 sea comparable con una en f/8.

4.8.2 Imagen Molecular Radioisotópica

El procesamiento de la imagen radioisotópica del ^{99m}Tc-iFAP siguió el mismo procedimiento descrito en la sección 4.8.1. Se definieron al menos cinco ROI por corazón sobre la silueta cardíaca, a partir de las

imágenes de reflectancia y luminiscencia del BMI, y se sustituyó la escala "Gray scale" por "Rainbow" para mejorar la visualización de las regiones de mayor intensidad. Los límites de intensidad de captación se fijaron entre (1,000 a 9,600 P/s/mm^2), aplicados a todos los grupos y tiempos (30 minutos, 3 y 24 horas). La función de análisis del BMI proporcionó la captación en flujo de fotones y, para la presentación, se empleó la herramienta "Mask" antes de exportar las imágenes en formatos .bmp, .png y .tif.

4.9 Modelo Biocinético

4.9.1 Porcentaje de Dosis Inyectada por Gramo de Tejido

El porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%I.D./g) se calculó con la ecuación 5:

$$\%\text{I. D./g} = \frac{(CPM_{netas})}{Cuentas\ totales\ inyectadas * masa\ órgano\ (g)} \times 100 \qquad (5)$$

donde

$$CPM_{netas} = CPM_{registradas} - CPM_{fondo}.$$

Las cuentas totales inyectadas se estimaron a partir de una muestra estándar conocida del radiofármaco, dividida entre la masa de dicha muestra y multiplicada por la masa de la dosis inyectada por ratón, según la ecuación 6:

$$Cuentas\ totales\ inyectadas = \frac{CPM_{estándar}}{masa\ estándar\ (g)} * masa\ inyectada\ (g) \qquad (6)$$

4.9.2 Porcentaje de Dosis Inyectada

En base a la metodología de la sección anterior “4.9.1 Porcentaje de Dosis Inyectada por Gramo de Tejido”, el porcentaje de dosis inyectada (%ID) se calculó mediante la ecuación 7:

$$\%\text{ID} = \frac{(CPM_{netas})}{Cuentas\ totales\ inyectadas} \times 100 \qquad (7)$$

4.10 Estimación Dosimétrica Interna (Formalismo MIRD)

Para cuantificar la energía depositada en el tejido cardíaco por la administración del ^{99m}Tc-iFAP, se realizó un análisis dosimétrico basado en el formalismo del Comité de Dosis de Radiación Interna Médica (MIRD). Este procedimiento integró la caracterización biocinética del radiofármaco, el modelado matemático del decaimiento de la actividad y la aplicación de factores de dosis específicos para ratones.

4.10.1 Caracterización de la Biocinética en el Corazón

Las curvas de actividad-tiempo del 99mTc-iFAP se ajustaron a funciones biexponenciales (ecuación 8), tanto para la biocinética (qh(t)) como la farmacocinética (Ah(t)), donde Ah(t) representa la actividad en el

tiempo. Los ajustes se construyeron a partir de los datos de captación miocárdica expresados en %I.D./g (obtenidos con la ecuación 5) para los tres tiempos de biodistribución (30 minutos, 3 y 24 horas), en el programa OLINDA/EXM versión 2.1 (Vanderbilt University, 2012), para obtener los coeficientes de la ecuación 8.

$$\mathrm{A\ (t)} = Ae^{-at} + Be^{-bt} \qquad (8)$$

4.10.2 Modelado Matemático e Integración Temporal

A partir de los coeficientes obtenidos con OLINDA/EXM, se construyó el modelo biocinético qh(t), sustitución en la ecuación 9:

$$\mathrm{qh\ (t)} = Ae^{-a_1 t} + Be^{-b_1 t} \qquad (9)$$

El modelo farmacocinético Ah(t) se obtuvo al multiplicar qh(t) por la función de decaimiento radiactivo $e^{-\lambda f \cdot t}$, donde λ_f es la constante de decaimiento físico del ^{99m}Tc (λ_f= 0.1155 h^{-1}), según la ecuación 10:

$$\mathrm{Ah\ (t)} = Ae^{-(a_1+0.1155)t} + Be^{-(b_1+0.1155)t} \qquad (10)$$

en la que (a_1+0.1155) y (b_1+0.1155) constituyen las constantes de decaimiento efectivas λ_e. Una vez obtenido Ah(t), se integró en el tiempo, de [0, +∞], para determinar la actividad acumulada, expresada en $\%\tilde{A}$(MBq·h), mediante la ecuación 11:

$$\tilde{A}\ (\mathrm{Bq \cdot seg/MBq}) = \frac{\%\tilde{A}(\mathrm{MBq * h})}{100} \times m(g) \times 3600 \times \frac{10^6}{MBq} \qquad (11)$$

donde $\%\tilde{A}$ es la actividad acumulada en unidades de %I.D./g., m (g) es la masa del corazón en gramos, 3600 es el factor de conversión de horas a segundos y 10^6 el factor de conversión de MBq en Bq.

4.10.3 Cálculo de la Dosis Absorbida

Conforme al esquema MIRD, la dosis absorbida media en el órgano blanco se calculó a partir de la actividad acumulada (Ã) y del factor de dosis geométrico específico (S). Dicho factor S (1.48×10^{-5} mGy/MBq·s), correspondiente al modelo murino de 25 g, se obtuvo directamente de la base de datos interna de OLINDA/EXM versión 2.1 (Vanderbilt University, 2012), según la ecuación 12:

$$\mathrm{D\ (Gy/MBq)} = \tilde{A}\ (\mathrm{Bq \cdot seg/MBq}) \times S\left(\frac{Gy}{Bq \cdot seg}\right) = \tilde{A}\ (\mathrm{Bq \cdot seg}) \times\ 1.48 \times 10^{-14} \qquad (12)$$

4.11 Análisis Estadístico ANOVA

El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con el programa OriginPro 2024. Los datos se presentan como media ± desviación estándar (SD). El umbral de significancia se fijó en α = 0.05, de modo que se consideraron estadísticamente

significativos los resultados con $p < 0.05$. El análisis se aplicó a los datos de captación miocárdica de 2-DG-IRDye800CW (flujo de fotones por imagen molecular) y de ^{99m}Tc-iFAP (flujo de fotones, %I.D./g y %ID), así como al perfil farmacocinético sanguíneo (%I.D./g).

4.12 Límite de Tiempo, Infraestructura y Apoyo Técnico Disponible

Para el desarrollo del trabajo experimental, se contó con un laboratorio de Neuroinmunoendocrinología y el espacio de bioterio de la Facultad de Medicina (UAEMéx) Paseo Tollocan esquina Jesús Carranza s/n, Col. Moderna de La Cruz, C. P. 50180 Toluca de Lerdo, Estado de México, a partir de Marzo de 2025 a Septiembre de 2025. Para la fase de la administración de los trazadores, obtención de muestras, adquisición de imagen molecular y biocinética, a partir del 23 a 26 de Septiembre de 2025; el procesamiento y análisis de resultados de Octubre de 2025 a Mayo de 2026, realizados en el Laboratorio Nacional de Investigación y Desarrollo de Radiofármacos (Lanider) del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) C.P. 52750, Ocoyoacac, Estado de México, México.

4.13 Cronograma de Actividades

El calendario de actividades se presenta en el Anexo 1. Calendario de actividades.

4.14 Diseño de Análisis

El presente estudio es de tipo experimental y cuantitativo. Se evaluaron las diferencias en la captación de los radiofármacos y los resultados de los cálculos dosimétricos (formalismo MIRD) para determinar el efecto cardioprotector de la astaxantina en el modelo murino. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey, para identificar las diferencias significativas en la biodistribución entre los grupos experimentales, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

4.15 Implicaciones Bioéticas

Todos los procedimientos con animales se realizaron con estricto apego a las regulaciones nacionales e internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio, conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 ("Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio"). El protocolo fue revisado y aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEMéx. Se adoptaron todas las medidas necesarias para minimizar el sufrimiento y el número de animales utilizados, y el diseño de los dispositivos de restricción evitó causar lesiones físicas.

4.16 Diagrama de flujo metodológico experimental (Figura 7)

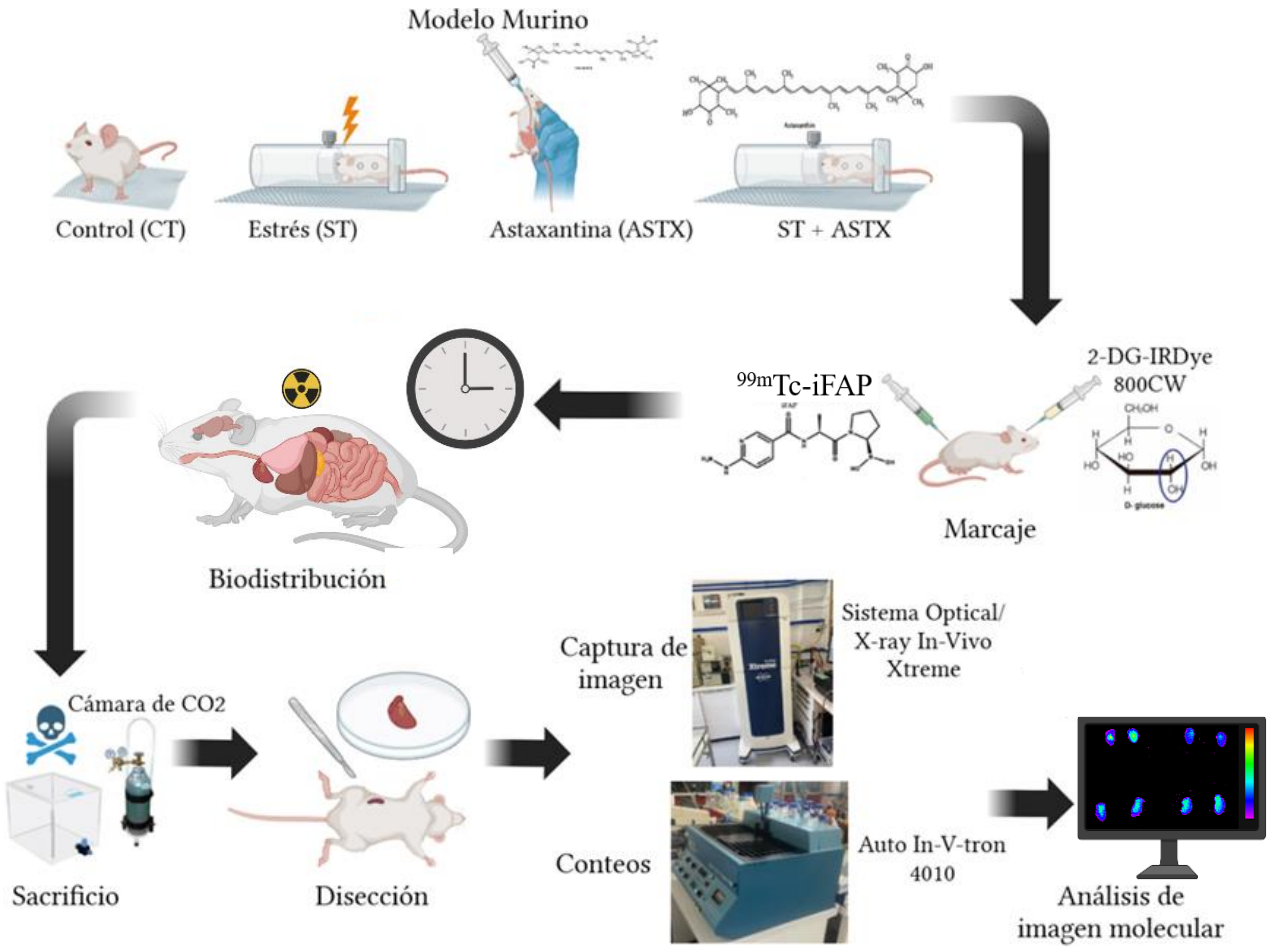


Figura 7. **Diagrama de flujo del protocolo metodológico experimental**. Representación secuencial de las fases operativas del proyecto de investigación. El proceso inicia con la consolidación del modelo murino (32 ratones macho CD1) y su distribución aleatoria en las cuatro cohortes de estudio: Control (CT), Estrés Crónico (ST), Astaxantina (ASTX) y Estrés suplementado con Astaxantina (ST+ASTX). Se detalla el periodo de intervención crónica de seis meses, induciendo estrés por restricción (CRS) y la suplementación oral (5 mg/kg). Posteriormente, la administración intravenosa de la sonda fluorescente 2-DG-IRDye800CW y el radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP, seguida de los periodos de biodistribución establecidos. El esquema culmina con los procedimientos ex vivo: eutanasia en cámara de CO_2, disección de órganos y la adquisición de datos crudos mediante el sistema multimodal Bruker In-Vivo Xtreme y el contador de pozo Auto In-V-tron 4010, permitiendo el procesamiento final de imágenes y la cuantificación estadística de la captación miocárdica.

Capítulo 5: Resultados y Discusión

5.1 Resultados

5.1.1. Evaluación Metabólica del Miocardio por Imagen Molecular (2DG-IRDye800CW)

Conforme al procedimiento descrito en la sección 4.8.1, se cuantificó la entrada de glucosa al miocardio mediante la señal de fluorescencia registrada por el sistema Bruker In-Vivo Xtreme. La Figura 8 presenta las imágenes moleculares del corazón junto con su referencia anatómica; la escala de color indica los niveles de captación de la sonda 2-DG-IRDye800CW, expresados como intensidad de flujo de fotones (P/s/mm^2). Esta intensidad es proporcional a la entrada de glucosa al tejido y permite inferir de forma indirecta la vía metabólica predominante: los niveles regulares de glucosa se asocian a mayor intensidad, mientras que una mayor inclinación hacia la síntesis de ácidos grasos (peroxidación lipídica) se traduce en menor intensidad de señal.

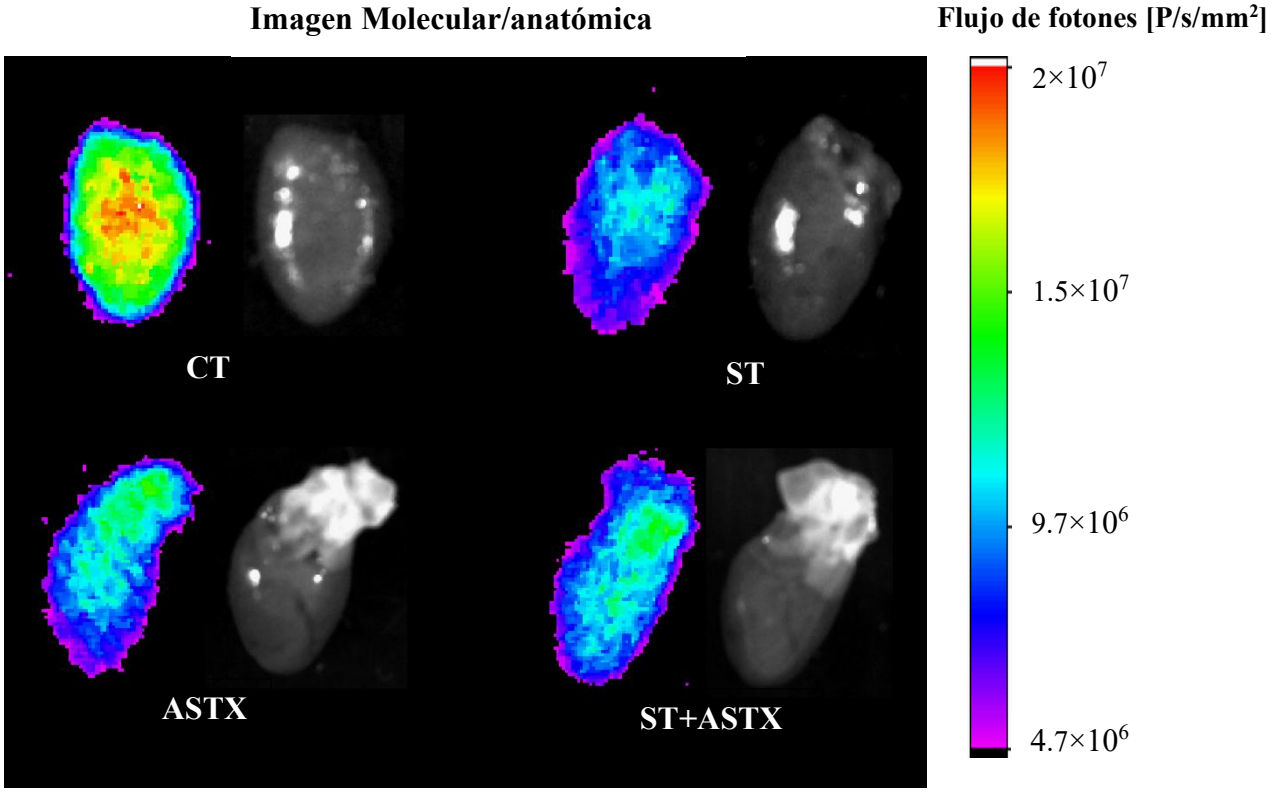


Figura 8. **Imagen molecular ex vivo de la captación miocárdica de 2-DG-IRDye800CW**. Se presentan las imágenes de fluorescencia de los corazones correspondientes a los cuatro grupos experimentales: Control (CT), Estrés Crónico (ST), Astaxantina (ASTX) y Estrés suplementado con Astaxantina (ST+ASTX) tras un tiempo de biodistribución de 3 horas. La intensidad de la señal se representa mediante una escala de pseudocolor que cuantifica el flujo medio de fotones (P/s/mm^2). Una mayor intensidad (tendencia al rojo) indica una captación basal o preservada de glucosa, mientras que una menor intensidad (tendencia al violeta) evidencia la reducción en la entrada de glucosa inducida por el estrés crónico.

El análisis cuantitativo de la señal (Figura 9) evidenció diferencias en la intensidad media entre los cuatro grupos experimentales. El grupo Control (CT) registró la mayor intensidad (9,785,408 ± 239,304 P/s/mm^2) y el grupo sometido a Estrés Crónico (ST) la menor (7,197,199 ± 65,708 P/s/mm^2). Los grupos suplementados con astaxantina preservaron la captación de glucosa en niveles cercanos al grupo CT, el grupo ASTX con valores de (8,997,431 ± 77,256 P/s/mm^2) y el grupo ST+ASTX con valores de (8,056,198 ± 139,584 P/s/mm^2).

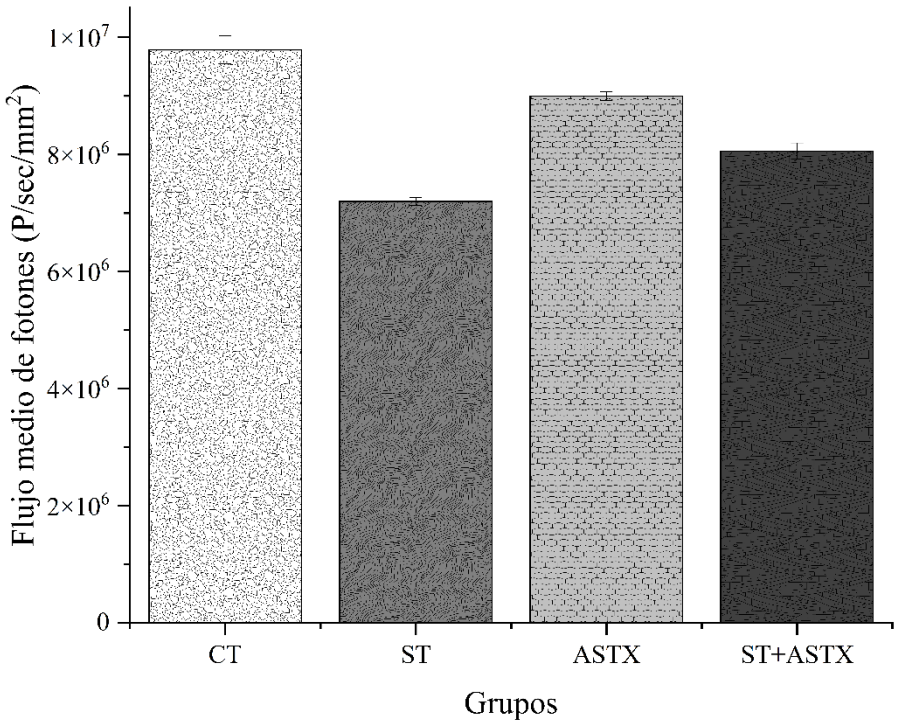


Figura 9. **Cuantificación del flujo de fotones de la captación de 2-Deoxi-Glucosa en miocardio**. Se presenta la intensidad media de señal (P/s/mm2) en las regiones de interés (ROI) de la silueta cardíaca utilizando la sonda fluorescente 2-DG-IRDye800CW a las 3 horas de biodistribución. Se comparan los grupos: Control (CT), Estrés Crónico por Restricción (ST), Astaxantina (ASTX) y Estrés suplementado con Astaxantina (ST+ASTX). Las barras representan la media y las líneas de error indican la desviación estándar (SD). Los resultados demuestran una disminución de la captación de glucosa inducida por el estrés crónico, efecto que es limitado por la suplementación con astaxantina al mantener niveles semejantes al grupo control.

Para evaluar la significancia de estas diferencias se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) univariado de muestras independientes, donde se incluye: el Valor F, representa la razón de varianzas (la variabilidad entre los grupos respecto a la variabilidad interna o residual); el indicador Prob > F, denota el valor de probabilidad (p) asociado a dicho estadístico bajo la hipótesis nula, tomando como criterio de decisión un

nivel de significancia (α = 0.05); el coeficiente de determinación (R^2) y de los valores de probabilidad ajustada de la prueba post-hoc de Tukey (Tabla 5). El modelo global no alcanzó significancia estadística (p = 0.39). Ninguna de las comparaciones por pares resultó significativa.

Tabla 5. ANOVA y Tukey de la captación en miocardio de 2-DG-IRDye800CW (3 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
1.28055	0.39473	0.4899	0.05	ST vs CT	0.90859
				ASTX vs CT	0.75445
				ASTX vs ST	0.44258
				ST+ASTX vs CT	0.88773
				ST+ASTX vs ST	0.99992
				ST+ASTX vs ASTX	0.4199

5.1.2 Evaluación de Inflamación/Fibrosis (^{99m}Tc-iFAP)

Esta evaluación se sustentó en dos análisis independientes: imagen molecular mediante el sistema Bruker In-Vivo Xtreme (sección 4.8.2) y biocinética mediante el contador de pozo Auto In-V-tron 4010 (sección 4.9.1).

5.1.2.1 Captación por Imagen Molecular

Se cuantificó la señal de radioluminiscencia del ^{99m}Tc-iFAP en las regiones de interés (ROI) trazadas sobre la silueta cardíaca. La Figura 10 muestra la evolución temporal de la captación en los cuatro grupos a los 30 minutos, 3 horas y 24 horas post-inyección; la cuantificación correspondiente se presenta en la Figura 11.

Fase temprana (30 min). El grupo CT presentó el flujo de fotones más elevado (7,082.3 ± 1,079 P/s/mm^2), seguido por ST (4,692.0 ± 401 P/s/mm^2), ST+ASTX (4,365.4 ± 413 P/s/mm^2) y ASTX (3,546.1 ± 197 P/s/mm^2). El ANOVA univariado alcanzó significancia estadística (p = 0.03). La prueba de Tukey identificó como significativo únicamente el contraste ASTX vs. CT (p = 0.03); y una tendencia en el contraste ST+ASTX vs. CT se situó por encima del umbral (p = 0.07) (Tabla 6).

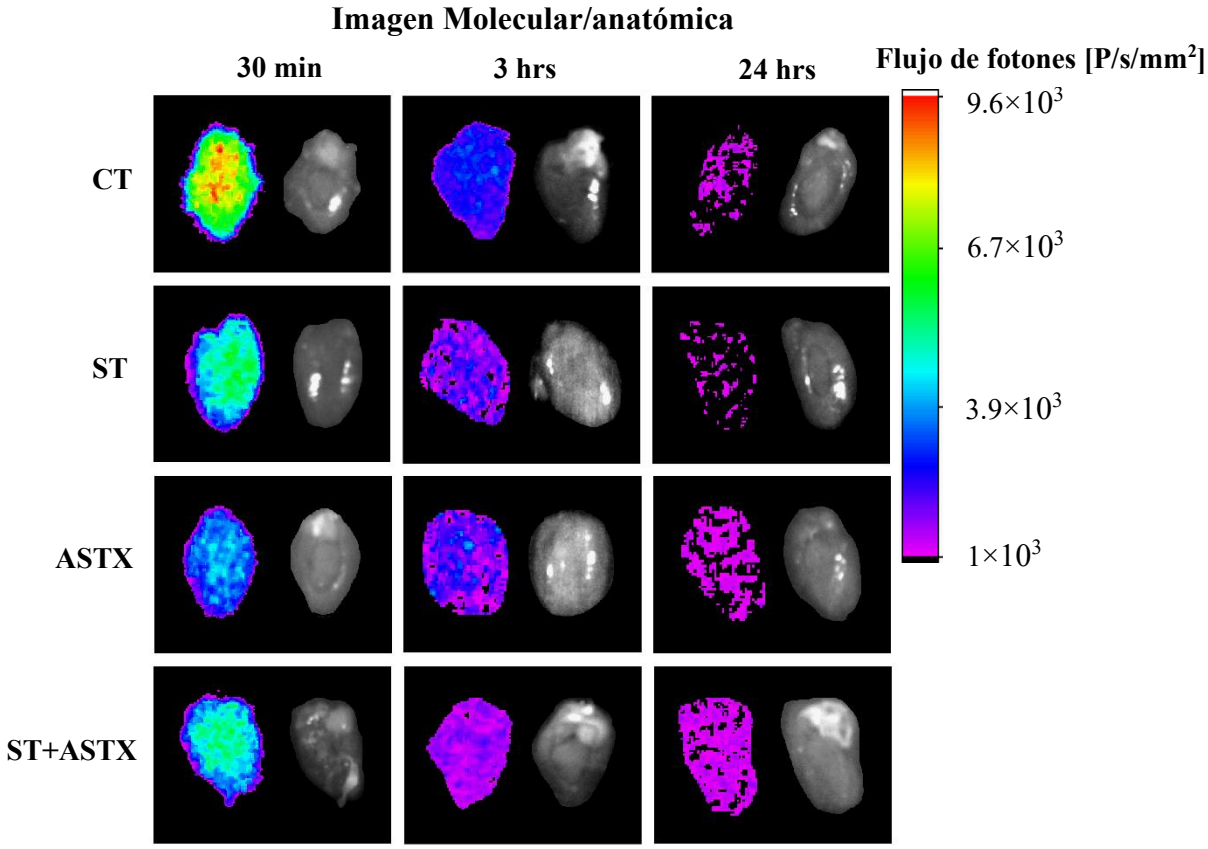


Figura 10. **Evolución temporal de la captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular**. Se presentan las imágenes de radioluminiscencia ex vivo de los corazones correspondientes a los cuatro grupos experimentales: Control (CT), Estrés Crónico (ST), Astaxantina (ASTX) y Estrés suplementado con Astaxantina (ST+ASTX) en tres tiempos de biodistribución (30 min, 3 h y 24 h). La intensidad de la señal se visualiza mediante una escala de pseudocolor (Rainbow) calibrada en flujo de fotones (P/s/mm^2), donde las tonalidades hacia el rojo indican una mayor densidad de activación de fibroblastos.

Tabla 6. ANOVA y Tukey de la captación de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular (30 min).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
8.13083	0.03542	0.85912	0.05	ST vs CT	0.11535
				ASTX vs CT	0.03114
				ASTX vs ST	0.46235
				ST+ASTX vs CT	0.07196
				ST+ASTX vs ST	0.94447
				ST+ASTX vs ASTX	0.72093

Fase intermedia (3 h). Se registró una atenuación global de la señal en todos los grupos. El grupo CT mantuvo la mayor intensidad (2,615.5 ± 166 P/s/mm^2), seguido de ASTX (1,988.9 ± 109 P/s/mm^2), ST (1,864.3 ± 125 P/s/mm^2) y ST+ASTX (1,583.4 ± 28 P/s/mm^2). El ANOVA confirmó diferencia significativa ($p = 0.005$). La prueba de Tukey identificó diferencias significativas en ST vs. CT ($p = 0.01$), ASTX vs. CT ($p = 0.02$) y ST+ASTX vs. CT ($p = 0.004$) (Tabla 7).

Tabla 7. ANOVA y Tukey de la captación de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular (3 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
22.847	0.0056	0.94486	0.05	ST vs CT	0.0125
				ASTX vs CT	0.02612
				ASTX vs ST	0.6826
				ST+ASTX vs CT	0.00484
				ST+ASTX vs ST	0.39411
				ST+ASTX vs ASTX	0.13154

Fase final (24 h). Los grupos CT y ST presentaron valores próximos entre sí (1,069.75 ± 62 P/s/mm^2 y 936.2 ± 0.53 P/s/mm^2, respectivamente), mientras que los grupos suplementados registraron una retención mayor: ASTX (1,139.9 ± 20 P/s/mm^2) y ST+ASTX (1,244.5 ± 9 P/s/mm^2). El ANOVA reveló diferencia significativa ($p = 0.003$). La prueba de Tukey identificó diferencias significativas en ASTX vs. ST ($p = 0.01$), ST+ASTX vs. CT ($p = 0.01$) y ST+ASTX vs. ST ($p = 0.002$); y con tendencia en el contraste ST+ASTX vs. ASTX encima del umbral ($p = 0.08$) (Tabla 8).

Tabla 8. ANOVA y Tukey de la captación de ^{99m}Tc-iFAP por imagen molecular (24 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
30.7961	0.00318	0.9585	0.05	ST vs CT	0.16107
				ASTX vs CT	0.12374
				ASTX vs ST	0.01566
				ST+ASTX vs CT	0.01053
				ST+ASTX vs ST	0.0028
				ST+ASTX vs ASTX	0.08792

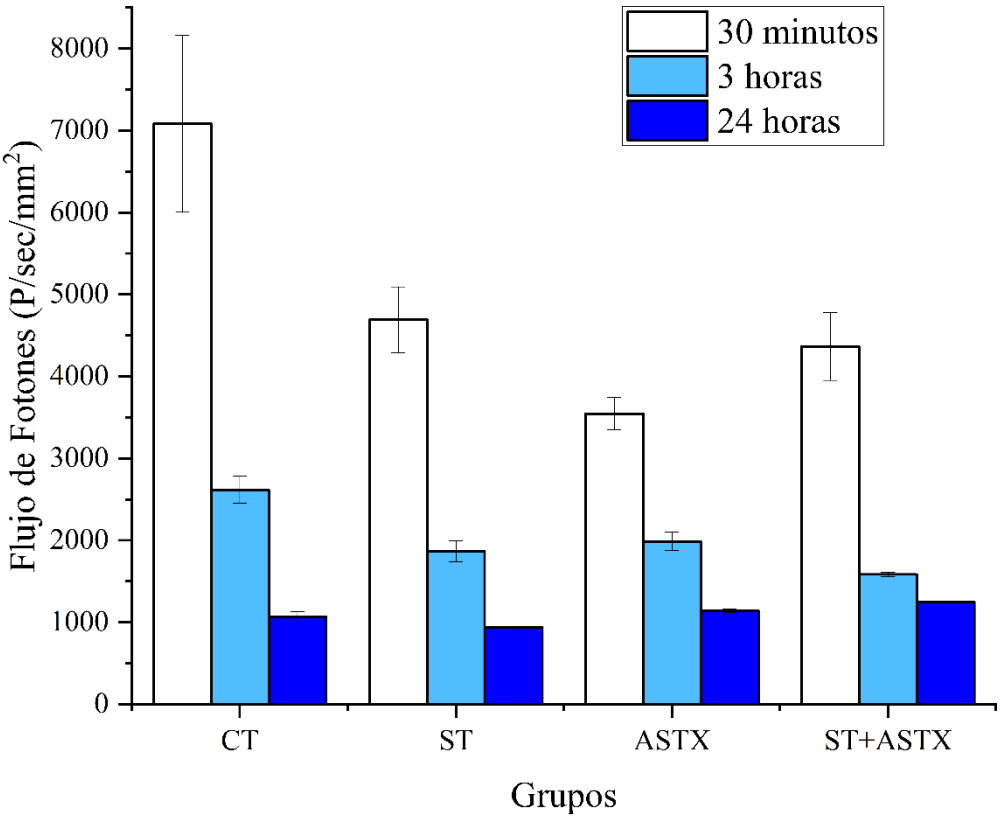


Figura 11. **Cuantificación del flujo medio de fotones del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio**. Análisis comparativo de la señal de radioluminiscencia captada en las regiones de interés (ROI) de la silueta cardíaca. Las barras representan la intensidad media del flujo de fotones (P/s/mm^2) para cada grupo experimental en los diferentes tiempos de biodistribución (30 min, 3 h y 24 h). Se observa una marcada disminución de la señal entre los 30 min y las 24 h, reflejando la cinética de eliminación del radiofármaco y la retención específica vinculada a la expresión de la proteína FAP. Las líneas de error indican la desviación estándar (SD).

5.1.2.2 Captación en Corazón por Biocinética (%I.D./g)

La cuantificación biocinética del ^{99m}Tc-iFAP se realizó en tres puntos temporales conforme a la Ecuación 5, expresando la captación como porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (Figura 12).

Fase temprana (30 min). El grupo CT registró la captación más elevada (0.716 ± 0.07 %I.D./g), seguido de ASTX (0.276 ± 0.02 %I.D./g), ST (0.265 ± 0.01 %I.D./g) y ST+ASTX (0.229 ± 0.02 %I.D./g). El modelo global no alcanzó significancia estadística ($p = 0.07$); ninguna comparación por pares resultó significativa (Tabla 9).

Tabla 9. ANOVA y Tukey de biocinética (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (30 min).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
94.65127	0.07538	0.99649	0.05	ST vs CT	0.08803
				ASTX vs CT	0.07811
				ASTX vs ST	0.97854
				ST+ASTX vs CT	0.08152
				ST+ASTX vs ST	0.76708
				ST+ASTX vs ASTX	0.60956

Fase intermedia (3 h). Todos los grupos mostraron una disminución de la captación. El grupo CT permaneció como el de mayor valor (0.551 ± 0.05 %I.D./g), seguido de ASTX (0.180 ± 0.02 %I.D./g), ST (0.161 ± 0.01 %I.D./g) y ST+ASTX (0.118 ± 0.01 %I.D./g). El ANOVA alcanzó significancia estadística ($p = 0.04$). La prueba de Tukey identificó como significativo el contraste ST+ASTX vs. CT ($p = 0.04$); y con tendencia a los contrastes ST vs. CT ($p = 0.056$) y ASTX vs. CT ($p = 0.059$) se situaron marginalmente por encima del umbral (Tabla 10).

Tabla 10. ANOVA y Tukey de la biocinética (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (3 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
249.15947	0.04653	0.99866	0.05	ST vs CT	0.05662
				ASTX vs CT	0.05949
				ASTX vs ST	0.78914
				ST+ASTX vs CT	0.04416
				ST+ASTX vs ST	0.41008
				ST+ASTX vs ASTX	0.2965

Fase final (24 h). Los niveles de captación descendieron y se aproximaron entre sí. El grupo ASTX presentó la mayor retención (0.095 ± 0.02 %I.D./g), seguido de ST (0.063 ± 0.01 %I.D./g), ST+ASTX (0.038 ± 0.003 %I.D./g) y CT (0.020 ± 0.002 %I.D./g). El ANOVA no alcanzó significancia estadística ($p = 0.15$) y la prueba de Tukey no identificó diferencias significativas entre grupos (Tabla 11).

Tabla 11. ANOVA y Tukey de la biocinética (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (24 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
5.46129	0.15866	0.89121	0.05	ST vs CT	0.48113
				ASTX vs CT	0.17311
				ASTX vs ST	0.56134
				ST+ASTX vs CT	0.82818
				ST+ASTX vs ST	0.70385
				ST+ASTX vs ASTX	0.19722

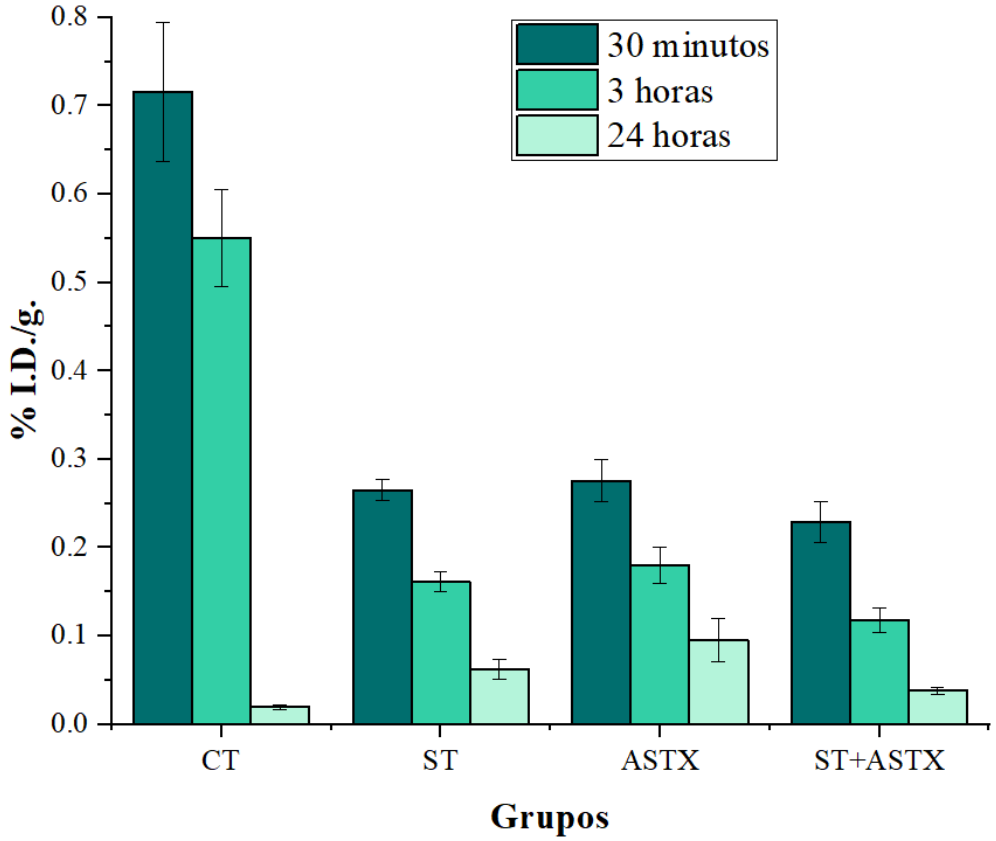


Figura 12. **Captación miocárdica de ^{99m}Tc-iFAP por biocinética (%I.D./g)**. Análisis comparativo de la biodistribución del radiofármaco en el corazón a los 30 min, 3 h y 24 h post-inyección. Se observa que el grupo estrés y suplementado con astaxantina (ST+ASTX) mantiene niveles más bajos que su contra parte el grupo estresado (ST) a los 30 min y 3 h. A las 24 h el grupo ST es superior al grupo control (CT) y al grupo ST+ASTX. Las barras representan la media ± SD.

5.1.2.3 Captación en Corazón por Biocinética (%ID)

En base a porcentaje de dosis total inyectada (%ID) en el miocardio, se tiene otra perspectiva en la captación, esta considera la afinidad neta del radiofármaco en el órgano completo, debido a que entra como variable dependiente tanto el tamaño como masa total. Los resultados (Figura 13) procesados en base a la (Ecuación 7, sección 4.9.2).

Fase temprana (30 min). El grupo CT presentó el valor más elevado (0.116 ± 0.008 %ID), seguido de ST (0.064 ± 0.004 %ID), ST+ASTX (0.062 ± 0.002 %ID) y ASTX (0.059 ± 0.006 %ID). El ANOVA no alcanzó significancia estadística (p = 0.16) y la prueba de Tukey no identificó diferencias entre grupos (Tabla 12).

Tabla 12. ANOVA y Tukey de la biocinética total (%ID) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (30 min).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
20.18179	0.16186	0.98375	0.05	ST vs CT	0.19805
				ASTX vs CT	0.15591
				ASTX vs ST	0.88518
				ST+ASTX vs CT	0.19235
				ST+ASTX vs ST	0.99699
				ST+ASTX vs ASTX	0.9459

Fase intermedia (3 h). El grupo CT registró el valor más alto (0.137 ± 0.002 %ID), seguido de ASTX (0.045 ± 0.004 %ID), ST (0.037 ± 0.003 %ID) y ST+ASTX (0.034 ± 0.003 %ID). El modelo global no alcanzó significancia formal (p = 0.0514), si bien la prueba de Tukey identificó como significativo el contraste ST+ASTX vs. CT (p = 0.049); los contrastes ST vs. CT (p = 0.059) y ASTX vs. CT (p = 0.064) se situaron marginalmente por encima del umbral (Tabla 13).

Tabla 13. ANOVA y Tukey de la biocinética total (%ID) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (3 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
				ST vs CT	0.05947
				ASTX vs CT	0.06441

203.53897	0.05147	0.99836	0.05	ASTX vs ST	0.6299
				ST+ASTX vs CT	0.04993
				ST+ASTX vs ST	0.88242
				ST+ASTX vs ASTX	0.43433

Fase final (24 h). El grupo ST presentó la mayor captación (0.016 ± 0.001 %ID), seguido de ASTX (0.014 ± 0.005 %ID), ST+ASTX (0.009 ± 0.0003 %ID) y CT (0.006 ± 0.001 %ID). El ANOVA no alcanzó significancia estadística (p = 0.35) y la prueba de Tukey no identificó diferencias entre grupos (Tabla 14).

Tabla 14. ANOVA y Tukey de la biocinética total (%ID) del ^{99m}Tc-iFAP en miocardio (24 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
1.97644	0.35337	0.74777	0.05	ST vs CT	0.39965
				ASTX vs CT	0.42819
				ASTX vs ST	0.96965
				ST+ASTX vs CT	0.83542
				ST+ASTX vs ST	0.56397
				ST+ASTX vs ASTX	0.63317

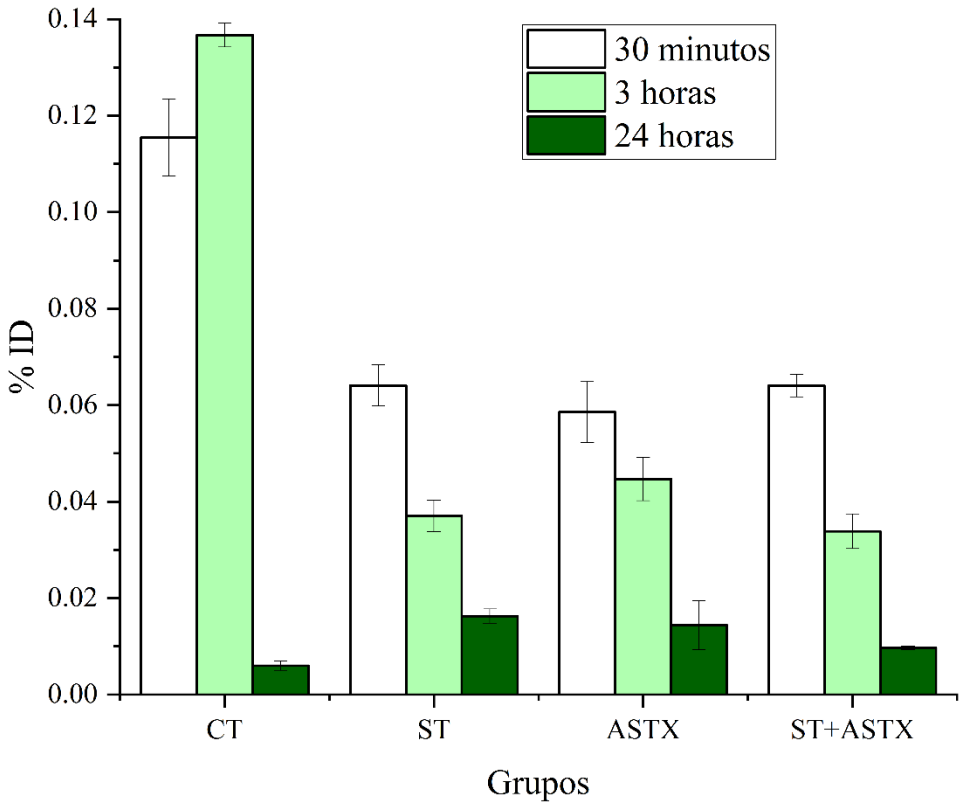


Figura 13. **Captación total en miocardio de ^{99m}Tc-iFAP por biocinética (%ID)**. Comparativa de intensidades de captación total de radiofármaco en el corazón a los 30 min, 3 h y 24 h post-inyección. A 30 min tanto el grupo estrés (ST) como el grupo estresado y suplementado con astaxantina (ST+ASTX) tienen el mismo nivel de captación y el grupo suplementado con astaxantina (ASTX) está muy cerca de los mismos niveles. A las 3 h el grupo ST es superior al grupo ST+ASTX. A las 24 h el grupo ST+ASTXS presenta relativamente mucha menos concentración que el grupo ST. Las barras representan la media ± SD.

5.1.3 Captación en Sangre por Biocinética (%I.D./g)

Se procesaron las muestras sanguíneas conforme a la Ecuación 5 con el fin de caracterizar el comportamiento del radiofármaco en el sistema circulatorio (Figura 14).

30 minutos. La concentración sanguínea fue mayor en el grupo CT (1.534 ± 0.11 %I.D./g), seguido de ST (0.751 ± 0.06 %I.D./g), ST+ASTX (0.658 ± 0.04 %I.D./g) y ASTX (0.445 ± 0.06 %I.D./g). El ANOVA no alcanzó significancia estadística (p = 0.091) y la prueba de Tukey no identificó diferencias entre grupos (Tabla 15).

Tabla 15. ANOVA y Tukey de la biocinética en sangre (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP (30 min).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
63.4403	0.09197	0.99477	0.05	ST vs CT	0.13573
				ASTX vs CT	0.08485
				ASTX vs ST	0.29133
				ST+ASTX vs CT	0.12142
				ST+ASTX vs ST	0.78112
				ST+ASTX vs ASTX	0.40408

3 horas. Los grupos no suplementados presentaron un incremento significativo de la concentración sanguínea: CT (11.943 ± 0.94 %I.D./g) y ST (10.310 ± 0.76 %I.D./g). En contraste, los grupos suplementados mantuvieron valores significativamente menores: ASTX (0.148 ± 0.05 %I.D./g) y ST+ASTX (0.128 ± 0.02 %I.D./g). El ANOVA alcanzó significancia estadística (p = 0.0029). La prueba de Tukey identificó diferencias significativas en ST vs. CT (p = 0.02), ASTX vs. CT (p = 0.003), ASTX vs. ST (p = 0.004), ST+ASTX vs. CT (p = 0.003) y ST+ASTX vs. ST (p = 0.003) (Tabla 16).

Tabla 16. ANOVA y Tukey de la biocinética en sangre (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP (3 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
62143.6514	0.00295	0.99999	0.05	ST vs CT	0.02819
				ASTX vs CT	0.0039
				ASTX vs ST	0.00453
				ST+ASTX vs CT	0.00337
				ST+ASTX vs ST	0.00391
				ST+ASTX vs ASTX	0.92835

24 horas. Se registró una depuración casi total del radiofármaco en el torrente sanguíneo, evidenciada mediante la captación: el grupo CT presentó el valor más alto (0.089 ± 0.001 %I.D./g), seguido de ST+ASTX (0.029 ± 0.003 %I.D./g), ST (0.005 ± 0.001 %I.D./g) y ASTX (0.003 ± 0.001 %I.D./g). El ANOVA no alcanzó significancia estadística (p = 0.31) y la prueba de Tukey no identificó diferencias entre grupos (Tabla 17).

Tabla 17. ANOVA y Tukey de la biocinética en sangre (%I.D./g) del ^{99m}Tc-iFAP (24 h).

Valor F	Prob > F	R^2	α	Comparación	Probabilidad (Tukey)
2.28572	0.3188	0.77419	0.05	ST vs CT	0.38038
				ASTX vs CT	0.30146
				ASTX vs ST	0.99993
				ST+ASTX vs CT	0.48187
				ST+ASTX vs ST	0.89318
				ST+ASTX vs ASTX	0.80573

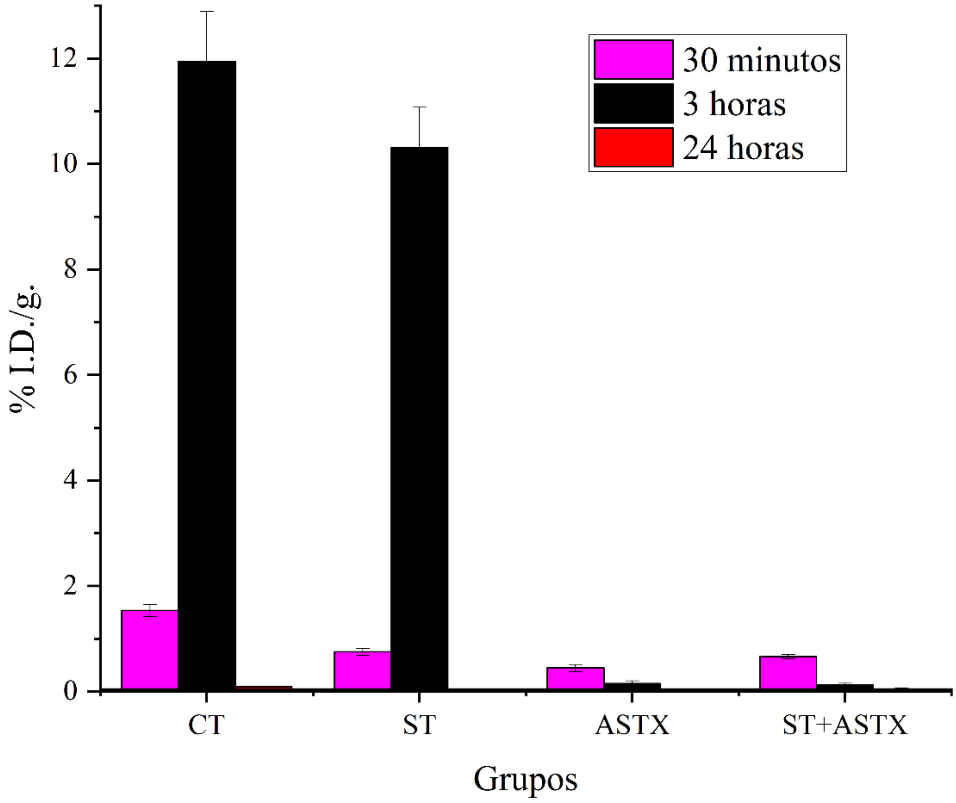


Figura 14. ***Captación sanguínea de ^{99m}Tc-iFAP por biocinética (%I.D./g).*** Análisis comparativo de la biodistribución del radiofármaco en sangre a 30 min, 3 h y 24 h post-inyección. Se observa que tanto el grupo control (CT) y el grupo estresado (ST) mantienen mayor nivel de captación en los tiempos de 30 min y 3 h, resaltando a 3 h donde esta captación es súbitamente mayor que los grupos suplementados con astaxantina. A las 24 h todos los grupos demuestran una eliminación muy similar.

5.1.4 Resultados de la Estimación Dosimétrica Interna (Formalismo MIRD)

El ajuste biexponencial del modelo biocinético (Figura 15) describe las curvas actividad-tiempo en el marco farmacocinético. La primera componente exponencial corresponde a la vía rápida de eliminación y la segunda a la vía lenta. A partir de estas curvas se calculó la dosis absorbida media en el miocardio (Tabla 18).

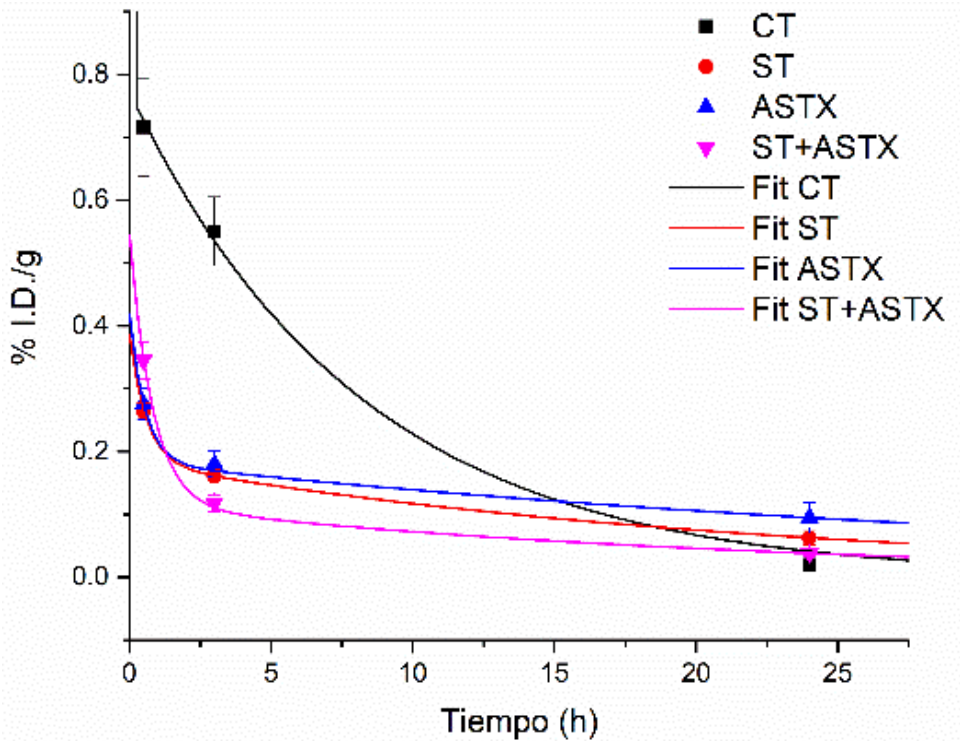


Figura 15. **Modelo biocinético de captación y eliminación de ^{99m}Tc-iFAP.** La gráfica ilustra la evolución temporal de la concentración de actividad expresada en porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (% I.D./g), a tiempos de 0.5, 3 y 24 horas post-inyección para los cuatro grupos experimentales. Los marcadores representan la media experimental ± la desviación estándar, mientras que las líneas continuas de color corresponden al ajuste biexponencial biocinético.

Tabla 18. Dosis absorbida y ajuste biexponencial biocinético-farmacocinético en corazón.

Grupos	**Biocinética, $q_h(t)$**	**Farmacocinética, $A_h(t)$**	**Dosis Absorbida (mGy/MBq)**
CT	$2.25\cdot e^{-37.4\cdot t}+0.772\cdot e^{-0.122\cdot t}$	$2.25\cdot e^{-37.5\cdot t}+0.772\cdot e^{-0.238\cdot t}$	$1.76\times10^{-3}\pm1.62\times10^{-4}$
ST	$0.202\cdot e^{-1.69\cdot t}+0.183\cdot e^{-0.0445\cdot t}$	$0.202\cdot e^{-1.81\cdot t}+0.183\cdot e^{-0.16\cdot t}$	$6.69\times10^{-4}\pm1.39\times10^{-4}$
ASTX	$0.236\cdot e^{-1.82\cdot t}+0.183\cdot e^{-0.0274\cdot t}$	$0.236\cdot e^{-1.94\cdot t}+0.183\cdot e^{-0.143\cdot t}$	$7.47\times10^{-4}\pm4.08\times10^{-5}$
ST+ASTX	$2\cdot e^{-1.2\cdot t}+0.125\cdot e^{-0.048\cdot t}$	$2\cdot e^{-1.3155\cdot t}+0.125\cdot e^{-0.1635\cdot t}$	$1.22\times10^{-3}\pm4.13\times10^{-5}$

Los periodos de semidesintegración efectivos (τ_e) derivados del ajuste biexponencial fueron, para la vía rápida y la vía lenta respectivamente: CT (1.1 min; 2.91 h), ST (24.6 min; 4.33 h), ASTX (21.43 min; 4.84 h) y ST+ASTX (31.61 min; 4.24 h).

En todos los grupos, la dosis absorbida media en el órgano blanco se mantuvo en el orden de los µGy por MBq administrado.

5.2 Discusión

Los resultados por imagen molecular y biocinética muestran dos resultados relevantes: 1. el estrés crónico reduce la entrada de glucosa al miocardio, principal biomarcador de alteraciones metabólicas; y 2. Altera la captación del radiofármaco dirigido a FAP, principal biomarcador de procesos profibróticos. Los resultados también dan evidencia que la suplementación con astaxantina ejerce una acción cardioprotectora de doble acción: regular los niveles de glucosa y atenuar la señal asociada a la activación de fibroblastos.

5.2.1 Alteraciones Metabólicas y Protección con Astaxantina

La reducción de la señal de 2-DG-IRDye800CW en el grupo ST representó una caída cercana al 26 % respecto del nivel basal del grupo CT. Esta disminución metabólica podría ser explicada biológicamente por la hipersecreción de glucocorticoides por la sobreactivación sostenida del eje HPA y su relación con estrés oxidativo. Se sabe que la exposición crónica a estas hormonas, promueve peroxidación lipídica y sobreproducción de especies reactivas de oxígeno, principalmente O_2- y ·OH derivados de la disfunción mitocondrial [18]. El exceso de ROS y la acumulación de intermediarios lipídicos tóxicos interfieren con la señalización de la insulina, lo que induce una resistencia a la insulina miocárdica, un estado que bloquea la vía de señalización necesaria para la translocación del transportador GLUT4 desde las vesículas intracelulares hacia el sarcolema [10, 13]. Adicionalmente, el exceso de glucocorticoides reprime a nivel transcripcional la expresión y actividad de enzimas clave de la glucólisis, particularmente la glucocinasa y la hexocinasa [12]. Por tanto, dado que la captación efectiva y el metabolismo de la glucosa dependen estrictamente de la entrada facilitada por GLUT4 y del atrapamiento citosólico inmediato mediante la fosforilación por la hexocinasa, y al tener esta doble inhibición justifica el colapso en la retención del trazador 2-DG. Esta restricción metabólica de glucosa, provoca una plasticidad energética en el miocardio para mantener su homeostasis, por tanto el corazón emplea ácidos grasos como única fuente de energía. En consecuencia, el aumento en la β-oxidación de ácidos grasos, desencadena peroxidación lipídica y agrava el estrés oxidativo [9]. Por otro lado, la preservación metabólica observada en el grupo ASTX y el grupo ST+ASTX, sugiere que la astaxantina reduce los efectos metabólicos del estrés y la resistencia a la insulina, lo que permite el mantenimiento de múltiples fuentes energéticas en el cardiomiocito. En los grupos suplementados mejoró la captación de glucosa, lo que respalda el papel de la astaxantina como regulador del metabolismo energético miocárdico. Una posible justificación es mediante su estructura química que le confiere extremos polares unidos por una cadena poliénica central, le permite atravesar la bicapa lipídica y proteger simultáneamente el interior y el exterior de la célula [16]. Conforme al marco teórico expuesto en el Capítulo 3, la astaxantina neutraliza las ROS generadas principalmente en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones [14, 16], con lo que restaura la sensibilidad a la insulina [4, 20]. Esta restauración favorece la translocación de GLUT4 y, por esta vía, reestablece el transporte de glucosa [10,

13], lo que en consecuencia reduce la dependencia y síntesis de ácidos grasos, atenuando la lipotoxicidad en miocardio [9, 12].

Sin embargo, el ANOVA correspondiente a esta variable no alcanzó significancia estadística. La causa más probable es el tamaño de muestra empleado en esta fase (n = 8; dos animales por grupo para el único tiempo evaluado con la sonda fluorescente), que limita la potencia del contraste. Pese a esta tendencia observada, este estudio abre la puerta a evaluar la respuesta del estrés en una cinética de tiempo, debido a que no existen estudios que lo evalúen, ya sea para el periodo de adaptación al estrés y de las respuestas consecuentes.

5.2.2 Activación de Fibroblastos (FAP)

La captación de ^{99m}Tc-iFAP permitió estimar la intensidad de expresión de FAP como indicador indirecto de fibrosis incipiente. Los resultados obtenidos tanto por imagen molecular como por biocinética presentaron la misma tendencia en resultados, por tanto, las conclusiones de tienen un respaldo más fuerte, dado que ambas miden retención específica en el tejido mediante principios de detección independientes.

Biológicamente, la FAP es una endopeptidasa que se sobreexpresa de manera temprana en fibroblastos activados durante daño al miocárdico, lo que provoca la deposición masiva de colágeno tipos I y III [21, 22]. Bajo condiciones de estrés crónico, la sobrecarga alostática y el exceso de ROS activan factores de transcripción proinflamatorios (como NF-κB) y estimulan la secreción de citocinas profibróticas, destacando el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) [18, 19]. Este conjunto de señalizaciones induce la transición de los fibroblastos residentes hacia un fenotipo fibrótico activo que altera la arquitectura del miocardio.

En la *fase de captación temprana (30 minutos)*, los grupos no suplementados concentraron los valores más altos, lo que sugiere la expresión basal de FAP mayor en condiciones fisiológicas normales. Los grupos suplementados presentaron consistentemente los valores más bajos por imagen molecular, y mostró diferencia estadística ($p < 0.05$). La biocinética coincide con la imagen molecular en identificar al grupo CT como el grupo de mayor captación, el cual marca la referencia en la expresión basal de FAP en un animal en condiciones normales. Aunque discrepa en el orden de los grupos intermedios: por biocinética, el grupo ASTX supera (aunque en magnitudes bajas) al grupo ST, con valores muy próximos entre sí. Estas diferencias en resultados son de esperarse, debido a que la imagen molecular da una proyección planar por el uso de cámara CCD, a diferencia de la biocinética que utiliza un contador de pozo que mide el volumen completo del órgano; pese a que el ANOVA en biocinética no fue significativa ($p = 0.07$), si muestra una tendencia para el contraste ASTX vs CT (0.07) y ST+ASTX vs CT (0.08), sin respaldo estricto, posiblemente la suplementación sí module la biodistribución del ^{99m}Tc-iFAP en condiciones de estrés crónico.

En *fase intermedia (3 horas)*, tanto la imagen molecular como la biocinética se redujo la captación de ^{99m}Tc-iFAP en el grupo ASTX+ST respecto al grupo ST, y ambas técnicas describen el mismo ordenamiento entre grupos y solo difieren en la magnitud absoluta.

Esta reducción podría sugerir que la astaxantina tiene la capacidad de inhibir la activación de fibroblastos por el estrés oxidativo. Por ejemplo, en el trabajo de Zhang y cols. (2017) [4], encontraron que la astaxantina atenúa la fibrosis miocárdica mediante la activación de la deacetilasa SIRT1, lo cual suprime la fosforilación de las proteínas SMAD2/3 mediada por TGF-β. Al bloquear esta vía de señalización, el carotenoide previene la diferenciación del fibroblasto, lo que se traduce in vivo en una menor disponibilidad de sitios de unión enzimática para el radiofármaco ^{99m}Tc-iFAP [25]. Adicionalmente, la inhibición de citocinas proinflamatorias como el TNF-α por parte de la astaxantina contribuye a frenar la retroalimentación entre inflamación y estrés oxidativo, limitando el remodelado adverso [19]. Para este tiempo, el ANOVA proporciono significancia estadística ($p < 0.05$) tanto en el análisis por imagen molecular como en el análisis biocinético, y en ambos casos el contraste ST+ASTX vs. CT resultó significativo según la prueba de Tukey, lo que indica que la suplementación modula la biodistribución del ^{99m}Tc-iFAP incluso bajo condiciones de estrés crónico.

Para la *fase final (24 horas)* el comportamiento ya no muestra el mismo patrón entre técnicas. Por imagen molecular la señal se normaliza en los grupos suplementados los cuales ligeramente una mayor captación trazador, mientras que el grupo con ST registra el valor más bajo. Estos relatados podrían deberse al efecto inmunosupresor agudo de los glucocorticoides, aunque el estrés haya sido crónico y debido a los efectos antiinflamatorios tardíos. Se ha documentado que, en ciertas etapas del estrés neuroendocrino, los glucocorticoides reprimen temporalmente citocinas profibróticas (TGF-β) y genes proinflamatorios, provocando una disminución transitoria en la activación de fibroblastos y de mecanismos de reparación celular [6, 30]. Esto sugiere que, a las 24 horas, la expresión de FAP en el grupo ST podría estar temporalmente suprimida por la acción hormonal, más que por una ausencia de daño subyacente. Por biocinética, en cambio, ST+ASTX mantiene niveles inferiores a ST, lo que sugiere que la acción cardioprotectora de la astaxantina persiste a largo plazo. A pesar de la discrepancia en la intensidad de captación del radiofármaco en tiempos determinados, entre los distintos grupos y por ambas técnicas, posiblemente se atribuya a la sensibilidad que tiene cada una. En tal caso, aunque los valores de magnitud muy bajos, se observa un comportamiento que tiende a recuperar su homeostasis o su estado basal. Sin embargo, queda abierta la siguiente interrogante, “si la expresión de FAP se incrementa más allá del punto de recuperación, en donde cesan los niveles de hormonas del estrés y sus efectos adversos”. En este caso, cuando desaparezca el efecto inmunosupresor, los procesos profibróticos podrían reanudarse con mayor magnitud respecto al grupo control. En consecuencia, esto podría explicar la fibrosis cardiaca. Por tal motivo se requieren estudios histopatológicos adicionales para comprobar esta premisa. Cabe mencionar

que la prueba de ANOVA alcanzó significancia en 24 horas ($p < 0.05$). La menor actividad del radiofármaco en el grupo ST+ASTX, concuerda con los resultados de imagen molecular y la biocinética. Esto sugiere que la astaxantina disminuye expresión de FAP y la respuesta inflamatoria. Por tanto, la suplementación prolongada con astaxantina modula efectivamente la actividad profibrótica incipiente en el miocardio bajo condiciones de estrés crónico, validando el uso diagnóstico del ^{99m}Tc-iFAP. Esta observación complementa la propiedad cardioprotectora descrita por Zhang y cols. (2017) [4] y es compatible con la prevención del ciclo de remodelado adverso caracterizado por Frangogiannis, 2021 [21].

5.2.3 Biocinética sanguínea

Respecto al análisis de la actividad del radiofármaco en sangre, esta cumple una función metodológica y biológica importante, ya que la actividad registrada en el miocardio se debe a la unión específica del ^{99m}Tc-iFAP a la proteína FAP en el tejido, y no a la contribución de radiofármaco sanguíneo. Conforme a los principios de la medicina nuclear diagnóstica, un radiofármaco requiere un aclaramiento sanguíneo eficiente para optimizar la relación señal-ruido y cumplir con el principio del trazador, garantizando que la actividad retenida refleje fielmente el proceso fisiopatológico [37]. El ^{99m}Tc-iFAP está diseñado específicamente para internalizarse de forma rápida en los fibroblastos activados con una mínima liberación o acumulación intersticial sobre el tejido circundante [22, 25].

A los 30 minutos y 3 horas, los grupos CT y ST mantuvieron una actividad de radiofármaco más elevada respecto a los grupos suplementados. El contraste más evidente se produjo a las 3 horas, donde la concentración de los grupos CT y ST superó en aproximadamente dos órdenes de magnitud en comparación con los grupos suplementados, los cuales presentaron niveles de captación significativamente más bajos. La prueba ANOVA mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) a las 3 horas. Dichos resultados indican que la astaxantina posiblemente acelera la depuración sanguínea del radiofármaco, suprimiendo por completo el pico de concentración circulante. Biológicamente, esta alteración en la farmacocinética puede atribuirse a las propiedades sistémicas del carotenoide. A diferencia de otros antioxidantes que se acumulan en órganos específicos, la astaxantina se absorbe, distribuye y atraviesa eficientemente las membranas celulares en el plasma y eritrocitos [16]. Además, se ha evidenciado que la astaxantina posee un efecto modulador sobre el perfil lipídico plasmático, reduciendo moléculas transportadoras como el colesterol total y LDL [20].

A las 24 horas el ordenamiento cambia: CT conserva la mayor concentración residual y ST+ASTX ocupa el segundo lugar, mientras que ST y ASTX descienden a los valores más bajos. Ninguno de estos resultados presento cambios estadísticamente significativos, por lo que a este tiempo hay una convergencia general hacia la depuración completa. A este tiempo prolongado, la actividad circulante resultó despreciable frente a la retenida en el miocardio. Este comportamiento complementa y respalda la especificidad de la señal descrita en la sección 5.1.2, asegurando de manera rigurosa que los niveles cuantificados en el corazón

correspondieron genuinamente a la formación del aducto covalente entre el inhibidor borónico del ^{99m}Tc-iFAP y la serina catalítica de la FAP tisular, descartando cualquier sesgo por ruido de fondo sanguíneo [25].

5.2.4 Estimación Dosimétrica e Impacto del Formalismo MIRD

La aplicación del formalismo MIRD permitió caracterizar el ^{99m}Tc-iFAP como agente de diagnóstico desde la perspectiva de la dosis absorbida, lo que a su vez cuantifica la energía depositada en el tejido (dosis absorbida media) a partir de la actividad acumulada integrando el área bajo la curva de actividad-tiempo y aplicando factores geométricos (valores S) específicos para las dimensiones del modelo murino [37, 40].

El grupo CT recibió la dosis media más alta, resultado consistente con haber presentado la mayor captación en los tiempos tempranos tanto por imagen molecular como por biocinética. Su perfil de eliminación combina una vía rápida muy pronunciada (τ_e = 1.1 min) con una vía lenta de 2.91 h. El grupo ST recibió la dosis más baja, aproximadamente una tercera parte de la del control, y su vía rápida resultó considerablemente más prolongada (τ_e = 24.6 min), con una vía lenta de 4.33 h. Esta ralentización en la fase inicial de depuración miocárdica y la menor retención de actividad en el grupo ST van de la mano con la modulación de los procesos de reparación celular, respaldando la hipótesis de que la inmunosupresión inducida por los niveles crónicos de glucocorticoides mitiga temporalmente la sobreexpresión de la FAP [6]. Por su parte, los grupos suplementados se situaron en posiciones intermedias, con vías rápidas de (τ_e = 21.43 min) para el grupo ASTX y (τ_e = 31.61 min) para el grupo ST+ASTX y vías lentas superiores a 4 h en ambos casos.

El τ_e en la vía rápida de los grupos ST, ASTX y ST+ASTX respecto del control es más largo e indica que la fase inicial de depuración desde el miocardio se ralentiza en estos animales, mientras que la vía lenta se prolonga de manera comparable entre ellos. Este comportamiento es consistente con las diferencias de captación descritas en la sección 5.2.2 y muestra que el método dosimétrico posee sensibilidad suficiente para distinguir variaciones farmacocinéticas inducidas tanto por el estado de estrés neuroendocrino como por la intervención protectora de la astaxantina.

Desde la perspectiva de la física médica, las dosis absorbidas medias se mantuvieron en el orden de los µGy por MBq administrado. Dado que esta magnitud de deposición de energía es subletal para el nivel celular, la contribución de la radiación ionizante resulta mínima, lo que descarta por completo la inducción de efectos deterministas, daño estructural o toxicidad adicional en el tejido miocárdico [37, 38]. Estos márgenes de radioprotección validan la factibilidad preclínica y la bioseguridad del ^{99m}Tc-iFAP como una herramienta diagnóstica molecular in vivo, idónea para el diagnóstico de cardiomiopatías y procesos incipientes de remodelado fibrótico [22, 25].

5.2.5 Hallazgos no anticipados

Tomando en cuenta que los resultados observados fueron contrarios a lo hipotetizado inicialmente, este comportamiento podría deberse a efecto de múltiples respuestas homeostáticas y su comportamiento a través del tiempo, lo contrasta con la complejidad de las respuestas neuroendocrinas. Se esperaba inicialmente que el grupo ST protagonizara los niveles más altos de captación del radiofármaco, bajo la premisa de que el estrés crónico induce activación de FAP y en consecuencia fibrosis por los efectos crónicos. Sin embargo, ST presentó captación inferior al CT en los tiempos tempranos. La posible explicación es que los niveles elevados de catecolaminas y glucocorticoides desencadenen mecanismos de contención inmediata: la inmunosupresión mediada por glucocorticoides reprime citocinas (TNF-α, IL-1α, IL-1β y TGF- β), genes proinflamatorios (NF-κB y AP-1) y hormonas como FGF21, reduciendo paralelamente el reclutamiento de macrófagos [30]. Ante esta situación, se produciría menor activación temprana de fibroblastos. A ello podría sumarse el incremento de antioxidantes no enzimáticos y de la actividad de la SOD miocárdica. En esta relación, en modelos aviares se ha documentado que el estrés crónico provoca un incremento compensatorio de antioxidantes no enzimáticos y de la actividad de SOD en el tejido [6]. Cabe mencionar que los radicales libres también ejercen efectos pleiotrópicos, como son los propios del estallido respiratorio por parte de los macrófagos [42], o pueden actuar como señalizadores que modulan la expresión de los sistemas antioxidantes endógenos, por ejemplo regulando la expresión del gen NFTR2 (NFE2L2) [43, 44].

Aunque los datos obtenidos a las 24 horas no confirman efectos adversos muy relevantes, tampoco se excluye que ocurran cambios tardíos que conlleven a un incremento del riesgo cardiovascular. Se debe recordar que las ECVs son la primera causa de muerte a nivel global. En este contexto, se requieren más estudios sobre la plasticidad metabólica del corazón bajo condiciones específicas, esto con la finalidad de explicar un gran número de casos pos mortem, en los que no se han evidenciado alteraciones del ritmo, ateroesclerosis o antecedentes de tromboembolia. En el presente estudio, es posible que inmunosupresión mediada por glucocorticoides retrase temporalmente la cascada profibrótica o en su caso sea un mecanismo protector a largo plazo. En este caso, se podrían explorar modelos preclínicos, en conde el estrés sea de mayor frecuencia e intensidad.

El segundo hallazgo no anticipado corresponde al pico de concentración de ^{99m}Tc-iFAP en sangre observado a las 3 horas en los grupos no suplementados fue significativamente mayor. Lo notable es que la astaxantina suprimió por completo ese pico, manteniendo concentraciones sanguíneas dos órdenes de magnitud menores con significancia estadística ($p < 0.05$). Este fenómeno sugiere que la astaxantina altera la dinámica circulatoria y la disponibilidad plasmática del radiofármaco, acelerando su depuración. Esto es coherente con su capacidad para integrarse en las membranas celulares del endotelio y eritrocitos, así como

para modificar el perfil lipídico sistémico [16, 20], lo que amerita exploración en futuros modelos farmacocinéticos.

Finalmente, destaca la durabilidad del efecto cardioprotector de la astaxantina. Esto podría tener relación con el estudio de Ebrahimi y cols. (2021) [30], en el cual se reportó que la anakinra (antagonista de IL-1) reduce el estrés metabólico solo a corto plazo y pierde eficacia tras 28 días. Lo cual pudo deberse a reacciones en el sitio de inyección o por mecanismos compensatorios inflamatorios mediados por citocinas como TNF-α. En este caso, la astaxantina a largo plazo, si conservó su efecto cardioprotector, esto podría deberse a su gran capacidad antioxidante. Por tanto, la astaxantina podría ser una alternativa viable para atenuar los efectos del estrés crónico y sin pérdida de eficacia, tal como se reporta en otros tratamientos.

5.2.6 Síntesis integradora

Aunque de manera indirecta, los resultados del presente estudio sugieren una relación estrecha entre la imagen molecular y la estimación dosimétrica respecto a los efectos del estrés sobre el metabolismo energético del miocardio y las señales. Así mismo, se comprueba el efecto cardioprotector de la astaxantina ante el estrés crónico. El estado de sobrecarga alostática prolongada en el grupo ST se manifestó primariamente como un déficit de captación de glucosa en el miocardio. Esta restricción energética es biológicamente compatible con el bloqueo en la translocación del transportador GLUT4 y la represión transcripcional de la hexocinasa, eventos característicos de la resistencia a la insulina inducida por niveles crónicos de glucocorticoides y estrés oxidativo [10, 12]. Frente a este escenario, la suplementación continua en el grupo ASTX+ST logró preservar la captación de 2-DG a niveles próximos a los del grupo CT, confirmando la capacidad del carotenoide para restaurar los niveles regulares del metabolismo, neutralizar las ROS mitocondriales y mitigar la dependencia hacia la síntesis lipotóxica de ácidos grasos [9, 16].

Paralelamente, la evaluación de la activación de fibroblastos mediante la captación de ^{99m}Tc-iFAP describió un patrón coherente entre la imagen molecular y la cuantificación volumétrica por biocinética. En los tiempos donde el análisis alcanzó diferencia estadística (3 horas), el grupo ASTX+ST se diferenció de manera significativa del grupo CT por ambas técnicas, demostrando que la astaxantina atenúa las vías de señalización profibróticas, limitando tempranamente la expresión de la endopeptidasa FAP [4, 22]. Simultáneamente, el análisis farmacocinético en sangre confirmó que el carotenoide acelera la depuración sistémica del radiofármaco, garantizando que la señal detectada corresponda a una interacción tisular específica y no a ruido de fondo circulante [25].

Finalmente, la dosimetría interna mediante el formalismo matemático MIRD situó las dosis absorbidas miocárdicas estrictamente en el rango de µGy/MBq administrado. Este parámetro físico descarta cualquier riesgo de toxicidad radiobiológica o inducción de efectos deterministas, corroborando y validando la viabilidad preclínica del ^{99m}Tc-iFAP como un agente seguro para el diagnóstico molecular no invasivo [37, 40].

Capítulo 6: Conclusiones y trabajo futuro

6.1 Conclusiones

A partir del análisis integral de los fundamentos teóricos, de la metodología implementada y de la interpretación de los datos obtenidos tras seis meses de experimentación, se presentan las siguientes conclusiones:

I. **Se validó el uso de herramientas de imagen molecular y medicina nuclear, habitualmente empleadas en oncología, para la evaluación de patología cardiovascular de origen neuroendocrino**. Los trazadores 2-DG-IRDye800CW y ^{99m}Tc-iFAP permitieron detectar de forma indirecta tanto alteraciones metabólicas del miocardio como la activación profibrótica inducida por estrés crónico, además estas herramientas demostraron una capacidad de detección en etapas tempranas que la imagenología anatómica convencional no ha podido igualar.

II. **Impacto del estrés crónico en el metabolismo energético del miocardio**. La captación de 2-DG-IRDye800CW disminuyó en el grupo estresado respecto del control, y se preservó en los grupos suplementados y pese a que el análisis de varianza no alcanzó significancia formal debido al tamaño de muestra, no se puede descartar la dirección de los daños generados por estrés.

III. **El ^{99m}Tc-iFAP demostró sensibilidad para detectar fibrosis incipiente**. La imagen molecular y la biocinética describieron patrones concordantes de captación, con diferencias estadísticamente significativas a todos los tiempos para imagen molecular y solo para 3 horas por bioinética. La biocinética, al cuantificar actividad volumétrica en lugar de una proyección planar, ofreció mayor sensibilidad en la fase final (24 horas), donde el grupo estresado conservó una captación superior a la del control.

IV. **La astaxantina ejerce un efecto cardioprotector dual**

Por una parte, preservó la captación de glucosa en niveles próximos a los basales incluso bajo estrés crónico sostenido. Por otra, redujo la captación del radiofármaco dirigido a FAP, lo que indica una menor expresión del biomarcador profibrótico; a las 3 horas de biodistribución, el grupo estresado y suplementado difirió significativamente del control tanto por imagen molecular como por biocinética. El efecto se mantuvo a lo largo de los seis meses de intervención, a diferencia de otros tratamientos descritos en la literatura que pierden eficacia por adaptación.

V. **El perfil farmacocinético y dosimétrico respalda la seguridad del radiofármaco**. La astaxantina aceleró el aclaramiento sanguíneo del ^{99m}Tc-iFAP y suprimió el pico de concentración circulante observado a las 3 horas en los grupos no suplementados. La estimación mediante formalismo MIRD situó las dosis absorbidas en el orden de los µGy por MBq administrado, estando muy dentro de los márgenes de radioprotección, por lo que se descartan efectos deterministas en el tejido miocárdico y validan la factibilidad preclínica del trazador.

6.2 Trabajo futuro

El presente proyecto se orienta a emplear herramientas de medicina nuclear e imagen molecular para el diagnóstico de las causas que desencadenan enfermedades cardiovasculares, en particular aquellas inducidas por factores modificables como el estrés crónico, así como a extender el uso de estas técnicas más allá del campo oncológico en el que se han consolidado. Sobre esta base se plantean las propuestas de trabajo a futuro.

La primera, propone corroborar los hallazgos de imagen molecular mediante tinciones histológicas (como el tricrómica de Masson) e inmunohistoquímica del tejido cardíaco, con el fin de correlacionar la señal de los trazadores con la presencia de fibras de colágeno y fibroblastos activados. Dicha correlación permitiría validar de manera directa la sensibilidad de las técnicas no invasivas empleadas.

La segunda, se considera prolongar el periodo de estrés crónico, que en este trabajo fue de seis meses, hasta un año de exposición, con objeto de documentar la progresión del daño acumulativo. Debido a que la literatura a estos periodos tan intensos de estrés es escasa, por lo que su estudio aportaría evidencia útil para el diseño de estrategias preventivas frente a la problemática del estrés crónico en México.

La tercera, ampliar los tiempos de biodistribución e incorporar la inyección del radiofármaco y correspondiente adquisición de imagen a las 36, 48 y 72 horas posteriores la última sesión de estrés. Dado que la activación de FAP constituye un mecanismo natural de reparación tisular, estos tiempos permitirían observar su expresión una vez que hayan cesado la inmunosupresión inducida por el estrés y los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides y de la astaxantina. Se propone replicar este mismo esquema temporal (30 min, 3, 24, 36, 48 y 72 h) para el 2-DG-IRDye800CW, cuya evaluación en el presente estudio se limitó a un único tiempo de 3 horas, lo que permitiría caracterizar la evolución de las alteraciones metabólicas inducidas por el estrés crónico.

Capítulo 7: Referencias

[1] Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res* 2002; 52: 1–23.

[2] Selye H. The evolution of the stress concept. *Am J Cardiol* 1970; 26: 289–299.

[3] Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress* 2007; 10: 109–120.

[4] Zhang J, Wang Q, Zhao S, et al. Astaxanthin attenuated pressure overload-induced cardiac dysfunction and myocardial fibrosis: Partially by activating SIRT1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2017; 1861: 1715–1728.

[5] Seal S V., Turner JD. The 'Jekyll and Hyde' of Gluconeogenesis: Early Life Adversity, Later Life Stress, and Metabolic Disturbances. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 3344.

[6] Lin H, Decuypere E, Buyse J. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (Gallus gallus domesticus). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004; 139: 737–744.

[7] Lin H, Decuypere E, Buyse J. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (Gallus gallus domesticus). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004; 139: 745–751.

[8] McEwen B. Allostasis and Allostatic Load Implications for Neuropsychopharmacology. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22: 108–124.

[9] Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2010; 1801: 311–319.

[10] Abel ED. Insulin signaling in the heart. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2021; 321: E130–E145.

[11] Dubois-Deruy E, Peugnet V, Turkieh A, et al. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* 2020; 9: 864.

[12] Sun Q, Karwi QG, Wong N, et al. Advances in myocardial energy metabolism: metabolic remodelling in heart failure and beyond. *Cardiovasc Res* 2024; 120: 1996–2016.

[13] Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* 2003; 89: 3–9.

[14] Ilkun O, Boudina S. Cardiac Dysfunction and Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome: an Update on Antioxidant Therapies. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 4806–4817.

[15] Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*; 2017. Epub ahead of print 27 January 2017. DOI: 10.1155/2017/8416763.

[16] Capelli B, Cysewski G. *NATURAL ASTAXANTHIN The World's Best Kept Health Secret*. 2017.

[17] Monroy-Ruiz J, Sevilla M-Á, Carrón R, et al. Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res* 2011; 63: 44–50.

[18] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandes MS, et al. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res* 2018; 122: 877–902.

[19] NAKAO R, NELSON OL, PARK JS, et al. Effect of Astaxanthin Supplementation on Inflammation and Cardiac Function in BALB/c Mice. *Anticancer Res* 2010; 30: 2721.

[20] Heidari M, Chaboksafar M, Alizadeh M, et al. Effects of Astaxanthin supplementation on selected metabolic parameters, anthropometric indices, Sirtuin1 and TNF-α levels in patients with coronary artery disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Front Nutr*; Volume 10-2023. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.3389/fnut.2023.1104169.

[21] Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 2021; 117: 1450–1488.

[22] Serumula W, Pillay V, Hadebe B, et al. Fibroblast Activation Protein Inhibitor (FAPI)-Based Theranostics. *Pharmaceuticals* 2025; 18: 522.

[23] Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology* 2004; 172: 2731–2738.

[24] Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, et al. 2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci* 2019; 21: 234.
[25] Trujillo-Benítez D, Luna-Gutiérrez M, Ferro-Flores G, et al. Design, Synthesis and Preclinical Assessment of 99mTc-iFAP for In Vivo Fibroblast Activation Protein (FAP) Imaging. *Molecules* 2022; 27: 264.
[26] Kovar JL, Volcheck W, Sevick-Muraca E, et al. Characterization and performance of a near-infrared 2-deoxyglucose optical imaging agent for mouse cancer models. *Anal Biochem* 2009; 384: 254–262.
[27] Son H, Yang JH, Kim HJ, et al. A chronic immobilization stress protocol for inducing depression-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments*; 2019. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3791/59546.
[28] Kvetnansky R, McCarty R. Immobilization Stress. In: *Encyclopedia of Stress*. Elsevier, 2007, pp. 445–449.
[29] Chiba S, Numakawa T, Ninomiya M, et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 39: 112–119.
[30] Ebrahimi F, Urwyler SA, Betz MJ, et al. Effects of interleukin-1 antagonism and corticosteroids on fibroblast growth factor-21 in patients with metabolic syndrome. *Sci Rep* 2021; 11: 7911.
[31] Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 547–555.
[32] Ferté L, Marino A, Battault S, et al. New insight in understanding the contribution of SGLT1 in cardiac glucose uptake: evidence for a truncated form in mice and humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2021; 320: H838–H853.
[33] Albaik M, Sheikh Saleh D, Kauther D, et al. Bridging the gap: glucose transporters, Alzheimer's, and future therapeutic prospects. *Front Cell Dev Biol*; 12. Epub ahead of print 16 January 2024. DOI: 10.3389/fcell.2024.1344039.
[34] Kubota K. From tumor biology to clinical PET: A review of positron emission tomography (PET) in oncology. *Ann Nucl Med* 2001; 15: 471–486.
[35] Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods* 2008; 5: 763–775.
[36] Jacques SL. Optical properties of biological tissues: a review. *Phys Med Biol* 2013; 58: R37–R61.
[37] Cherry SR., Sorenson JA., Phelps ME. *Physics in nuclear medicine*. Elsevier/Saunders, 2012.
[38] Attix FH. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Wiley, 1986. Epub ahead of print 19 November 1986. DOI: 10.1002/9783527617135.
[39] Knoll GF. *Radiation detection and measurement*. John Wiley, 2010.
[40] López-Coello LI, Torres-García E, Díaz-Sánchez LE, et al. Differences in the S value between male and female murine model for diagnostic, therapeutic and theragnostic radionuclides. *Applied Radiation and Isotopes* 2019; 146: 61–65.
[41] Laflamme MA, Sebastian MM, Buetow BS. Cardiovascular. *Comparative Anatomy and Histology* 2012; 135–153.
[42] Rossi F, Della Bianca V, de Togni P. Mechanisms and functions of the oxygen radicals producing respiration of phagocytes. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1985; 8: 187–204.
[43] Jang J, Wang Y, Kim H-S, et al. Nrf2, a Regulator of the Proteasome, Controls Self-Renewal and Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2014; 32: 2616–2625.
[44] Zuo C, Cao H, Song Y, et al. Nrf2: An all-rounder in depression. *Redox Biol* 2022; 58: 102522.