UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

"Evaluación de la toxicidad multiorgánica inducida por la doxorrubicina en solución y encapsulada en liposomas mediante la biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-citrato"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN FÍSICA MÉDICA

P R E S E N T A

JULIO CESAR CORDOBA ADAYA

Comité de Tutores: Dra. en C. Keila Isaac Olivé
Dr. en I.M. Rigoberto Oros Pantoja
Dr. en C. Eugenio Torres García

Toluca, Estado de México 2020

"La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella, y quizás, algún día, un descubrimiento científico como el radio, puede llegar a beneficiar a toda la humanidad."

Marie Curie

Resumen

El cáncer es una proliferación continua y descontrolada de las células. Como en el cuerpo existe una gran diversidad de células, hay una gran variedad de tipos de cáncer, los cuales difieren en su comportamiento y método de tratamiento. Desde el pasado siglo se han desarrollado diferentes tratamientos contra el cáncer, siendo los más comunes: la cirugía oncológica, la radioterapia y la quimioterapia. En esta última, se utilizan diferentes agentes que, en su mayoría, producen una gran toxicidad como es el caso de la Doxorrubicina (DOX). Para reducir particularmente la cardiotoxicidad que induce la DOX se han creado diferentes formulaciones, una de los cuales consiste en administrarla encapsulada en liposomas. Sin embargo, aunque se ha demostrado que de esta manera se disminuye la cardiotoxicidad, la misma puede producir aún toxicidad en otros órganos. Una forma práctica para evaluar toxicidad inducida por DOX puede ser a partir de cambios detectados en la biodistribución de radiofármacos (RF). Este método ha sido utilizado anteriormente para evaluar la toxicidad en órganos específicos como corazón y riñones. Un modelo experimental simple *in vivo* que permita visualizar de manera multiorgánica cambios en la captación de un RF no ha sido implementado. Los RF detectan cambios funcionales que preceden a cambios anatómicos, al mismo tiempo revelan alteraciones metabólicas precoces mucho antes de que aparezcan síntomas. La determinación temprana de la toxicidad permitirá adoptar tratamientos que eviten su progresión después de concluida la quimioterapia. ***Objetivo:*** Evaluar la toxicidad multiorgánica inducida por doxorrubicina en solución (DOX) y encapsulada en liposomas pegilados (DLP) mediante la biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-citrato en ratones CD1. ***Metodología:*** La experimentación se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se evaluó la biodistribución de los RF ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-citrato en ratones macho CD-1 tratados con DOX. En la segunda etapa solo se evaluó el ^{67}Ga-citrato; la DOX se administró a ratones CD-1 machos y hembras en dos formas farmacéuticas, como Doxo.HCI (DOX) y encapsulada en liposomas como doxorrubicina liposomal (DLP). Los animales tratados recibieron por vía intravenosa una dosis semanal de 5 mg/kg de DOX

o DLP durante 5 semanas. Una semana después de la última dosis, los animales fueron inyectados con ^{18}F-FDG o ^{67}Ga-citrato. Se les extrajeron todos los órganos y grasas en los que se determinó el % de captación del RF administrado. A partir de la sangre extraída se determinaron los valores de las enzimas CK, CK-MB, AST y LDH. En el caso de las hembras 1 hora antes del sacrificio se evaluó el ciclo estral. Para el análisis estadístico se realizó la prueba de U de Mann Whiteney para los grupos control y tratamiento de la primera etapa. En la segunda etapa se utilizó una ANOVA de Kruskal-Wallis seguido de una comparación de medias. ***Resultados:*** Los animales de los grupos controles estudiados en ambas etapas tuvieron ganancia de peso o no presentaron pérdida de este, mientras que los de los grupos tratados mostraron una pérdida significativa de peso tanto para hembras como machos. En el peso de los órganos de los ratones macho, la prueba ANOVA mostró diferencias significativas en hígado, riñones, testículos, grasa gonadal y grasa retroperitoneal entre los tres grupos en estudio (Control, DOX y DLP). La prueba de Tukey mostró que la variación significativa en el peso de los testículos, grasa gonadal y grasa retroperitoneal era debido a la DOX, mientras que la del hígado y riñones era debida a la DLP. Para hembras la prueba ANOVA mostró que, excepto en bazo y pulmones, todos los órganos de las ratonas mostraron cambios significativos durante el tratamiento con DLP, con una mortalidad al concluir el tratamiento que alcanzó el 67%. En las enzimas la prueba ANOVA mostró diferencias significativas en los valores de LDH de machos y hembras con respecto al control, así como valores de CK-MB. En la prueba de Tukey se encontraron cambios significativos en los valores promedio de LDH en el grupo control y DLP. Para machos, se encontraron cambios significativos en la captación con ^{18}F-FDG en sangre, bazo, cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñón y grasa inguinal, mientras que para ^{67}Ga-citrato encontraron cambios significativos para páncreas y pulmón. En la biodistribución de ^{67}Ga-citrato en machos y hembras inyectados con DOX y DLP, se encontraron cambios significativos en los machos en sangre, bazo, hígado, páncreas, pulmones y riñones, mientras que para hembras los cambios significativos se observaron en todos los órganos excepto el páncreas. ***Conclusión***: El ^{18}F-FDG es más sensible que el ^{67}Ga-citrato para visualizar inflamación.

Una vez más quedó demostrado que los métodos nucleares son mucho más sensibles que los métodos de detección enzimática en sangre.

Abstract

Cancer is a continuous and uncontrolled proliferation of cells. As there is a great diversity of cells in the body, there are a great variety of types of cancer, which differ in their behavior and method of treatment. Since the last century, different treatments against cancer have been developed, being the most common: oncological surgery, radiotherapy, and chemotherapy. In the latter, different agents are used that, for the most part, produce great toxicity, such as Doxorubicin (DOX). Different formulations have been created, one of which consists in administering it encapsulated in liposomes. However, although it has been shown that cardiotoxicity is reduced in this way, it can still cause toxicity in other organs. A practical way to assess DOX-induced toxicity can be from detecting changes in radiopharmaceuticals (RF) biodistribution. This method has previously been used to assess toxicity to specific organs such as the heart and kidneys. A simple in *vivo* experimental model that allows visualizing changes in RF uptake in a multi-organic way has not been implemented. RF detects functional changes that precede anatomical changes, at the same time reveals early metabolic disturbances long before symptoms appear. Early determination of toxicity will allow the adoption of treatments that prevent its progression after chemotherapy is completed. ***Objective:*** To evaluate the multiorgan toxicity induced by doxorubicin in solution (DOX) and encapsulated in pegylated liposomes (DLP) through the biodistribution of ^{18}F-FDG and ^{67}Ga-citrate in CD1 mice. ***Methodology:*** The experimentation was carried out in two stages. In the first, the biodistribution of ^{18}F-FDG and ^{67}Ga-citrate radiopharmaceuticals was evaluated in male CD-1 mice treated with DOX. In the second stage, only the ^{67}Ga-citrate radiopharmaceutical was evaluated; DOX was administered in two dosage forms, as Doxo.HCI and encapsulated in liposomes as liposomal doxorubicin (DLP) to male and female CD-1 mice. The treated animals received intravenously a weekly dose of 5 mg/kg of DOX or DLP for 5 weeks. One week after the last dose, the animals were injected with ^{18}F-FDG or ^{67}Ga-citrate. All the organs and fats were extracted and the % uptake of the administered RF was determined in each organ. From the extracted blood, the values of

the enzymes CK, CK-MB, AST and LDH were determined. In the case of females 1 hour before the sacrifice, the estrous cycle was evaluated. For the statistical analysis, the U Mann Whiteney test was performed for the control and treatment groups of the first stage. In the second stage, a Kruskal-Wallis ANOVA was used followed by a mean comparison test (Tuckey). ***Results:*** The animals in the control groups studied in both stages had weight gain or did not present weight loss, while those in treated groups had a significant weight loss for both females and males. Significant differences by ANOVA ($p < 0.05$) were found in the weight of liver, kidneys, testes, gonadal fat, and retroperitoneal fat among the male mice of the three groups under study (Control, DOX and DLP). The Tukey test showed that the significant variation in testicular weight, gonadal fat and retroperitoneal fat was due to DOX, while that of liver and kidneys was due to DLP. For females, the ANOVA test showed that, except in the spleen and lungs, all the organs of the treated mice showed significant changes during the treatment with DLP, with a mortality at the end of the treatment that reached 67%. In the enzymes, the ANOVA test showed significant differences in the LDH values of males and females with respect to the control, as well as CK-MB values. Tukey test revealed that this significant changes in LDH values are between DLP and control group. For males we found significant changes in the ^{18}F-FDG uptake in blood, spleen, brain, heart, liver, lung, kidney, and groin fat, while for ^{67}Ga-citrate significant changes were found for pancreas and lung. In the biodistribution of ^{67}Ga-citrate in males injected with DOX and DLP, we found significant changes in the blood, spleen, liver, pancreas, lungs, and kidneys in males, while for females we found significant changes in all organs except the pancreas. Conclusion: ^{18}F-FDG is more sensitive than ^{67}Ga-citrate to visualize multiorgan toxicity. Once again it was shown that nuclear methods are much more sensitive than enzymatic blood detection methods.

Índice General

Resumen II
Abstract V
Índice General VII
Índice de Figuras IX
Índice de Tablas X
Abreviaturas XI
1.0. Introducción y Objetivos 1
1.1. Introducción 1
1.2. Objetivos 5
1.2.1. Objetivo General 5
1.2.2. Objetivos específicos 5
2.0. Antecedentes y Marco Teórico 6
2.1. Doxorrubicina 6
2.1.1. Doxorrubicina en solución (DOX) 6
2.1.2.2. Toxicidad de la DOX. 7
2.1.3. Doxorrubicina Liposomal (DL) 8
2.2. Evaluación de la Toxicidad 11
2.2.1. Mediante Radiofármacos 11
2.2.1.1. Radiofármacos 11
2.2.1.1. ^{18}F-FDG 12
2.2.1.2. ^{67}Ga-Citrato 13
2.2.2. Mediante Biomarcadores Enzimáticos 14
3.0 Materiales y Métodos 16
3.1. Animales 17
3.1.1. Animales del grupo control. 18
3.1.2. Animales de los grupos bajo tratamiento 19
3.2. Captación de los Radiofármacos en los Órganos 20
3.3. Análisis Estadístico 20
4.0 Resultados 21

4.1. Control del peso de los ratones 21
4.2. Peso de los órganos de los ratones en el momento del sacrificio 23
4.2.1. Peso de los órganos de los ratones macho 23
4.2.2. Peso de los órganos de los ratones hembra 24
4.3. Control de enzimas el día del sacrificio 26
4.4. Biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-Citrato en ratones macho. 27
4.4.1. Biodistribución de ^{18}F-FDG 27
4.4.2. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato 28
4.5. Biodistribución de ^{67}Ga-Citrato en ratones macho y hembras. 30
4.5.1. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato en machos tratados con DOX y DLP 30
4.5.2. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato en hembras tratadas con DOX y DLP. 31
5.1 Comparación de la toxicidad inducida por DOX en ratones macho CD1 mediante la biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-Citrato. 33
5.1.1. Mecanismos de toxicidad inducida por la DOX 33
5.1.2. Biodistribución de ^{18}F-FDG 35
5.1.3. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato 46
5.1.3.1. Conclusiones parciales 51
5.2. Comparación de la toxicidad inducida por DOX y DLP en ratones macho y hembra CD1 mediante biodistribución del ^{67}Ga-Citrato. 53
5.2.1 Ratones macho 54
5.2.2. Ratones hembra 61
5.3. Determinación de los valores de las enzimas LDH, CK, CK-MB y AST en los animales tratados con DOX y DLP. 65
5.4. Conclusiones 67
6.0. Referencias Bibliográficas 69

Índice de Figuras

FIGURA 1. TIPOS DE CÁNCER MÁS COMUNES EN EL MUNDO, SIN TOMAR EN CUENTA SEXO Y EDAD. 1
FIGURA 2. INCIDENCIA DEL CÁNCER EN EL AÑO 2018 MÉXICO SIN TOMAR EN CUENTA SEXO Y EDAD. 2
FIGURA 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA DOXORRUBICINA 6
FIGURA 4. REPRESENTACIÓN DE UN LIPOSOMA 9
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LA DOXORRUBICINA LIPOSOMAL (DL) 10
FIGURA 6. DOXORRUBICINA LIPOSOMAL PEGILADA (DLP) 11
FIGURA 7. ESQUEMA DE DESINTEGRACIÓN DEL ^{18}F 13
FIGURA 8. ESQUEMA DE DESINTEGRACIÓN DEL ^{67}GA 14
FIGURA 9. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA COMPARAR LA BIODISTRIBUCIÓN DE ^{18}F-FDG Y ^{67}GA-CITRATO EN RATONES MACHO CD1 TRATADOS CON DOX. 16
FIGURA 10. METODOLOGÍA UTILIZADA PARA COMPARAR LA BIODISTRIBUCIÓN DE ^{67}GA-CITRATO EN RATONES MACHO Y HEMBRA CD1 TRATADOS CON DOX Y CON DLP. 17

Índice de Tablas

TABLA 1. CONTROL DEL PESO DE LOS ANIMALES DURANTE EL TRATAMIENTO (ETAPA-1)..... 21
TABLA 2. CONTROL DEL PESO DE LOS ANIMALES DURANTE EL TRATAMIENTO (ETAPA-2)..... 23
TABLA 3. PESO DE LOS ÓRGANOS DE LOS RATONES HEMBRA DE LOS GRUPOS CONTROL (C-3) Y TRATAMIENTO CON DOX (T-3) Y DLP (T-5) EL DÍA DEL SACRIFICIO 25
TABLA 4. VALORES DE LAS ENZIMAS DE LOS RATONES EL DÍA DEL SACRIFICIO 26
TABLA 5. BIODISTRIBUCIÓN DE ^{18}F-FDG (% A. A/G TEJIDO) EN LOS GRUPOS C-1 (CONTROL) Y T-1 (TRATADO CON DOX) ……..28
TABLA 6. BIODISTRIBUCIÓN DE ^{67}GA-CITRATO (%A. A /G TEJIDO) EN LOS GRUPOS C-2 (CONTROL) Y T-2 (TRATADO CON DOX)……..29
TABLA 7. BIODISTRIBUCIÓN DE ^{67}GA-CITRATO (%A. A /G TEJIDO) EN MACHOS DE LOS GRUPOS CONTROL (C-2) Y TRATAMIENTO CON DOX (T-2) Y CON DLP(T-4)……..30
TABLA 8. BIODISTRIBUCIÓN DE ^{67}GA-CITRATO (%A. A /G TEJIDO) EN HEMBRAS DE LOS GRUPOS CONTROL (C-3) Y TRATAMIENTO CON DOX (T-3) Y CON DLP(T-5) ……..32

Abreviaturas

^{18}F-FDG	^{18}Flúor-fluorodesoxiglucosa
^{67}Ga-citrato	^{67}Galio citrato
A. A	Actividad administrada
ABC	Aclaramiento sanguíneo acelerado (accelerated blood clearance)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANOVA	análisis de la varianza (ANOVA por sus siglas en inglés, ANalysis Of VAriance)
AST	Enzima aspartato aminotransferasa
ATP	Trifosfato de adenosina
BBB	Barrera hematoencefálica
CARPA	Complemento activado de seudoalergia (Complement activated seudoalergia)
CAT	Catalasa
CK	Enzima creatina-cinasa
CK-MB	Enzima creatina-cinasa miocárdica
CO_2	Dióxido de carbono
COX	Cicloxigenasas
Cu	Cobre
DDS	Sistemas de administración de fármacos (siglas en inglés Drug Delivery Systems)
DL	Doxorrubicina liposomal
DLP	Doxorrubicina Liposomal PEGilada
DOX	Doxorrubicina

Dox-ol	13-OH-doxorubinol
F	Flúor
FDG	Fluorodesoxiglucosa
Fe	Hierro
Fe-Ft	Ferritina citoplasmática
FeS	Sulfuro ferroso
Fpn	Ferroportina
Ft	ferritina
Ga	Galio
GLUT	Transportadores de glucosa
GPX	Glutatión peroxidasa
HIF-1α	Factor 1α inducible por hipoxia
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IRE	Elementos sensibles al hierro (Fe)
IRP	Proteínas reguladoras del hierro (Fe)
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
LOX	lipoxigenasas
μCi	Microcurie
μL	Microlitro
MDA	Malondialdehído
MPS	Sistema fagocítico mononuclear
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADHP	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Ne	Neón
NOX	Oxidasas
O	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud

ONOO-	Peroxinitrito
PEG	PEGilada
PET	Tomografía por emisión de positrones
RBC	Glóbulos rojos
RF	Radiofármacos
RNS	Especie reactivas de nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
DE	Desviación estándar
SOD	Superóxido dismutasa
SPECT	Tomografía computarizada por emisión de fotón único
SRE	Elemento de respuesta sérica (siglas en inglés serum response element)
Tc	Tecnecio
Tf	Transferrina
TfR	Receptores de transferrina
WAT	Tejido adiposo blanco
Zn	Zinc

1.0. Introducción y Objetivos

1.1. Introducción

El cáncer es un proceso de crecimiento continuo y descontrolado de las células. Como en el cuerpo existe una gran diversidad de células, existen diferentes tipos de cáncer, los cuales difieren en su comportamiento y respuesta al tratamiento [1]. Una característica del cáncer es que invade tejidos cercanos y puede diseminarse a otras partes del cuerpo a través de los sistemas sanguíneo y linfático. La mayoría de los cánceres se clasifican en tres grupos: carcinomas, sarcomas y leucemias o linfáticos [2].

Desde 2015 la OMS cataloga al cáncer como la segunda causa de muerte a nivel mundial, mientras que en México resultó ser la tercera causa de muerte en 2018 [3,4]. En la actualidad hay más de 100 tipos diferentes de cáncer, pero los de mayor incidencia a nivel mundial y en México (año 2018) se muestran en las figuras 1 y 2 [5,6].

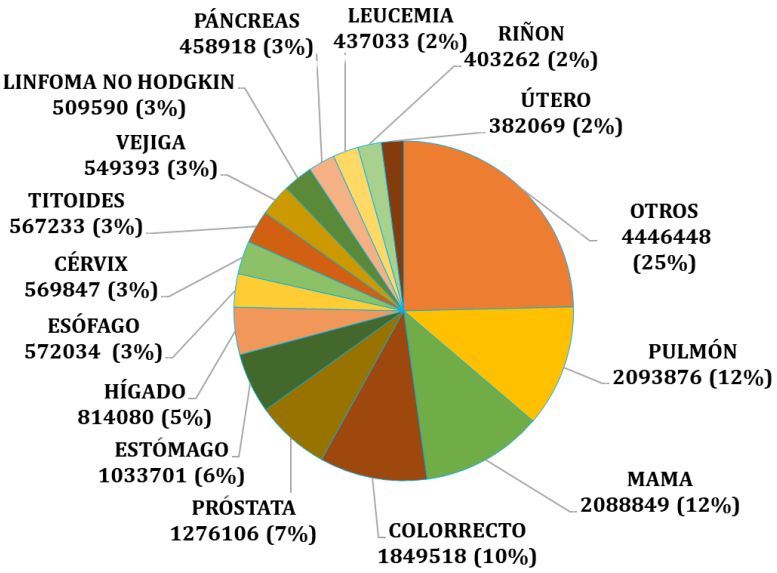

Figura 1. Tipos de cáncer más comunes en el mundo, sin tomar en cuenta sexo y edad.

Como muestra la figura 2 en el año 2018 los cánceres de mayor incidencia en México fueron mama, próstata hígado, tiroides y útero.

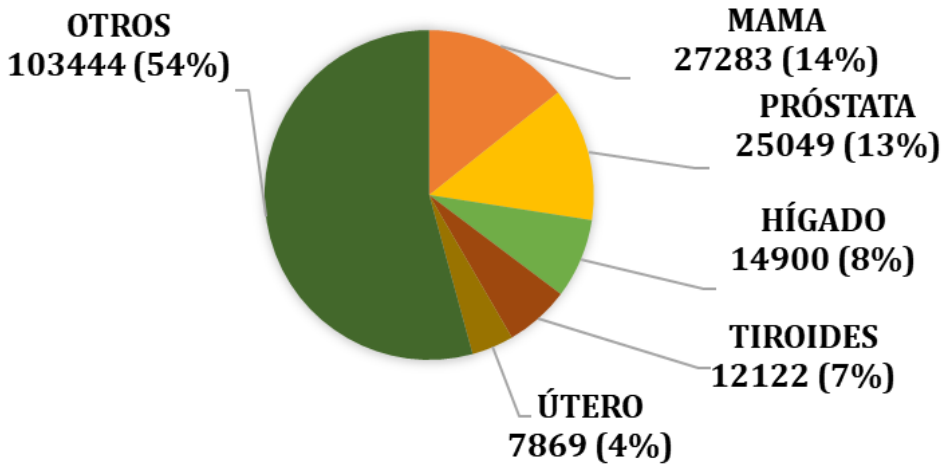

Figura 2. Incidencia del cáncer en el año 2018 México sin tomar en cuenta sexo y edad.

Aunque constantemente se desarrollan nuevas formas de tratamiento del cáncer todas parten de tres técnicas convencionales [7]:

- Cirugía oncológica
- Radioterapia
- Quimioterapia.

También se utiliza la denominada *Terapia Adyuvante* que consiste en un tratamiento adicional que se administra después del tratamiento primario. Incluye una o más de estas tres técnicas convencionales, combinadas o no con otras técnicas alternativas, con el fin de mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes. Tales combinaciones dependen del tipo y ubicación del tumor [8].

La quimioterapia es la aplicación de fármacos para eliminar las células cancerosas. Evita que las células se desarrollen y dividan. Como las células cancerosas crecen y se

dividen más rápido que las células normales su efecto es mayor en las células malignas. Los agentes quimioterapéuticos son muy tóxicos y dañan también las células normales, provocando efectos secundarios que pueden llegar a ser muy nocivos. Sin embargo, dada su probada eficacia se realizan muchas investigaciones encaminadas a mejorar su toxicidad [9].

Uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados es la Doxorrubicina (DOX). La DOX es muy efectiva para el tratamiento de tumores, pero tiene el inconveniente de que induce toxicidad dosis-dependiente en diferentes órganos, principalmente en el corazón [10]. Para disminuir la toxicidad que la DOX en solución induce en los pacientes se han desarrollado formas farmacéuticas a base de liposomas que permiten depositar en el tejido maligno mayores dosis del medicamento con menores efectos adversos sobre el corazón [11,12]. La doxorrubicina liposomal pegilada (DLP) es una de estas formulaciones. Es menos tóxica que la DOX, sin embargo, también produce efectos secundarios [12].

Una vía relativamente sencilla de estimar la toxicidad inducida por medicamentos es evaluar los cambios que se producen en la biodistribución de radiofármacos (RF) [13-16] ya que la toxicidad inducida por medicamentos aumenta o disminuye la captación en órganos específicos. La toxicidad inducida por la DOX en corazón y riñones se ha evaluado mediante esta técnica [14,16] pero de forma individual. La toxicidad multiorgánica a partir de una sola imagen de cuerpo completo, mediante un RF, no ha sido abordada en el caso de la DOX. Un modelo experimental simple *in vivo* que permita visualizar cambios en la captación de un RF en varios órganos al mismo tiempo serviría para diagnosticar toxicidad multiorgánica temprana, ya que los RF detectan cambios funcionales a nivel molecular y celular que preceden a los cambios anatómicos y clínicos por lo que revelan alteraciones metabólicas precoces mucho antes de que aparezcan síntomas. La determinación de la toxicidad temprana permitiría adoptar tratamientos que eviten su progresión después de concluida la quimioterapia. Tal

modelo se ha utilizado con éxito en enfermedades autoinmunes para la evaluación de sitios de inflamación en todo el cuerpo [17].

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la toxicidad multiorgánica inducida por doxorrubicina en solución (DOX) y encapsulada en liposomas pegilados (DLP) mediante la biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-citrato en ratones CD1.

1.2.2. Objetivos específicos

1.2.2.1. Comparar la toxicidad inducida por DOX en ratones macho CD1mediante la biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-citrato.

12.2.2. Comparar la toxicidad inducida por DOX y DLP en ratones macho y hembra CD1 mediante la biodistribución de ^{67}Ga-citrato

1.2.2.3. Determinar los valores de las enzimas LDH, CK, CK-MB y AST de los animales tratados con DOX y DLP.

2.0. Antecedentes y Marco Teórico

2.1. Doxorrubicina

2.1.1. Doxorrubicina en solución (DOX)

La DOX es uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivos para combatir tumores malignos hematológicos y sólidos [10,18]. Forma parte de las denominadas antraciclinas, que son un grupo de agentes citostáticos al cual pertenecen la daunorrubicina, aislada de la bacteria *Streptomyces peucetius* en 1957, así como la hidroxidaunomicina, la idarrubicina y la epirrubicina que fueron aisladas posteriormente [19,20].

La estructura química de la DOX se muestra en la Figura 3. Se compone un anillo tetracíclico (responsable de su color rojizo) con grupos quinona–hidroquinona en los anillos C-B, un sustituyente metoxi en el C-4 del anillo D, una cadena lateral corta en el C-9 del anillo A con un carbonilo en el C-13, y un azúcar (daunosamina) en el C-7 del anillo A [20].

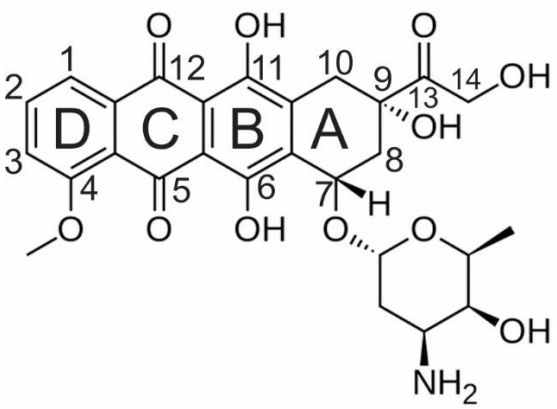

Figura 3. Estructura química de la doxorrubicina

La DOX es muy eficiente para el tratamiento de cáncer de mama, hígado, colon, ovario, pulmón, útero, cuello uterino, linfoma, leucemia, enfermedad de Hodgkin y sarcomas óseos primarios. Su principal inconveniente es la toxicidad dosis-dependiente que induce en diversos órganos, en particular en el corazón [10,12,14,15,19].

2.1.2. Toxicidad de la DOX

2.1.2.1. Concepto de toxicidad

La toxicidad se define como la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un organismo [21].

Los estudios de toxicidad de los medicamentos son una parte imprescindible de su desarrollo, y se extienden a lo largo de toda su vida útil. Permiten obtener información sobre los efectos adversos que pueden tener lugar bajo condiciones normales o accidentales. En la etapa de desarrollo se realizan estudios *in vitro* e *in vivo* (en animales y en humanos) que permiten conocer los efectos adversos en condiciones controladas. Durante toda la vida útil del medicamento se realizan estudios epidemiológicos retrospectivos para evaluar reacciones adversas durante su uso habitual o accidental [22].

Como los agentes quimioterapéuticos ejercen su efecto tóxico no solo en las células malignas sino sobre todas las células del organismo, en particular aquellas que comparten características con las células tumorales, los efectos tóxicos secundarios son inevitables. Se recomienda evaluar su toxicidad después de cada ciclo de quimioterapia a corto, mediano y a largo plazo [23].

2.1.2.2. Toxicidad de la DOX.

Aunque la cardiotoxicidad es el efecto secundario más conocido de la DOX [10,12-15,19], también se han reportado efectos tóxicos renales [24-27], mielosupresión

[10,28], atrofia en testículos y grasas [29-33], daño hepático [10,29], pulmonar [31] y cerebral [34], así como alteraciones en los sistemas urinario, integumentario y nervioso [10,13,34].

El mecanismo por el cual la DOX induce toxicidad no está totalmente dilucidado. Se supone, sin embargo, que es multifactorial y diferente, en parte, al mecanismo antitumoral [35-38]. Aunque existen criterios contrarios [38,39] se piensa que el estrés oxidativo provocado por radicales libres y ROS ($O_2^{-\bullet}$, $HO^\bullet$ y H_2O_2) así como el estrés nitrosidativo provocado por las RNS, en particular $NO^\bullet$, acompañado de la disminución drástica de antioxidantes endógenos, constituye el elemento inicial que desencadena múltiples respuestas moleculares y celulares. [10,13,14,20,36,38,40]. Estas respuestas dependen de las características y funciones de cada órgano del cuerpo y conducen a la apoptosis, necrosis o autofagia en dependencia de la dosis administrada y de factores intrínsecos del paciente [14,35,36,39,40-42] Algunas respuestas se manifiestan de manera más temprana y otras a más largo plazo

2.1.3. Doxorrubicina Liposomal (DL)

Para disminuir los efectos secundarios que produce la DOX, en particular la cardiotoxicidad, se han desarrollado formulaciones a partir de liposomas, denominadas de forma genérica doxorrubicina liposomal, DL [11,12].

Los liposomas son vesículas nanométricas formadas por bicapas de fosfolípidos concéntricas separadas por compartimientos acuosos, similares a la membrana celular (Figura 4). Estas bicapas lipídicas se forman espontáneamente al dispersar en agua fosfolípidos, neutros o cargados, que se estabilizan por interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van de Waals. Se describieron por primera vez en 1961 por Alec D Bangham cuando trabajaba en la Universidad de Cambridge y desde su hallazgo a la fecha se han realizado innumerables estudios sobre su constitución y aplicaciones en diferentes

campos, en particular como sistemas transportadores de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés) ya que pueden almacenar, proteger y transferir cantidades apreciables de un medicamento en el sitio deseado [43-45].

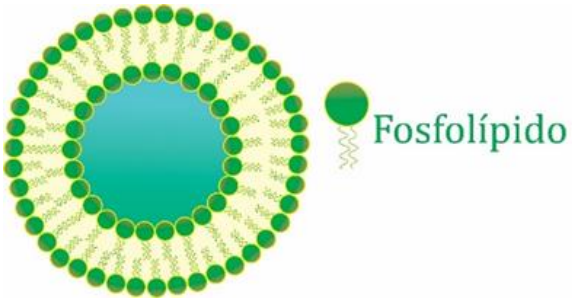

Figura 4. Representación de un liposoma

Los liposomas son muy versátiles debido a sus características fisicoquímicas (tamaño, composición lipídica, carga superficial, fluidez de la bicapa, entre otras). La posibilidad de controlar su tamaño, forma, carga y composición con el objetivo que se dirijan a un tejido específico, con tiempos de acumulación y eliminación prestablecidos, permite que se puedan acoplar moléculas de diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas tanto en el núcleo acuoso como en la bicapa o sobre la superficie de ésta, por lo que se consideran los mejores DDS hasta la fecha .Su toxicidad es muy baja pues su tamaño no les permite atravesar los vasos capilares que se encuentran en la mayoría de los tejidos normales. Como están compuestos por moléculas biológicas, son biodegradables [43-45]. La absorción, metabolismo, farmacocinética y toxicidad de una droga transportada por un liposoma dependen más de éste que de la droga. Por ejemplo, algunos estudios han mostrado que la droga incorporada a los liposomas se retiene más tiempo en el tumor que la droga libre, lo que aumenta la eficacia del tratamiento [12,44,45] La DL (Figura 5) sin embargo, presenta desventajas pues se acumula en sitios de inflamación, así como en los órganos del sistema fagocítico mononuclear (MPS por sus siglas en inglés): hígado, bazo y medula ósea [12,45-47].

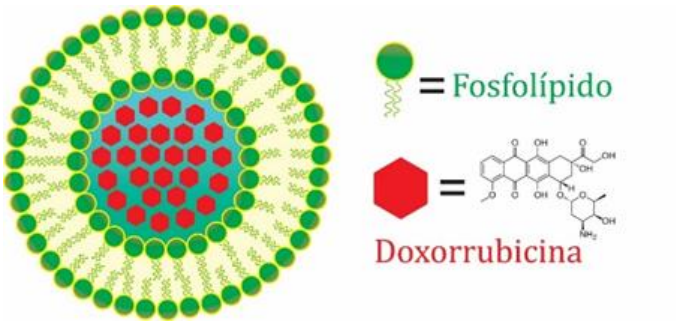

Figura 5. Representación de la Doxorrubicina liposomal (DL)

2.1.3.1. Doxorrubicina Liposomal Pegilada (DLP)

Otra formulación a base de liposomas, desarrollada como DDS de DOX, es la DOX liposomal pegilada (DLP). En la DLP la DOX se localiza también dentro de la bicapa de fosfolípidos, pero ésta se encuentra pegilada (recubierta de una capa de PEG o metPEG) como muestra la Figura 6. La pegilación crea una capa protectora que estabiliza los liposomas desde el punto de vista estérico, ayuda a formar una superficie hidrofílica a su alrededor que interfiere su interacción con las proteínas del plasma y reduce la captación por el MPS [43,44,45,48]. La DLP se acumula más en los tumores que en las células normales del paciente por lo que induce menos toxicidad que la DOX [12,46,47,49].

Como la DL y la DLP muestran menor toxicidad cardiaca, producen menos alopecia, mielosupresión, náuseas y vómitos que la DOX, constituyen una mejor opción para pacientes con enfermedades cardiacas, pacientes de edad avanzada, pacientes tratados con anterioridad con alguna antraciclina, así como pacientes que presentes otros factores de riesgo [12,44,46,49,50]. Sin embargo, ambas formas no están exentas de inducir toxicidad multiorgánica, que puede ser evaluada mediante RF y mediante la detección bioquímica de enzimas.

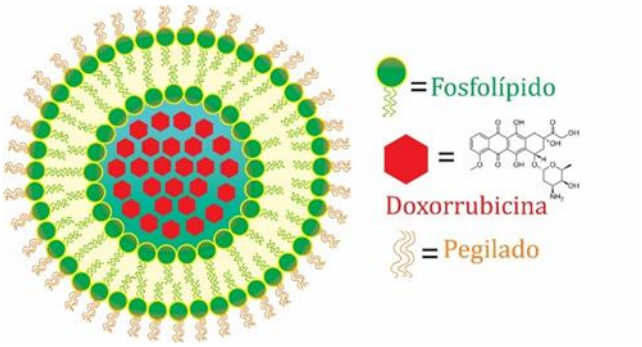

Figura 6. Doxorrubicina Liposomal PEGilada (DLP)

2.2. Evaluación de la Toxicidad

2.2.1. Mediante Radiofármacos

2.2.1.1. Radiofármacos

Los radiofármacos (RF) son medicamentos que contienen en su estructura al menos un átomo radiactivo y se administran con fines diagnósticos o terapéuticos. Como se aplican en pequeños volúmenes y concentraciones (menos de 10^{-6} mol/L) no desencadenan respuesta inmune o tóxica. Son capaces de detectar los cambios funcionales a nivel celular y molecular que preceden a los cambios anatómicos y clínicos por lo que revelan cambios metabólicos precoces antes de la aparición de síntomas.

La biodistribución de los RF se define como la fracción de la actividad total administrada que se distribuye en los diferentes órganos y tejidos. Se realiza tanto *in vivo* como *ex vivo.* En el primer caso se obtiene la, imagen del producto en una cámara SPECT o PET, en tanto que en el segundo caso el animal se sacrifica, se extraen los órganos de interés y se mide el % de la actividad total inyectada que se distribuye en cada uno [51] La biodistribución normal de un RF se altera debido a la toxicidad inducida por medicamentos [13-17,52] produciendo bien aumento, bien disminución de la captación en órganos específicos. La evaluación de la toxicidad inducida por DOX mediante RF se ha enfocado principalmente a la cardiotoxicidad. [13-15] y la función

renal [16]. Efectos tóxicos de la DOX en el músculo cardíaco y los riñones se han estimado a partir de cambios observados en la biodistribución de ^{201}TlCl [13], ^{99m}Tc-MIBI [13,14], ^{99m}Tc.pirofosfato [53], ^{99m}Tc-DTPA [16]. También se ha estudiado el deterioro del metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos en la cardiomiopatía causada por la DOX mediante ^{18}F-FDG, ^{123}I-MIPP, ^{99m}Tc.Annexin V, ^{99m}Tc-ácido glucárico [14,15]. Sin embargo, la toxicidad multiorgánica a partir de una sola imagen de cuerpo completo con un solo RF ha sido poco abordada. Un modelo experimental simple que permita visualizar cambios en la captación de un RF en varios órganos al mismo tiempo serviría para diagnosticar toxicidad multiorgánica temprana y permitiría adoptar tratamientos que eviten su progresión después de concluida la quimioterapia. Tal modelo se ha utilizado con éxito en enfermedades autoinmunes para la evaluación de sitios de inflamación en todo el cuerpo [17].

2.2.1.1. ^{18}F-FDG

El ^{18}F-FDG es el RF más utilizado en PET. Como es un análogo de la glucosa; su captación en órganos es una medida del metabolismo de esta molécula. Se utiliza en psiquiatría, neurofisiología, cardiología, detección de tumores y la estimación de la respuesta metabólica al tratamiento de éstos [54]. También se aplica en la localización de sitios de inflamación pues los neutrófilos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares presentes en tales sitios tienen una alta captación de glucosa [55,56].

El ^{18}F se desintegra a ^{18}O por emisión de positrones (96.86%, 0.633 MeV) y captura electrónica (3.14%, 1665 keV), seguido de aniquilación (Figura 7). Tiene un $T_{1/2}$ de 110 minutos. Se produce en ciclotrón por las reacciones ^{18}O(p,n) ^{18}F y ^{nat}Ne(d,α)^{18}F .La reacción más utilizada es ^{18}O(p,n) ^{18}F, que emplea como blanco $^{18}O_2$ (g) o $H_2{}^{18}O$ y protones de 11-17 MeV. Para la reacción ^{nat}Ne(d,α)^{18}F se emplea como blanco Ne(g) y deuterones de 8-14 MeV [57]. El ^{18}F-FDG se ha utilizado para evaluar la cardiotoxicidad

inducida por la DOX, debido a que esta antraciclina perturba el metabolismo de la glucosa [14,15].

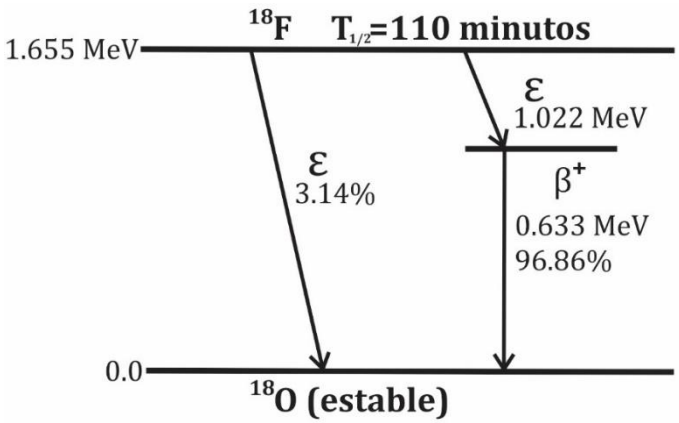

Figura 7. Esquema de desintegración del ^{18}F

2.2.1.2. ^{67}Ga-Citrato

El ^{67}Ga-citrato se utiliza en la detección de procesos infecciosos e infamatorios por SPECT debido a la alta afinidad del Ga^{3+} por los sideróforos bacterianos [58,59] mucopolisacáridos acídicos persulfatados [60] y proteínas enlazadoras de Fe^{3+} presentes en el tejido inflamado [59].

El ^{67}Ga se desintegra a ^{67}Zn estable por captura electrónica (100%), emitiendo radiación γ de diferentes energías (Figura 8) con un $T_{1/2}$ de 78.3 h [61]. Se produce en ciclotrón por diversos métodos a partir de blancos de Cu y Zn enriquecidos o no. Las reacciones más utilizadas son ^{68}Zn (p,2n) ^{67}Ga con protones de 20-40 MeV y ^{67}Zn(p,n)^{67}Ga con protones de 13 MeV [57]. No se ha utilizado para la evaluación de toxicidad inducida por DOX.

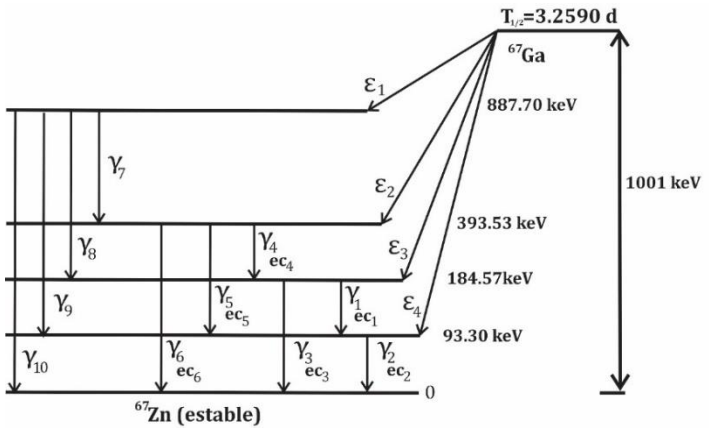

Figura 8. Esquema de desintegración del ^{67}Ga

2.2.2. Mediante Biomarcadores Enzimáticos

Un biomarcador es un indicador de procesos, eventos o cambios en un sistema biológico Tiene la habilidad de reflejar, predecir o tomar el lugar de puntos biológicos finales que no pueden medirse directamente o que su medición implicaría largos periodos de tiempo [62] Los biomarcadores suelen utilizarse para medir el estado de salud o para confirmar o rechazar el diagnóstico sobre un efecto adverso. Las enzimas constituyen excelentes biomarcadores debido a que las enfermedades afectan su funcionamiento, por lo que son muy útiles para detectar la disfunción de un órgano [63].

Las enzimas plasmáticas se dividen en funcionales y no funcionales. Las enzimas funcionales tienen una función definida y específica en el plasma. Su determinación tiene interés clínico para evaluar la función sanguínea. Las enzimas no funcionales no tienen una función específica en el plasma. Cuando se encuentran en niveles más altos de lo normal sugieren aumento en la velocidad de destrucción celular y tisular por lo que brindan una información valiosa para el diagnóstico y el pronóstico [63]. Cuando la permeabilidad de la membrana plasmática aumenta, debido al daño celular, se liberan enzimas a la circulación general. Este es el caso de las enzimas creatinina

quinasa (CK), CK-MB, lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato transaminasa (AST) que se utilizan en este trabajo.

3.0 Materiales y Métodos

El trabajo experimental se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se evaluó la biodistribución de los RF ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-citrato en ratones macho tratados con DOX. La Figura 9 muestra esquemáticamente el estudio experimental realizado.

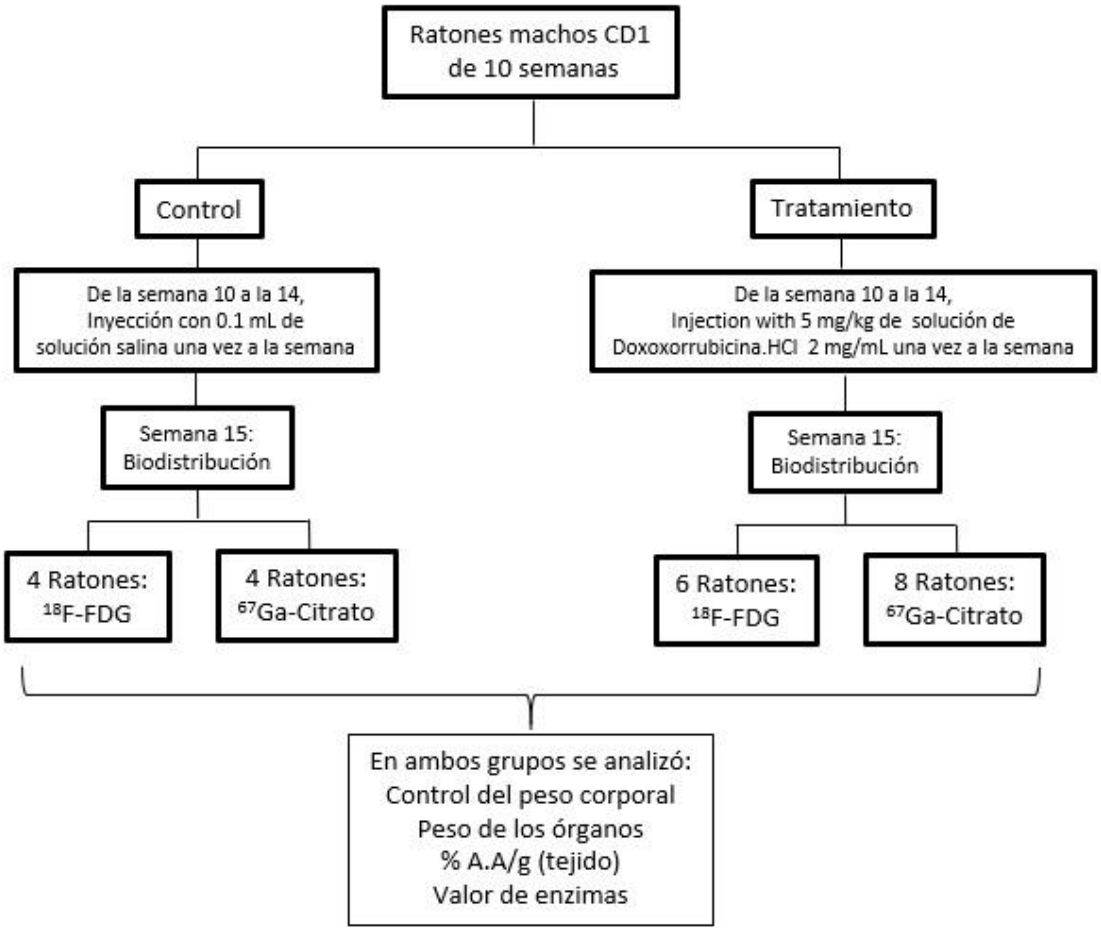

Figura 9. Metodología utilizada para comparar la biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-citrato en ratones macho CD1 tratados con DOX.

En la segunda etapa se evaluó mediante ^{67}Ga-citrato la toxicidad inducida por DOX (solución DOX.HCl) y DLP (DOX.HCl encapsulada en liposomas pegilados), tanto en ratones macho como hembras. La Figura 10 muestra el esquema del experimento realizado.

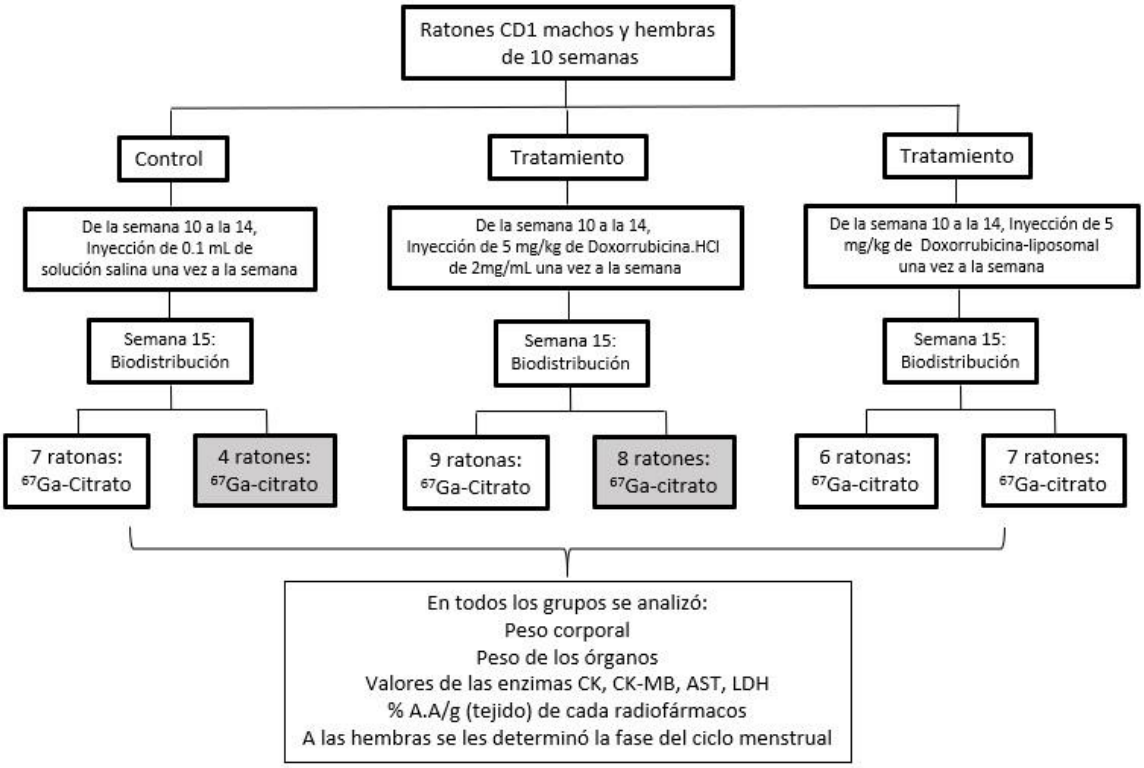

Figura 10. Metodología utilizada para comparar la biodistribución de ^{67}Ga-citrato en ratones macho y hembra CD1 tratados con DOX y con DLP.

En la Figura 10 lo cuadros que aparecen sombreados (ratones macho control y tratamiento con DOX) indican que estos animales fueron los mismos que se utilizaron en la primera etapa representada en la Figura 9. Los procedimientos experimentales utilizados en ambas etapas se describen a continuación.

3.1. Animales

Los estudios con animales se realizaron bajo protocolo de investigación aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. El protocolo se ejecutó de acuerdo con la norma oficial mexicana Norm 062-ZOO-1999 [64] y con las recomendaciones de la Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health [65].

Ratones macho y hembra de la cepa CD1 se mantuvieron en cajas estériles con cama de aserrín estéril en condiciones de temperatura, humedad y ruido constantes desde el nacimiento y durante las 5 semanas de tratamiento (semanas 10-14). Los animales estuvieron bajos ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Consumieron agua y comida (standard PMI 5001 feed) a libre demanda. Se sacrificaron la semana siguiente a la última administración de DOX en una cámara de CO_2, por lo que quedaron dormidos antes del sacrificio, eliminando así el sufrimiento. Las alteraciones en el peso se midieron semanalmente.

Los animales fueron divididos en dos grandes grupos: control (C) y tratamiento (T). El grupo C (n=13) se dividió a su vez en 3 subgrupos (C-1, C-2 y C-3) y el grupo T (n=36) se dividió en 5 subgrupos (T-1, T-2, T-3, T-4 y T-5) como se muestra a continuación.

C-1 machos (n=4): control ^{18}F-FDG
C-2 machos (n=4): control ^{67}Ga-citrato
C-3 hembras (n=5): control ^{67}Ga-citrato
T-1 machos (n= 6): DOX-^{18}F-FDG
T-2 machos (n= 8): DOX ^{67}Ga-citrato
T-3 hembras (n=9): DOX ^{67}Ga citrato
T-4 machos (n=7): DLP ^{67}Ga citrato
T-5 hembras (n=6): DLP ^{67}Ga-citrato

3.1.1. Animales del grupo control.

A los 13 ratones del grupo control (C-1, C-2, C-3) se les administró intravenosamente 100 μL de solución salina bajo anestesia de isoflurano, durante 5 semanas una vez por semana (semanas 10-14 de vida). El peso de cada ratón se determinó inmediatamente antes de cada dosis semanal. Una semana después de la última administración (semana 15 de vida), los ratones del grupo C-1 se inyectaron con 800 – 1000 μCi de ^{18}F-FDG y los de los grupos C-2 (machos) y C-3 (hembras) se inyectaron con 600-800 μCi de ^{67}Ga-

citrato por vía retroperitoneal. Todos los ratones estuvieron bajo 8 h de ayuno antes de la inyección del RF.

Los animales inyectados con ^{18}F-FDG (C-1) se sacrificaron 1 h después de administrado el producto. A los animales inyectados con ^{67}Ga-citrato (C-2 y C-3) se le suspendió el ayuno 30 min después de la administración del RF, y fueron libres de consumir alimento por las siguientes 20 h. Estos ratones se sacrificaron después de 24 h de administrado el RF y 4 h de ayuno. El sacrificio se realizó en una cámara de CO_2 que gradualmente libera un flujo de O_2 a 0.5 L/min/10 min. Se les extrajo la sangre, el corazón, el bazo, el hígado, el páncreas, los pulmones, los riñones, el cerebro, el timo y los testículos. De igual manera, se extrajo la grasa gonadal, inguinal y retroperitoneal (en el caso de las hembras se extrajeron los ovarios y la grasa pélvica). Los órganos y las grasas fueron traspasados a bolsas de nylon taradas. La actividad debida al ^{18}F-FDG o al ^{67}Ga-citrato se determinó en un medidor de actividad calibrado (Capintec Inc, CRC-55tR). Después de cuantificar la actividad presente en la sangre extraída de cada animal, esta se centrifugó para separar el plasma y se determinaron los valores de las enzimas CK, CK-MB, AST y LDH.

Una hora antes del sacrificio, a los ratones hembra (C-3) se les evaluó el ciclo estral mediante citología vaginal. Se insertaron suavemente en el orificio vaginal 0.5 mL de solución salina fisiológica; seguidamente la solución se absorbió con una micropipeta y se depositó nuevamente en la vagina. Este procedimiento se repitió 3 veces. Después de la tercera repetición se depositó una gota del líquido absorbido en un portaobjetos y se añadió una gota de azul de metileno 1%. El portaobjetos se cubrió con un cubreobjetos y se examinó bajo el microscopio.

3.1.2. Animales de los grupos bajo tratamiento

A los 36 animales del grupo tratamiento se les aplicó el mismo procedimiento que al grupo control con la diferencia que en lugar de solución salina se les administró DOX

(T-1, T-2 y T-3) o DLP (T-4 y T-5). Ambos productos se administraron intravenosamente durante 5 semanas a dosis de 5 mg/kg para lograr una dosis total acumulada de 25 mg/kg. Una semana después de la última administración de DOX o DLP los animales del grupo T-1 se inyectaron con ^{18}F-FDG y los animales de los grupos restantes se inyectaron con ^{67}Ga-citrato, como se describe en el punto 3.1.1. De igual manera se determinó el ciclo estral de las hembras (T-3 y T-5) y se cuantificaron las enzimas CK, CK-MB, AST y LDH.

3.2. Captación de los Radiofármacos en los Órganos

Para cada RF se determinó el ratón que presentó mayor tiempo de distribución (tiempo transcurrido desde la inyección del RF hasta el sacrificio) La actividad de cada órgano y grasas de todos los animales se corrigió a ese valor de tiempo. A partir del valor de actividad corregido, el valor de la actividad total inyectada, y el peso del órgano o la grasa se determinó el valor de captación del RF como % de la actividad total inyectada acumulada en el órgano/ peso del órgano (Captación = %AA/peso del órgano en g).

3.3. Análisis Estadístico

Las diferencias entre los grupos control y tratamiento con DOX (etapa 1) se evaluaron mediante la prueba U de Mann Whitney. En la comparación de los tratamientos con DOX y DLP (etapa 2) se usó el ANOVA de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de comparación de medias de Tuckey. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$ para la prueba de 2 colas. Las variables contrastadas fueron: pérdida de peso, peso de los órganos, valor de las enzimas, % de captación de ^{18}F-FDG y % de captación de ^{67}Ga-citrato.

4.0 Resultados

4.1. Control del peso de los ratones

Una de las variables que se emplea para evaluar los efectos nocivos de un medicamento es el cambio de peso de los animales de experimentación. Una pérdida de peso de 15-20% se considera significativa [66]. La Tabla 1 muestra la diferencia en el peso corporal Δ, expresada en %, de todos los ratones utilizados desde el inicio del tratamiento (t_0) hasta el día del sacrificio (t_f) en la semana 15. En el grupo C-1+ C-2 la diferencia fue positiva, y en los grupos restantes, negativa. En el grupo C-1 + C-2 los ratones 3 y 5 no variaron de peso. En el grupo C-3, contrario a lo esperado, los ratones 2, 3, 5 y 6 perdieron peso durante el experimento. En el grupo T-4 el ratón 3 ganó peso durante el tratamiento.

Tabla 1. Control del peso de los animales durante el tratamiento

		Ratón													
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
C-1+ C-2	**Peso t_0, (g)**	40	37	40	39	38	37	34	44						
(n = 8)	**Peso t_f, (g)**	41	40	40	42	38	40	38	48						
	Δ, %	2.5	8.1	0	7.7	0	8.1	11.8	9.1						
C-3	**Peso t_0, g)**	34	36	39	34	35	30	30							
(n=7)	**Peso t_f, (g)**	35	34	37	35	33	28	31							
	Δ, %	2.9	-5.6	-5.1	2.9	-5.7	-6.7	3.3							
T-1+T-2	**Peso t_0, (g)**	37	44	42	43	42	51	44	44	41	44	44	51	44	44
(n = 14)	**Peso t_f, (g)**	34	40	37	37	41	50	42	40	30	37	40	51	32	44
	-Δ, %	8.1	9.1	11.9	14	2.4	2	4.5	9.1	27	15.9	9.1	0	27	0
T-3	**Peso t_0, (g)**	28	37	37	42	33	35	35	34	37					
(n=9)	**Peso t_f, (g)**	26	35	34	40	32	34	32	31	34					
	-Δ, %	7.1	5.4	8.1	4.8	3.0	2.9	8.6	8.8	8.1					
T-4	**Peso t_0, g)**	30	33	33	42	40	35	39							
(n=7)	**Peso t_f, (g)**	25	32	34	38	30	34	31							
	-Δ, %	16.7	3.0	+3.0	7.1	25	2.9	20.5							
T-5	**Peso t_0, g)**	36	35	33	34	35	32								
(n=6)	**Peso t_f, (g)**	28	22	22	17	24	17								
	-Δ, %	15.1	37.1	33.3	50	31.4	46.9								

La ganancia de peso del grupo C-1 + C-2 estuvo en el rango 2.5% - 11.8% (promedio 5.9%, incluyendo los ratones 3 y 5). En el grupo C-3 la variación de peso fue muy grande, desde -6.7% a +3.3% (promedio -2%). Se esperaba que, al igual que los machos, el grupo mostrara ganancia de peso durante el experimento.

En los animales tratados con DOX (T-1 + T-2) los ratones 12 y 14 no variaron el peso durante el tratamiento. En el grupo T-2 el ratón 9 murió después de la última dosis de DOX y no se utilizó en los experimentos de biodistribución por lo que el grupo quedó con una n=7. El ratón 13 sin embargo, se utilizó en los experimentos de biodistribución debido a que la pérdida de peso superior al 20% se manifestó el día del sacrificio. La pérdida de peso de este grupo estuvo en el rango de -2% a -27% (promedio -10.0%). En el caso de las hembras (T-3) todas manifestaron una pérdida de peso que estuvo en el rango -2.9 a -8.8% (promedio - 6.3 %).

En los animales tratados con DLP, a excepción del ratón 3 del grupo T-4, que mostró un aumento de peso del 3%, el resto presentó una apreciable pérdida de peso. En este grupo la variación de peso estuvo en el rango de -25% a +3.0% (promedio -10.7%). El ratón 5 del grupo T-4 murió después de la última dosis de DLP por lo que no se utilizó en el experimento de biodistribución, quedando el grupo con n=6. El grupo T-5 mostró una situación muy desfavorable. La pérdida de peso de los animales de este grupo estuvo en el rango de -22.2% a -50% (promedio -36.8%). Después de la última dosis de DLP solo sobrevivieron los ratones 2 y 3. Todos los animales de este grupo presentaron síntomas de caquexia en la semana posterior a la última dosis de DLP.

Variaciones significativas en la pérdida de peso de animales tratados con DOX, atribuidas a un estado metabólico desfavorable, se han obtenido por otros autores a mayores dosis que las usadas en el presente trabajo [24,32, 67-69]. Se esperaba que los animales tratados con DLP tuvieran menor pérdida de peso debido a la menor toxicidad que la DOX encapsulada induce con respecto a la DOX libre [11,12,44,70].

La variación de peso que se produjo en los grupos control y tratamiento mostró que la DOX produjo una significativa reducción de peso en los ratones macho ($p< 0.05$), pero no en las hembras ($p>0.05$). El tratamiento con DLP produjo pérdida significativa de peso tanto en machos como hembras ($p<0.05$).

4.2. Peso de los órganos de los ratones en el momento del sacrificio

4.2.1. Peso de los órganos de los ratones macho

La Tabla 2 muestra el promedio y la desviación estándar (media ± DE) del peso de los órganos de los ratones de los grupos control (C-1+ C2), tratamiento con DOX (T1+T2) y tratamiento con DLP (T-4) una semana después de la última dosis de medicamento. Los valores se refieren al momento en que los animales fueron sacrificados. Se muestra también el valor de *p* obtenido en la comparación de los grupos mediante ANOVA de Kruskal-Wallis

Tabla 2. Control del peso de los animales durante el tratamiento

Órgano	Peso de los órganos (g)			*p* Kruskal-Wallis
	Control ± DE C-1 + C-2 (n = 8)	DOX ± DE T-1+T-2 (n = 13)	DLP ± DE T-4 (n=6)	
Bazo	0.24±0.06	0.24±0.11	0.33±0.17	0.21
Cerebro	0.49±0.06	0.51±0.03	0.50±0.1	0.21
Corazón	0.22±0.02	0.22±0.02	0.23±0.11	0.14
Hígado	2.46±0.17	2.58±0.51	1.95±0.33	0.02
Páncreas	0.37±0.1	0.32±0.05	0.27±0.12	0.06
Pulmones	0.47±0.07	0.40±0.05	0.41±0.14	0.11
Riñones	0.67±0.07	0.65±0.1	0.53±0.14	0.04
Testículos	0.35±0.05	0.14±0.03	0.28±0.35	0.005
Timo	0.06±0.03	0.03±0.02	0.04±0.03	0.05
Grasa Gonadal	0.44±0.17	0.23±0.1	0.20±0.13	0.01
Grasa Inguinal	0.32±0.13	0.25±0.18	0.43±0.46	0.33
Grasa Retroperitoneal	0.11±0.08	0.05±0.06	0.07±0.12	0.03

La prueba ANOVA mostró diferencias significativas en hígado, riñones, testículos, grasa gonadal y grasa retroperitoneal. La prueba de Tukey mostró que la variación significativa en el peso de los testículos, grasa gonadal y grasa retroperitoneal se debió a la DOX, en tanto que la variación del peso de hígado y riñones se debió a la DLP. El timo mostró una disminución de peso del 50%, pero debido a la gran variabilidad se obtuvo una *p* dudosa (p=0.05). Se realizó entonces una prueba U de Mann Whitney para comparar por separado cada tratamiento con el control. El tratamiento con DOX arrojó diferencias significativas (p=0.03) con respecto al control, pero no el tratamiento con DLP (p=0.08). La degeneración del timo a causa de la DOX, capaz incluso de comprometer el sistema inmune, ha sido reportada [71]. Los testículos constituyen uno de los órganos diana de la DOX, cuya distrofia se aprecia incluso a dosis menores a las utilizadas en nuestro experimento [10,30,31]. Las grasas disminuyen también de manera significativa durante el tratamiento con DOX [32]. La influencia de DLP en el peso de hígado y riñones se debe, probablemente, a que los liposomas se atrapan fácilmente por las células fagocíticas del hígado y se aclaran por la vía renal [43,44] por lo que tienden a afectar ambos órganos.

Aunque los cambios en el peso de los órganos constituyen una variable útil en estudios toxicológicos, no siempre se correlacionan con las variaciones del peso de todo el cuerpo [72]. Algunos autores han señalado que la DOX no provoca cambios significativos en el peso de los riñones, el corazón y el tejido adiposo retroperitoneal de animales tratados [10,24,68]. Otros autores señalan, sin embargo, significativa pérdida de peso en bazo a dosis superiores a las empleadas en nuestro estudio, que atribuyen a la toxicidad inducida por la DOX [73].

4.2.2. Peso de los órganos de los ratones hembra

La Tabla 3 muestra el promedio y la desviación estándar (media ± DE) del peso de los órganos de los ratones hembra de los grupos C-3, T-3 y T-5 empleados para evaluar la

toxicidad inducida por la DOX (T-3) y la DLP (T-5). Los valores se refieren al momento en que los animales fueron sacrificados. Se muestra también el valor de *p* obtenido en la comparación de los grupos mediante ANOVA de Kruskal-Wallis.

Tabla 3. Peso de los órganos de los ratones hembra de los grupos control (C-3) y tratamiento con DOX (T-3) y DLP (T-5) el día del sacrificio

Órgano	Peso de los órganos (g)			*p* Kruskal-Wallis
	Control ± DE C-3 (n = 7)	DOX ± DE T-3 (n = 9)	DLP ± DE T-5 (n=2)	
Bazo	0.21±0.05	0.28±0.14	0.27±0.18	0.57
Cerebro	0.48±0.04	0.48±0.03	0.40±0.01	0.004
Corazón	0.17±0.02	0.18±0.02	0.126±0.001	0.003
Hígado	1.79±0.24	2.11±0.34	1.36±0.30	0.002
Páncreas	0.28±0.06	0.27±0.06	0.16±0.05	0.008
Pulmones	0.42±0.11	0.34±0.06	0.46±0.25	0.36
Riñones	0.46±0.04	0.42±0.03	0.32±0.02	0.0009
Ovarios	0.03±0.01	0.02±0.01	0.017±0.001	0.0008
Timo	0.06±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.0006
Grasa Gonadal	0.24±0.40	0.03±0.02	0	0.001
Grasa Inguinal	0.46±0.12	0.32±0.14	0	0.002
Grasa Retroperitoneal	0.07±0.03	0.04±0.03	0	0.003
Grasa pélvica	0.34±0.15	0.13±0.09	0	0.0009

La prueba ANOVA mostró que excepto en bazo y pulmones todos los órganos de los ratones hembra mostraron cambios significativos durante el tratamiento. El efectuar la comparación de medias de Tukey se pudo precisar que la DOX afectó riñones, ovarios, timo, grasa gonadal y pélvica. Por su parte, DLP influyó de manera significativa en cerebro, corazón, hígado, páncreas, riñones, ovarios, timo y todas las grasas, corroborando el deplorable estado observado en los animales del grupo T-5, cuya mortalidad, una semana después de concluido el tratamiento, alcanzó el 67%.

4.3. Control de enzimas el día del sacrificio

La Tabla 4 muestra el promedio con sus respectivas desviaciones estándar (media ± DE), el valor de la mediana y el rango de las enzimas medidas en los animales el día del sacrificio, así como el valor de *p* obtenido en la comparación de los grupos mediante ANOVA de Kruskal-Wallis.

Tabla 4. Valores de las enzimas de los ratones el día del sacrificio

Ratones	**Enzima**		**Nivel en plasma**			***p*** **Kruskal-Wallis**
			Control	**DOX**	**DLP**	
Machos	**CK**	**Media ± DE**	441 ± 265	529 ± 284	449 ± 174	0.89
		Mediana	384	445	482	
		Rango	110 - 812	147 - 1008	178 - 657	
	CK-MB	**Media ± DE**	236 ± 57	413 ± 319	282 ± 56	0.05
		Mediana	213	292	261	
		Rango	163 - 304	217 - 1342	235 - 372	
	AST	**Media ± DE**	207 ± 85	262 ± 243	258 ± 78	0.37
		Mediana	195	194	252	
		Rango	104 - 372	82 - 1015	142 - 380	
	LDH	**Media ± DE**	981± 246	1138 ± 430	1642 ± 128	0.02
		Mediana	943	1058	1678	
		Rango	676 - 1934	581 - 1917	1393 - 1737	
Hembras	**CK**	**Media ± DE**	292±207	520±831	347 ±56	0.33
		Mediana	216	226	347	
		Rango	134 - 526	125- 1728	308 -386	
	CK-MB	**Media ± DE**	208±72	182±57	304 ± 35	0.03
		Mediana	174	154	304	
		Rango	158 - 290	145 - 247	280 -329	
	AST	**Media ± DE**	146±90	133±37	177±30	0.09
		Mediana	120	127	177	
		Rango	71 - 246	99 - 172	156 - 199	
	LDH	**Media ± SD**	968±190	990±322	1950 ± 432	0.005
		Mediana	944	995	1950	
		Rango	791 - 1170	667 - 1310	1645 -2255	

El ANOVA mostró diferencias significativas en los valores de LDH de machos y hembras con respecto al control, así como en los valores de CK-MB de hembras. Al realizar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey, se encontraron diferencias significativas en los valores promedio de LDH en el grupo DLP con respecto al control tanto en machos como en hembras.

Como la CK-MB en machos dio una *p* dudosa (p=0.05), se realizó una comparación mediante U de Mann Whitney entre los valores de CK-MB de los grupos control y DOX. El resultado arrojó diferencias significativas (p=0.02) entre estos dos grupos por lo que se concluyó que en machos el tratamiento con DOX produjo mayor cardiotoxicidad que con DLP. En el caso de las hembras, la CK-MB, no mostró diferencias de los tratamientos con respecto al control.

4.4. Biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-Citrato en ratones macho.

4.4.1. Biodistribución de ^{18}F-FDG

El mayor tiempo de distribución del ^{18}F-FDG (tiempo entre la inyección del RF y el sacrificio del animal) encontrado entre todos los ratones inyectados (grupos C-1 y T-1) fue de 160 min. Por tanto, todos los valores de captación de ^{18}F-FDG (% actividad administrada/gramo de órgano) se corrigieron a este valor. Un animal del grupo T-1 presentó una captación extremadamente baja en todos los órganos por lo que no se utilizó en el análisis. El grupo quedó finalmente con una n=5. La Tabla 5 muestra el promedio y desviaciones estándar (media ± DE) de dicho parámetro en ambos grupos y el valor de *p* encontrado al efectuar la comparación mediante la prueba U de Mann Whitney.

La tabla muestra que, a excepción de la grasa retroperitoneal, cuya captación fue menor, en el grupo T-1, la captación de ^{18}F-FDG tiende a ser mayor en el grupo tratado que en el grupo control, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el caso de sangre, bazo, cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñón y grasa inguinal, todos órganos diana conocidos de la DOX [10].

Tabla 5. Biodistribución de ^{18}F-FDG (% A. A/g tejido) en los grupos C-1 (control) y T-1(tratado con DOX)

Órgano	%(A.A/g) ^{18}F-FDG				
	Control C-1 (n = 4)		Doxo T-1 (n = 5)		*p* U Mann W
	Media	DE	Media	DE	
Sangre	0.17	0.05	0.28	0.09	0.03
Bazo	1.01	0.09	1.60	0.32	0.01
Cerebro	2.23	0.19	3.47	0.44	0.01
Corazón	5.18	0.57	11.54	5.24	0.01
Hígado	0.34	0.07	0.52	0.10	0.02
Páncreas	0.44	0.11	0.63	0.22	0.40
Pulmón	0.84	0.10	1.11	0.09	0.01
Riñón	0.35	0.06	0.80	0.25	0.01
Testículos	1.00	0.15	1.20	0.32	0.40
Timo	1.08	0.17	1.20	1.22	0.83
Grasa Gonadal	0.15	0.10	1.01	0.89	0.42
Grasa inguinal	0.47	0.18	1.60	0.59	0.01
Grasa retroperitoneal	1.20	1.60	0.79	0.87	0.42

4.4.2. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato

El mayor tiempo de distribución del ^{67}Ga-citrato (tiempo entre la inyección del RF y el sacrificio del animal) encontrado entre todos los ratones inyectados (C-2 y T-2) fue de 1727 min, por lo que los valores de captación se corrigieron a este tiempo. La Tabla 6 muestra el promedio y las desviaciones estándar (media ± DE) de la captación del RF en ambos grupos, así como el valor de *p* resultado de la comparación mediante la prueba U de Mann Whitney.

A diferencia de ^{18}F-FDG cuya captación en los animales tratados mostró una clara tendencia a aumentar, la captación del ^{67}Ga-citrato mostró un patrón más complejo. En bazo, pulmón, riñón, testículos y grasa gonadal la captación aumentó con respecto al grupo control y en los restantes tejidos, disminuyó, manteniéndose sin variación en cerebro. Sin embargo, solo resultó estadísticamente significativo ($p<0.05$) en páncreas y pulmón. No existe consenso en cuanto a la biodistribución del ^{67}Ga-citrato, pues los resultados dependen de múltiples factores, que se analizan en la discusión de los resultados.

Tabla 6. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato (%A. A/g tejido) en los grupos C-2 (control) y T-2 (tratado con DOX)

Órgano	**%(A.A/g) ^{67}Ga-Citrato**				
	Control C-2 (n = 4)		**Doxo T-2 (n = 7)**		***p***
	Media	**DE**	**Media**	**DE**	**U Mann W**
Sangre	0.63	0.39	0.36	0.26	0.14
Bazo	1.07	0.17	1.24	0.49	0.51
Cerebro	0.06	0.06	0.06	0.02	0.72
Corazón	0.33	0.12	0.33	0.09	1.00
Hígado	2.45	0.40	2.42	0.84	0.87
Páncreas	1.26	0.25	0.84	0.39	0.05
Pulmón	0.59	0.13	1.09	0.33	0.006
Riñón	2.72	0.35	3.83	2.01	0.19
Testículos	0.48	0.10	0.68	0.16	0.07
Timo	1.42	0.66	0.94	0.39	0.10
Grasa Gonadal	0.37	0.23	0.45	0.26	0.75
Grasa Inguinal	0.90	0.40	0.72	0.31	0.42
Grasa Retroperitoneal	0.79	0.22	0.50	0.29	0.10

4.5. Biodistribución de ^{67}Ga-Citrato en ratones macho y hembras.

4.5.1. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato en machos tratados con DOX y DLP

El mayor tiempo de distribución del ^{67}Ga-citrato (tiempo entre la inyección del RF y el sacrificio del animal) encontrado entre todos los ratones inyectados (C-2, T-2 y T-4), fue de 1875 min, por lo que los valores de captación se corrigieron a este tiempo. La Tabla 7 muestra el promedio y las desviaciones estándar (media ± DE) de la captación del RF en los tres grupos, así como el valor de *p* resultado de la comparación mediante ANOVA de Kruskal-Wallis.

Tabla 7. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato (% A. A/g tejido) en machos de los grupos control (C-2) y tratamiento con DOX (T-2) y con DLP(T-4)

Órgano	%(A.A/g) ^{67}Ga-Citrato			*p* Kruskal-Wallis
	Control ± DE C-2 (n = 4)	DOX ± DE T-2 (n = 7)	DLP ± DE T-4 (n=6)	
Sangre	0.61±0.38	0.35±0.26	1.57±0.47	0.003
Bazo	1.05±0.16	1.21±0.48	1.87±0.84	0.047
Cerebro	0.06±0.06	0.06±0.02	0.05±0.03	0.73
Corazón	0.32±0.12	0.33±0.09	0.54±0.22	0.09
Hígado	2.40±0.39	2.37±0.82	3.89±1.19	0.01
Páncreas	1.24±0.24	0.82±0.38	1.35±0.41	0.04
Pulmones	0.58±0.13	1.06±0.32	1.91±0.57	0.001
Riñones	2.66±0.34	3.74±1.97	6.07±3.25	0.01
Testículos	0.47±0.10	0.66±0.16	1.29±0.83	0.15
Timo	1.39±0.65	0.92±0.38	0.75±0.54	0.09
Grasa Gonadal	0.36±0.22	0.44±0.26	0.67±0.35	0.26
Grasa Inguinal	0.89±0.29	0.71±0.31	1.27±0.55	0.08
Grasa Retroperitoneal	0.78±0.31	0.49±0.28	0.57±0.37	0.22

El ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas en la captación de ^{67}Ga-citrato en sangre, bazo, hígado, páncreas, pulmones y riñones. Sin embargo, al efectuar la prueba de comparación de medias de Tukey se precisó que solo en el caso del pulmón hubo diferencias significativas de los dos tratamientos con respecto al grupo control. Las diferencias observadas en sangre e hígado se deben a la DLP, la diferencia de captación en páncreas se debe a la DOX. En bazo y riñón no se encontraron diferencias significativas probablemente debido a la gran dispersión obtenida en el caso de ambos órganos.

4.5.2. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato en hembras tratadas con DOX y DLP.

La Tabla 8 muestra el promedio y las desviaciones estándar (media ± DE) de la captación de ^{67}Ga-citrato en las hembras de los grupos C-3, T-3 y T-5. Cuatro animales del grupo T-3 mostraron muy bajas captaciones del RF por lo que no se consideraron en la evaluación, quedando el grupo con n=5. En el grupo T-5 murieron 4 animales, como ya se describió, por lo que solo quedaron 2 animales para el experimento de biodistribución. La tabla muestra el valor de *p* resultado de la comparación mediante ANOVA de Kruskal-Wallis.

La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los órganos excepto el páncreas. Al efectuar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas en sangre y grasa gonadal entre los 3 grupos. Este resultado indica que tanto la DOX como la DLP influyeron en la captación del ^{67}Ga-citrato con respecto al control. En cuanto al bazo, corazón, pulmón, riñón, ovarios, timo, grasa inguinal, retroperitoneal y pélvica solo el tratamiento con DLP mostró diferencias con respecto al control.

Tabla 8. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato (% A. A/g tejido) en hembras de los grupos control (C-3) y tratamiento con DOX (T-3) y con DLP(T-5)

Órgano	**%(A.A/g) ^{67}Ga-Citrato**			***P*** **Kruskal-Wallis**
	Control ± DE C-3 (n = 7)	**DOX ± DE T-3 (n = 5)**	**DLP ± DE T-5 (n=2)**	
Sangre	0.68±0.36	0.81±0.42	3.42±1.39	0.007
Bazo	1.58±0.45	1.31±0.70	4.25±1.85	0.007
Cerebro	0.08±0.02	0.07±0.03	0.21±0.09	0.006
Corazón	0.45±0.09	0.51±0.21	1.67±0.87	0.007
Hígado	3.56±0.77	2.67±0.94	5.92±1.11	0.006
Páncreas	1.36±0.28	1.29±0.20	1.58±0.07	0.13
Pulmones	1.03±0.37	1.20±0.53	6.49±2.66	0.007
Riñones	3.53±1.13	4.51±2.33	13.60±5.36	0.007
Ovarios	1.14±0.24	0.85±0.50	2.67±0.46	0.005
Timo	1.48±0.20	0.81±0.81	4.35±1.22	0.003
Grasa Gonadal	0.29±0.13	0.51±0.05	0	0.008
Grasa Inguinal	0.84±0.20	0.78±0.26	0	0.008
Grasa Retroperitoneal	0.30±0.12	0.16±0.31	0	0.006
Grasa pélvica	0.38±0.09	0.45±0.19	0	0.007

5.0 Discusión de los Resultados

5.1 Comparación de la toxicidad inducida por DOX en ratones macho CD1 mediante la biodistribución de ^{18}F-FDG y ^{67}Ga-Citrato.

5.1.1. Mecanismos de toxicidad inducida por la DOX

La DOX se distribuye principalmente en hígado, bazo, riñones y pulmones [74]. Sin embargo, los órganos donde induce mayor toxicidad son corazón, hígado y riñones [10]. También se han reportado efectos tóxicos en pulmones, testículos, bazo, cerebro y grasas [29,32,73]. El grado de toxicidad inducida depende de la dosis administrada y de las características de cada paciente [36,38,73].

Los mecanismos por los cuales la DOX induce toxicidad no están totalmente claros. Se supone que la toxicidad inducida en los tejidos sanos es multifactorial y diferente, en parte, al mecanismo antitumoral [11,35,36,38,39]. Aunque existen criterios contrarios [38,39], la mayoría de los autores coinciden en que el estrés oxidativo provocado por radicales libres y ROS ($O_2^{-\bullet}$, $HO^\bullet$ y H_2O_2) así como el estrés nitrosidativo provocado por las especies reactivas de nitrógeno (RNS), en particular $NO^\bullet$, acompañado de la disminución drástica de antioxidantes endógenos, constituye el elemento inicial que desencadena múltiples respuestas moleculares y celulares [10,13,14,36,38,40,42,53] que inducen apoptosis, necrosis o autofagia celular en dependencia de la dosis administrada y de factores intrínsecos del paciente [14,35,36,40-42]. Algunas respuestas se manifiestan de manera más temprana y otras a más largo plazo y afectan los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y otras biomoléculas que dañan la estructura y función de las mitocondrias y deterioran paulatinamente las células de los diferentes órganos hasta llegar a su muerte.

Los mecanismos de formación de ROS y RNS provocados por la DOX más estudiados hasta el presente son dos:

(1) Enzimas presentes en la mitocondria como óxido nítrico sintasa (NOS) reductasa, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) deshidrogenasa, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADHP), oxidasas (NOX), xantina dehidrogenasa y otras correspondientes al complejo I de la cadena de transporte electrónico, convierten a DOX en un radical semiquinona inestable al reducir el resto quinona de su anillo central (Ver figura 3) [36,38,39,40,41,42,75,76]. Esto provoca en las mitocondrias una elevada transferencia de electrones hacia el O_2 molecular, que conduce a reoxidación de la semiquinona y formación de $O_2^{-\bullet}$ [36,42,68,77]. El ciclo quinona/semiquinona que induce la DOX produce grandes cantidades de $O_2^{-\bullet}$ [39] que puede formar H_2O_2 por neutralización de superóxido dismutasa (SOD) [36,40,42]. El H_2O_2 es una molécula poco tóxica y en condiciones fisiológicas se elimina por catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPX) pero en presencia de metales de transición puede formar radicales $HO^\bullet$ [76]. Por su parte $O_2^{-\bullet}$ puede también iniciar la peroxidación lipídica espontáneamente si el pH<7 [76]. Otra especie que puede producirse es $NO^\bullet$, que al reaccionar con el $O_2^{-\bullet}$ genera peroxinitrito ($ONOO^-$) que es un potente oxidante [36,42]. Todas estas especies reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana lipídica de las células formando lípidos peroxidados, dienos conjugados y aldehídos, entre otros compuestos [36,76]. Como consecuencia, se modifica la estructura de la bicapa lipídica produciendo daño y disfunción de la membrana celular. Las ROS también afectan las proteínas, los ácidos nucleicos, los transportadores y canales de iones [36]. La mayor o menor afectación depende del tejido y las funciones de cada órgano en particular.

(2). En presencia de Fe, el $O_2^{-\bullet}$ y el H_2O_2 formados en el ciclo quinona/semiquinona de la DOX pueden reaccionar entre sí y generar H_2O, $HO^\bullet$ y otros radicales durante la reacción de Haber-Weiss ($O_2^{-\bullet} + H_2O_2 \rightarrow HO^\bullet + O_2 + HO^-$) que genera más radicales libres

[36,40,42,76]. Como DOX puede quelatar metales, forma el complejo DOX-Fe^{3+} [16,36,39] que en presencia de un sistema reductor como NADH-citocromo P450 reductasa, o tioles como cisteína o glutatión, se reduce a DOX-Fe^{2+} que genera $O_2^{-\bullet}$ al reaccionar con el O_2 [38,42,76]. Alternativamente, DOX-Fe^{2+} puede reaccionar con H_2O_2 y producir $HO^{\bullet}$ mediante la reacción de Fenton ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{-} + Fe^{3+}$) [42,76]. A diferencia de otros radicales, el $HO^{\bullet}$ no se neutraliza por las enzimas antioxidantes. Reacciona con los ácidos grasos polinsaturados y forma lípidos peroxidados, dienos conjugados y aldehídos [42,76] que modifican la estructura de la bicapa lipídica y dañan la célula. En ausencia de sistemas reductores DOX-Fe^{3+} puede reducir su propio Fe por una reacción redox intramolecular y formar DOX-$Fe^{2+\bullet}$ y $O_2^{-\bullet}$ .que también promueven la peroxidación lipídica [42,78]. La formación de la DOX semiquinona seguida de la formación de $O_2^{-\bullet}$ se acompaña de la liberación del Fe desde la Ft donde se encuentra almacenado [42,78]. El $O_2^{-\bullet}$puede también extraer Fe desde los clusters Fe-S de las proteínas de la aconitasa citoplasmática para catalizar la producción de más ROS [75,79,80] lo que se genera aún más Fe libre. El H_2O_2, por su parte, puede convertir el Fe^{2+} en Fe^{4+} [78]. Todas estas especies desequilibran la homeostasis del Fe y desencadenan diferentes vías de señalización que conducen a la inflamación y muerte celular por apoptosis, necrosis y ferroptosis [39,81], una forma regulada de necrosis dependiente de Fe observada en riñones y pulmones [81].

5.1.2. Biodistribución de ^{18}F-FDG

El ^{18}F-FDG se introduce en la célula por los mismos mecanismos de la glucosa. Sin embargo, una vez fosforilado por la glucosa 6-hexoquinasa no experimenta el metabolismo posterior de la glucosa libre, pues queda atrapado proporcionalmente a la velocidad de glucólisis celular [46]. Esta circunstancia es la que permite obtener imágenes por PET con ^{18}F-FDG en sitios de alto metabolismo de glucosa como los tumores y los sitios de inflamación/infección. La particularidad de detectar sitios de inflamación independientes de los tumores puede aprovecharse para evaluar la

toxicidad multiorgánica después de concluida la terapia antitumoral ya que la inflamación es una manifestación de la toxicidad [17]. Cambios en la captación de ^{18}F-FDG en corazón se han utilizado como modelo de predicción de cardiotoxicidad inducida por DOX [14].

La biodistribución de ^{18}F-FDG resultó diferente en los animales tratados con DOX con respecto al grupo control (Tabla 5). En ambos grupos el corazón y el cerebro fueron los órganos de mayor captación, de acuerdo con el patrón fisiológico de ^{18}F-FDG [82]. En el resto de los órganos el patrón difiere entre los grupos debido a los cambios fisiológicos inducidos por la DOX. En el grupo control la mayor captación de ^{18}F-FDG después de corazón y cerebro se observó en grasa retroperitoneal, timo, bazo, testículos y pulmón. Se esperaba una mayor actividad en riñones debido a la conocida excreción renal de ^{18}F-FDG. En el grupo tratado con DOX después del corazón y el cerebro la mayor captación se produjo en bazo, timo, testículos, pulmón, grasa gonadal y riñón. En todos los tejidos y órganos evaluados (excepto grasa retroperitoneal) la captación de ^{18}F-FDG en el grupo tratado fue superior con respecto al grupo control, revelando inflamación sistémica, aunque solo fue estadísticamente significativa ($p<0.05$) en corazón, riñón, bazo, cerebro, hígado y pulmón, todos órganos diana de la DOX. También fue significativo el incremento de la captación de ^{18}F-FDG en sangre y grasa inguinal.

La cardiotoxicidad es el efecto secundario más conocido de la DOX y el más estudiado. La captación de ^{18}F-FDG en el corazón de los animales tratados fue 2.2 veces superior a la captación de los animales del grupo control ($p=0.01$) debido a diferentes procesos concomitantes, entre los que destacan:

(a) La formación de ROS y RNS durante el ciclo quinona/semiquinona de la DOX promueven la formación de un complejo de la DOX con la cardiolipina, glicerofosfolípido aniónico que se localiza en la membrana interior de la mitocondria y que desempeña un importante papel en la fosforilación oxidativa y la apoptosis

[36,40,42]. El complejo DOX-cardiolipina es muy susceptible al ataque peroxidativo por ROS, [36,40,42] y provoca que se incremente aún más la producción de ROS y RNS [36,53] Aunque se encuentra en todas las mitocondrias, la concentración de cardiolipina en los cardiomiocitos es particularmente alta [36]. Al modificarse la estructura de la bicapa lipídica mitocondrial como consecuencia de la formación de ROS, RNS y del complejo DOX-cardiolipina, se redistribuyen y concentran los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3. El incremento de GLUT1 es proporcional a la dosis de DOX [83] y facilita la captación y concentración celular de glucosa (y, en consecuencia, de su análogo ^{18}F-FDG).

(**b**). La mitocondria tiene su propio genoma y es muy propensa al estrés oxidativo [42]. El estrés oxidativo provocado por DOX causa lesiones en el ADN mitocondrial (mtDNA) que provocan liberación de más ROS y RNS [36,53]. Las enzimas antioxidantes se encuentran en menor concentración en el corazón con respecto a otras células por lo que los cardiomiocitos no pueden neutralizar la avalancha de ROS y RNS [10,14,36,39,40,84]. Se produce entonces un desbalance que induce mecanismos diversos [40,42,76,83] entre los que destaca la activación de mediadores proinflamatorios (citoquinas, quimiocinas, factores de crecimientos y otros) que atraen células del sistema inmune, (neutrófilos y macrófagos en la fase crónica temprana), hacia la membrana [41,56,85]. Con el fin de atraer más neutrófilos y macrófagos se incrementa la expresión de GLUT1 y enzimas glucolíticas como la hexoquinasa, que fosforila la glucosa para producir glucosa-6-fosfato [36,56]. Se incrementa entonces la captación de glucosa, que es la principal fuente de energía para que estas células inmunitarias puedan llevar a cabo la quimiotaxis y la fagocitosis [56,77].

(**c**) Entre las funciones esenciales de las mitocondrias está la producción de energía mediante síntesis de ATP [36]. Más del 90% del ATP que utilizan las células se produce por la respiración mitocondrial [35]. La producción de ATP se lleva a cabo en la mitocondria por la fosforilación oxidativa que realizan los complejos asociados a la

membrana, en particular NADH deshidrogenasa del complejo I [36,40,42]. En los órganos con alta demanda metabólica (corazón, cerebro, riñón e hígado) la densidad de mitocondrias es mayor [36]. El entorno lipídico de la membrana, alterado por la DOX disminuye la actividad de los complejos de la membrana y la respiración mitocondrial, lo que reduce la producción de ATP y altera el balance energético de las células. [35,36,68] Para mantener el equilibrio energético las células de estos órganos buscan otras vías productoras de ATP. La glucólisis anaerobia, aunque menos eficiente que la fosforilación oxidativa, es una de ellas, por lo que se incrementa el consumo de glucosa a través de la derivación de hexosa monofosfato [35,36,56].

(**d**) La inflamación está íntimamente relacionada con la hipoxia [86]. Cuando el tejido se inflama a causa de la DOX se activa el factor inducible por hipoxia (HIF-1α), un factor de transcripción que promueve la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, la expresión de hexoquinasa, del factor de crecimiento endotelial vascular y de varias enzimas glucolíticas, como mecanismo adaptativo a la pérdida de O_2. En estas condiciones se incrementa el metabolismo de la glucosa y, por consiguiente, aumenta la captación de ^{18}F-FDG. Se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la captación de ^{18}F-FDG y el aumento de HIF-1α [14].

La captación de ^{18}F-FDG en los riñones del grupo tratado con DOX fue 2.3 veces mayor ($p= 0.01$) que en el grupo control (Tabla 5). La nefrotoxicidad de la DOX es un efecto común de este medicamento [10,16,24,25,34,69,87-90]. Los riñones regulan continuamente la composición química de la sangre por lo que son uno de los principales dispositivos homeostáticos del cuerpo. Debido a su baja capacidad de regeneración [34], su susceptibilidad al daño es alta. Aunque los mecanismos por lo que la DOX induce nefrotoxicidad tampoco están totalmente dilucidados se piensa que son similares a los que provocan cardiotoxicidad, en particular el estrés oxidativo y la inflamación causados la formación de ROS y RNS que dañan la mitocondria de las

células renales. [27,69,87]. Al dañarse la mitocondria renal se afecta la producción de energía, las toxinas no pueden liberarse adecuadamente, los riñones no pueden proteger su propio tejido y se altera la función renal. La nefrotoxicidad que causa la DOX es progresiva. Incluye tanto los glomérulos como el epitelio tubular y contribuye al deterioro de la nefrona y a otros procesos patológicos subyacentes [34,89,91,92].

El aumento de la captación de ^{18}F-FDG en los riñones de los animales tratados con DOX se debe a los siguientes mecanismos:

(a) En el epitelio tubular renal y las células mesangiales glomerulares hay mayor expresión de NOS que en otros tejidos [27]. En consecuencia, además de ROS se produce una alta concentración de RNS [36,90], como $NO^{\bullet}$ [27,90,93]. A bajas concentraciones el $NO^{\bullet}$ no es tóxico, pero cuando su concentración aumenta de manera apreciable, reacciona con el $O_2^{-\bullet}$ y produce peroxinitrito ($ONOO^-$), que daña la mitocondria de los podocitos renales [36,40,42]. Además, $ONOO^-$ es capaz de nitrar los residuos tirosina de algunas proteínas renales involucradas en la cascada de inflamación y el proceso apoptótico [24,26,27,39]. La disfunción mitocondrial causada por las ROS y RNS desencadena diferentes mecanismos de señalización celular que deterioran la detoxificación tanto de radicales como de compuestos tóxicos que afectan los glomérulos y las células tubulares proximales renales provocando fallas en la nefrona [67,87,89,92]. A esto se añade que el riñón es una de las vías de excreción de la DOX [26,69,88, 90]. El 50% de la DOX se elimina sin cambios y el otro 50% como metabolitos (13-OH-doxorubicinol, doxorubicinona, doxorubicinolona y 7-deoxirubicinona), de los cuales el 13-OH-doxorubinol (Dox-ol) es más tóxico aún que la DOX [34,38,41,89] Por otra parte, los efectos tóxicos provocados por la DOX en corazón e hígado pueden modular el suministro de sangre al riñón y alterar la desintoxicación xenobiótica favoreciendo indirectamente la nefropatía inducida [26,69,90,88]. Cuando se altera la desintoxicación xenobiótica aumenta la susceptibilidad al daño en todo el cuerpo y en

el propio riñón debido a su papel en la regulación de la composición química de la sangre y de mantenimiento del equilibrio de los fluidos [34]. Para regular la composición del fluido corporal los riñones emplean diversos mecanismos, algunos de los cuales son dependientes de la energía. Por esta razón, las células tubulares consumen ATP [92]. Uno de los efectos de la DOX es reducir la producción de ATP y alterar el balance energético de la célula que, como ya se señaló, incrementa la captación de ^{18}F-FDG.

(**b**) Otro mecanismo que contribuye a aumentar la captación renal de ^{18}F-FDG en los animales tratados con DOX es el incremento de TNF-α, una citoquina que se produce principalmente por macrófagos activados durante la inflamación sistémica. También se produce por monocitos, fibroblastos, mastocitos y células T [29,94]. Cuando TNF-α aumenta se activan diferentes vías de señalización en los glomérulos y se infiltran macrófagos [24,34,88,93] cuya alta expresión de GLUT1 y hexoquinasa, incrementa la captación de glucosa y con ello de ^{18}F-FDG. TNF-α juega un importante papel en la inflamación y la fibrosis glomerular. Sus niveles son proporcionales a la pérdida de la función renal [24].

El aumento de la captación de ^{18}F-FDG en el bazo de los animales tratados con DOX fue 1.6 veces superior ($p=0.01$) con respecto al control (Tabla 5) en correspondencia con el alto metabolismo de glucosa en este órgano [17]. El bazo filtra la sangre, supervisa el sistema inmune y juega un papel importante en el metabolismo de numerosas drogas [17,95]. La toxicidad que la DOX induce en el bazo está ligada a la toxicidad cardiaca (toxicidad esplenocardiaca) y se atribuye, entre otros mecanismos, a una marcada descoordinación de las enzimas metabólicas cicloxigenasas (COX) y lipoxigenasas (LOX) [73]. En particular las LOX regulan el metabolismo inmunocardiaco en coordinación con el bazo [73]. La DOX reduce la población de leucocitos residentes en el bazo, y desregula la expresión de genes pro-y anti-apoptóticos en este órgano [73].

En estas condiciones disminuyen los niveles de LOX y la defensa inmunitaria del bazo. Para compensarla, el bazo aumenta su actividad glucolítica con el propósito de suministrar la energía necesaria para que se activen las células del sistema inmune [17,95]. Como resultado, se incrementa la captación de ^{18}F-FDG. El aumento de la captación de ^{18}F-FDG en el bazo se considera un signo temprano de respuesta inflamatoria sistémica severa. Se ha utilizado para evaluar inmunometabolismo en la inflamación sistémica severa no detectada por parámetros bioquímicos en plasma [17,95].

La mayor captación de ^{18}F-FDG en el cerebro de los animales tratados con DOX también fue 1.6 veces superior ($p=0.01$) con respecto al grupo control (Tabla 5). La DOX no atraviesa la barrera hematoencefálica (BBB) pero induce el incremento de TNF-α circulante debido a su activación en el músculo cardiaco, en los riñones y en las células inmunes [96] TNF-α afecta la diferenciación de macrófagos y prepara a los neutrófilos para que generen ROS y RNS [97]. Cuando el TNF-α circulante atraviesa la BBB se incrementa el TNF-α neuronal residente y causa disfunción mitocondrial ya que provoca estrés oxidativo en las neuronas y activa las células gliales [10,34,96-100]. El estrés oxidativo en las neuronas y la activación de las células gliales induce activación de las proteínas proapoptóticas Bax y p53, apertura de los poros mitocondriales, liberación del citocromo *c* al citoplasma, incremento de la actividad de caspasa 3 y muerte de células TUNEL-positiva [34,96-100]. Estos mecanismos pueden provocar muerte neuronal, desórdenes neurofisiológicos o enfermedades degenerativas [34,96-101]. Se ha reportado que hasta un 75% de los pacientes de cáncer que han recibido tratamiento quimioterapéutico experimentan trastornos cognitivos que pueden persistir incluso años después de concluido el tratamiento [96,101].

La mayor captación de ^{18}F-FDG en el cerebro de los animales tratados, está relacionada con estos mecanismos:

(a) La activación de las células gliales aumenta aún más el TNF-α en el cerebro, particularmente en la corteza y el hipocampo [97,98]. Los altos niveles de TNF-α activan mediadores proinflamatorios que atraen células del sistema inmune [34,41,78] que, como ya se indicó, incrementan la expresión de GLUT1, GLUT3 y enzimas glucolíticas [94], con el consiguiente incremento en la captación de ^{18}F-FDG

(b) El TNF-α activa también la expresión de NOS, por lo que además de las ROS se produce una alta concentración de RNS, en particular $ONOO^-$, implicado en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. [34,97,98] El $ONOO^-$ es un potente inhibidor de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial [97]. Como ya se indicó, es capaz de producir nitrotirosina, que induce degeneración y apoptosis en las neuronas motoras [97]. El $ONOO^-$ incrementa aún más la producción de ROS y RNS que dañan la mitocondria neuronal [96,97] Cuando se daña la mitocondria neuronal disminuye la producción de ATP por fosforilación oxidativa y se incrementa la glucólisis y, por tanto, la captación de ^{18}F-FDG.

En el hígado de los animales tratados con DOX ^{18}F-FDG se captó 1.5 veces más ($p=0.02$) que en el grupo control (Tabla 5). La hepatotoxicidad de la DOX se presenta en el 30-40% de los pacientes tratados con esta antraciclina [34,102-104]. Aunque los mecanismos por los cuales DOX daña los hepatocitos tampoco están totalmente dilucidados, se piensa que el estrés oxidativo resultante de la formación de ROS y RNS induce peroxidación lipídica, daño al ADN, alteración de la integridad de la membrana y agotamiento del ATP[34,102] También se ha reportado que la activación de NF-κB y TNF-α juegan un rol importante ya que su presencia se ha comprobado en el hígado de animales de experimentación sujetos a tratamiento con DOX [29,34,104]. La peroxidación lipídica que producen las ROS y RNS en los hepatocitos, a dosis similares a las usadas en nuestro experimento, disminuye los niveles de glutatión mitocondrial y la expresión de las enzimas antioxidantes e incrementa la formación de

malondialdehído (MDA) y la fuga de LDH [104] En estas condiciones se activa NF-κB, que es un factor de transcripción que participa en la respuesta inflamatoria y la apoptosis [29]. NF-κB induce la expresión de citoquinas proinflamatorias y mediadores inflamatorios como IL-1b, IL-18 y TNF-α [25,87] que atraen células del sistema inmune, hacia la membrana de los hepatocitos [41,56,85]. A su vez TNF-α activa a NF-κB en cooperación con las ROS y las RNS presentes a causa de la DOX [29]. A esto se une el hecho de que la DOX se metaboliza en el hígado y algunos de sus metabolitos, en particular el DOX-ol es aún más tóxico [34,38,41,89]. Los radicales libres que se producen debido a la DOX y sus metabolitos interrumpen el ciclo celular de los hepatocitos y alteran los transportadores y canales de iones [103]. Como consecuencia, se modifica la estructura de la bicapa lipídica produciendo daño y disfunción de la membrana celular que, como ya se indicó, incrementa la captación de ^{18}F-FDG por los mecanismos descritos anteriormente.

En los pulmones de los animales tratados con DOX la captación de ^{18}F-FDG fue 1.4 veces mayor ($p=0.01$) con respecto al grupo control (Tabla 5). La DOX produce inflamación intersticial y fibrosis en el tejido pulmomar [105]. La formación de ROS en el pulmón a causa del ciclo quinona/semiquinona de la DOX es muy alta debido a la elevada exposición al O_2 de este órgano [86]. Cuando la defensa antioxidante del pulmón no puede contrarrestar la alta concentración de ROS, se incrementan los neutrófilos y macrófagos que liberan aún más ROS [106]. Se daña la mitocondria y se producen cambios en la microvasculatura pulmonar que conducen a la hipoxia [107]. En condiciones hipóxicas se activa el factor inducible por hipoxia (HIF-1α), que promueve la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, de hexoquinasa, del factor de crecimiento endotelial vascular y de varias enzimas glucolíticas, como mecanismo adaptativo a la pérdida de O_2. El metabolismo de la glucosa se incrementa y, por consiguiente, aumenta la captación de ^{18}F-FDG. Una alta captación de FDG se ha descrito en enfermedad pulmonar intersticial [105].

En grasa inguinal y sangre también se apreció un incremento significativo de ^{18}F-FDG en los animales tratados con DOX con respecto a los animales del grupo control (Tabla 5). La grasa gonadal también mostró un notable incremento de captación de ^{18}F-FDG en los animales tratados con DOX (6.7 veces), pero debido a la dispersión de los resultados no resultó estadísticamente significativo (p= 0.42). En la grasa retroperitoneal la captación de ^{18}F-FDG fue 0.7 veces menor en los animales tratados con DOX, pero la disminución tampoco resultó significativa (p=0.42). Esta diferencia en la captación de ^{18}F-FDG que mostró el tejido adiposo se corresponde con su importante papel en la homeostasis energética, termorregulación, metabolismo, así como en las respuestas inmune, regenerativa y mecánica [32,108].

La grasa inguinal es uno de los depósitos de tejido adiposo blanco (WAT) en los roedores [72,108] y se considera comparable en localización al depósito gluteofemoral en los humanos [109]. Está asociada a efectos metabólicos protectores, activación de la termogénesis y mejoramiento de la homeostasis de la glucosa [110].

La WAT en conjunto es responsable del 15% de todo el metabolismo de la glucosa y se utiliza para la producción de energía [32]; está asociada al daño cardiovascular y la diabetes mellitus 2 [33,111]. Además de la homeostasis energética, la WAT juega un papel fundamental en otras funciones endocrinas [32,68,111] y en la regulación del almacenamiento, movilización y suministro de ácidos grasos y glucosa [32,33,108]. Entre sus múltiples tareas está la secreción de citoquinas, hormonas y péptidos, denominados en conjunto adipokinas, vitales para mantener las condiciones fisiológicas en estado satisfactorio [32,72,111]. Una de las citoquinas segregadas por WAT es TNF-α que, como se ha descrito, juega un importante papel en la inflamación.

Al igual que en otros órganos, las ROS que se generan en los adipocitos por causa de la DOX producen peroxidación de los lípidos y proteínas de la membrana, activan la cascada distal de señalización, inducen reducción de ATP y movilizan los transportadores de glucosa a la superficie con la consiguiente alteración de la función mitocondrial [32,72,108]. En tales condiciones disminuye la lipogénesis, la adipogénesis y la lipólisis [32,33,109]; se produce un caos sobre el metabolismo de los carbohidratos [68] que se manifiesta, entre otros síntomas, en la disminución del tamaño de los adipocitos y pérdida de peso por disminución de la masa muscular y adiposa En estas condiciones se aumentan los transportadores de glucosa en la superficie de los adipocitos pues los macrófagos se reclutan hacia las grasas para tomar los lípidos disponibles [32,33,68,111].

El peso de las grasas gonadal, inguinal y retroperitoneal (todas forman parte de la WAT) de los animales tratados con DOX (T-1 + T-2) disminuyó 48%, 22% y 55% respectivamente (Tabla 2). Esta disminución de peso se evidenció también por la pérdida de peso corporal que experimentaron estos animales en comparación con el grupo control (Tabla 1).

La menor captación de ^{18}F-FDG en la grasa retroperitoneal del grupo tratado con DOX resultó inesperada. La DOX reduce los niveles de adinopectina en el tejido adiposo retroperitoneal y la fosforilación por AMPK [32,68]. Al disminuir la fosforilación de AMPK para producir ATP debía aumenta la captación de ^{18}F-FDG, como se ha descrito. Será necesario profundizar en este aspecto para una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales la DOX influye en el metabolismo de las grasas.

La mayor actividad de ^{18}F-FDG en la sangre de los animales tratados con DOX se debe a que al afectarse el metabolismo a causa de la toxicidad inducida se afecta la farmacocinética habitual de ^{18}F-FDG.

5.1.3. Biodistribución de ^{67}Ga-citrato

El ^{67}Ga-citrato se utiliza desde hace varias décadas en la localización por SPECT de tumores, lesiones infecciosas/inflamatorias, en el estudio de fiebre de origen desconocido y en la evaluación de la respuesta al tratamiento de linfomas [59,112-114]. El mecanismo de acumulación del ^{67}Ga citrato en los tejidos es diferente al del ^{18}F y su biodistribución es más compleja. Depende de la edad, sexo, ingesta, viabilidad del tejido, niveles plasmáticos de apo-transferrina, entre otros factores [58]. La interpretación de las imágenes también es más difícil. Una vez inyectado, el ^{67}Ga-citrato se disocia y el Ga^{3+} compite con el Fe^{3+} por los sitios de enlazamiento a la transferrina (Tf), a la cual se enlaza con más fortaleza que el Fe^{3+} [115] y circula en forma de complejo Ga-Tf. [58,59,113,115]. Sin embargo, el metabolismo de Fe y Ga, aunque similares no son idénticos. Ambos metales penetran en las células principalmente a través de los receptores1 de transferrina (TfR1), aunque también pueden hacerlo por mecanismos independientes [59,116]. Por ej: el ^{67}Ga puede entrar a la célula por difusión pasiva simple [59]. El Fe^{3+} se libera de la Tf en las endosomas, donde se reduce a Fe^{2+} por una ferrireductasa o por ascorbato, y en forma de Fe^{2+} se transporta hacia el citoplasma por los transportadores de metales divalentes (DMT-1, ZIP-14 y/o ZIP-8) [113,116,117]. El ^{67}Ga, sin embargo, no puede reducirse *in vivo* [59] por lo que una vez dentro de la célula se libera a la endosoma en forma de Ga^{3+} [118]. Mientras que todo el Fe se descarga al citoplasma y se acumula dentro de las células en la ferritina (Ft) para utilizarse según las necesidades [38,39,75] una fracción significativa de Ga no se incorpora al citoplasma y vuelve a salir al espacio extracelular [59]. El enlazamiento del Fe a una proteína promueve la función de ésta, mientras que el ^{67}Ga altera la función de las proteínas en las cuales sustituye al Fe [59]. Estas diferencias *in vivo* contribuyen a que la farmacocinética del Ga y el Fe también difiera. En individuos normales la constante de velocidad de eliminación del Ga es 50 veces menor que la del Fe por lo que este último se aclara más rápidamente de la sangre que el Ga [59].

No se sabe con exactitud cómo el ^{67}Ga se incorpora en los tejidos inflamados, aunque las vías más aceptadas son (**a**) a través de los TfR1, (**b**) por difusión simple del ion Ga^{3+} [59,116] (**c**) por unión a las proteínas enlazadoras de Fe presentes en el espacio extracelular del tejido inflamado [115,118]. En estos mecanismos, al parecer, el papel principal lo juega su comportamiento similar al Fe^{3+}.

El patrón de biodistribución del ^{67}Ga-citrato fue diferente en los animales sanos y los tratados con DOX (Tabla 6). En ambos grupos los órganos que mostraron mayor captación fueron riñón e hígado, en correspondencia con la captación fisiológica del $^{67}Ga^{3+}$ [59]. En los animales sanos, después de riñón e hígado la captación siguió el orden timo, páncreas, bazo, grasa inguinal, grasa retroperitoneal y resto. En los animales tratados, después de riñón e hígado la captación siguió el orden bazo, pulmón, timo, páncreas y resto, pero sólo resultó significativa ($p<0.05$) en pulmón y páncreas.

La captación de ^{67}Ga-citrato en los pulmones de los animales tratados fue 1.8 veces superior ($p= 0.006$) a la captación del grupo control (Tabla 6) en correspondencia con su conocida acumulación en los macrófagos alveolares y los espacios intersticiales del pulmón cuando estos se encuentran dañados [113]. La captación pulmonar de ^{67}Ga-citrato es proporcional a la actividad inflamatoria pulmonar [119]. En una gran cantidad de casos ocurre mucho antes de que pueda visualizarse nítidamente mediante rayos X [113]. A diferencia del ^{18}F-FDG cuya captación en los tejidos dañados por la DOX depende del aumento de la captación de glucosa, en el caso del ^{67}Ga-citrato la captación depende de su interferencia en la homeostasis del Fe.

Los principales mecanismos por los que el ^{67}Ga-citrato se acumula en los pulmones son: (**a**)Las secreciones de las vías respiratorias, las células epiteliales y los macrófagos alveolares tienen altos niveles de LcF y sus receptores (LcFR) [120-123]. La LcF se sintetiza también por los acinos glandulares del árbol bronquial [122]. De ahí que en los pulmones inflamados existan altos niveles de LcF en el espacio extracelular,

originados tanto por la síntesis como por la presencia de neutrófilos y macrófagos [58,113]. El complejo Ga-Tf llega a los sitios de inflamación pulmonar debido al incremento del flujo sanguíneo y de la permeabilidad vascular. A pH neutro, o ligeramente ácido, el Ga^{3+} se une más fuertemente a la LcF que a la Tf [58,59,122] por lo que se transquela desde el complejo Ga-Tf del suero sanguíneo hacia la LcF presente en el sitio de inflamación pulmonar [58,59,113] Además, los neutrófilos y macrófagos tienen también Lcf en su interior [59,114] por lo que el ^{67}Ga, una vez endocitado a través de los TfR y LcFR se une a la LcF que se encuentra en el interior de los neutrófilos y macrófagos alveolares [59,113]. Se ha determinado que una alta proporción del ^{67}Ga captado en los neutrófilos se encuentra unido a la LcF presente en su interior [58]. En condiciones normales la LcF no juega un papel importante en la captación del ^{67}Ga, pero en condiciones patológicas la captación de ^{67}Ga aumenta debido a la elevación de las concentraciones de LcF en el pulmón.

(**b**) Los niveles fisiológicos de Fe en el pulmón son altos y su homeostasis está regulada de forma muy precisa [120,123]. Las células del pulmón están expuestas no solo al Fe circulante, sino también al Fe presente en las partículas que se inhalan [120]. Las células epiteliales pulmonares sintetizan Ft a fin de almacenar el Fe en forma de complejo Fe-Ft [116,120]. Sin embargo, el Fe también se puede encontrar de forma transitoria en una "piscina de hierro lábil" (LIP) en el citoplasma, cuyo tamaño varía según el tipo de célula [80,116,]. Esta "piscina" sirve como depósito intermedio que distribuye al Fe para que sea almacenado como Fe-Ft o se utilice para las funciones metabólicas de las células (incorporado a las proteínas o para la síntesis de heme [116]). El Fe que la célula no requiere se libera al plasma a través de la ferroportina (Fpn), mediado por la ceruloplasmina, y se une nuevamente a la Tf. [80,116,120,123,]. Este tráfico de Fe intracelular se lleva a cabo por las proteínas reguladoras del Fe (IRP1 e IRP2) y los elementos sensibles al Fe (IRE)) que son un conjunto de proteínas y enzimas enlazadoras del Fe que contribuyen a regular su homeostasis celular.

[38,41,80,116,124]. La formación de $O_2^{-\bullet}$ (y otros radicales) que provoca la DOX altera todo el intercambio de Fe intracelular pues interfiere con las IRP y los IRE. El $O_2^{-\bullet}$ y la semiquinona de la DOX son capaces de liberar el Fe unido a la Ft o a los clusters Fe-S de las proteínas intracelulares [41,75,80]. La concentración de Fe libre intracelular se incrementa y deslocaliza [38,123]. Cuando la concentración de Fe libre intracelular en el pulmón se eleva demasiado, se incrementan los niveles de Ft en la célula como mecanismo defensivo para limitar la generación de ROS [40,120,80]. A esto se añade que en el líquido que recubre el pulmón la concentración de Ft es extremadamente alta [121]. Aunque la Ft tiene menos afinidad por el Ga que la Tf se ha demostrado que bajo ciertas condiciones puede ocurrir la transquelación del Ga-Tf hacia la Ft [58]. Las altas concentraciones de Ft en el pulmón, tanto extracelular como intracelular, posibilitan entonces la captación del ^{67}Ga por transquelación desde complejo ^{67}Ga-Tf [58,118].

(**c**) El complejo Ga-Tf llega al tejido pulmonar inflamado desde los vasos sanguíneos a través de diferentes receptores [75]. Una vez endocitado, se une a los mucopolisacáridos ácidos, en particular el keratan polisulfato presente en el moco segregado por las células calciformes pulmonares Esto se debe a que los grupos sulfónicos del keratan sulfato se enlazan más fuertemente al Ga^{3+} que al Ca^{2+} y el Mg^{2+} presentes en la estructura pulmonar [60].

(**d**) El Fe y el O_2 interactúan en el entorno pulmonar Los pulmones toman el Fe necesario para sostener su demanda metabólica a partir de la disponibilidad de Fe en plasma [120]. Aproximadamente el 60%-70% del Fe de todo el cuerpo está localizado en los glóbulos rojos (RBC) [120,123] cuya población en los pulmones es grande. Casi todos los RBC que salen del corazón pasan por los capilares alveolares para cargarse de O_2 y transportarlo hacia el resto de los tejidos. [125]. Al aumentar la permeabilidad de los capilares alveolares a causa de la inflamación se puede producir hemorragia al espacio alveolar adyacente debido a ruptura vascular [120]. Esto aumenta los niveles

de Fe libre tanto en el líquido extracelular como en los macrófagos alveolares [120,123,125] lo que promueve el aumento de LcF y Ft que, como ya se indicó, elevan la captación de ^{67}Ga.

(**e**)La hipoxia y la inflamación están interrelacionadas, aunque esta interrelación no está totalmente esclarecida [86,125]. El tejido inflamado puede volverse severamente hipóxico [86]. En condiciones hipóxicas disminuye la glucólisis aerobia y el pH del entorno. Al disminuir el pH del tejido pulmonar inflamado el ^{67}Ga puede separarse del complejo Ga-Tf y penetrar en la célula por difusión pasiva en forma de $^{67}Ga^{3+}$. A esto se añade el hecho de que en un ambiente hipóxico los RBC producen una gran cantidad de ROS que, debido a los cambios producidos en la membrana, pueden fugarse y provocar el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos hacia la microvasculatura pulmonar, lo que conduce al aumento de la captación de ^{67}Ga [125].

El páncreas de los animales tratados con DOX mostró una captación de ^{67}Ga-citrato 1.5 veces menor que la captación del grupo control ($p=0.05$). Se ha sugerido que los agentes quimioterapéuticos inducen desarrollo de diabetes en humanos [127] pero como con frecuencia se administran en forma de cocktail, resulta difícil saber cuál de ellos es el causante. En ratones, sin embargo, se ha demostrado una fuerte correlación dosis-dependiente entre el aumento de triglicéridos y glucosa después del tratamiento con DOX [127]. Asimismo, se ha demostrado que la desregulación de la homeostasis del Fe que produce la DOX también influye en el metabolismo de la glucosa [128] El páncreas contribuye activamente al mantenimiento de la homeostasis de la glucosa y de sus niveles normales en sangre. La DOX inhibe la secreción de insulina pues afecta el metabolismo y la función de las células β-pancreáticas [127]. Se ha reportado que el mecanismo principal por el cual la DOX causa daño en el páncreas es la interrupción de la replicación del ADN por interacción con la topoisomerasa IIβ [34,127] que provoca

distintas reacciones que conducen a la apoptosis con la consiguiente disminución del metabolismo del órgano, lo que disminuye la captación de ^{67}Ga-citrato.

5.1.3.1. Conclusiones parciales

El ^{18}F-FDG detectó la toxicidad inducida por DOX en todos sus órganos diana, excepto testículos y timo en tanto que ^{67}Ga-citrato solo reveló la toxicidad inducida en órganos donde el metabolismo del Fe es particularmente importante como pulmón y páncreas. Se esperaba una mayor captación de ^{67}Ga-citrato en riñones debido a que el Fe también juega un importante papel en el metabolismo renal.

Aunque la reducción del peso de los testículos en los animales tratados con DOX fue significativa (60%, p=0.005), debido a la severa toxicidad que la DOX produjo en este órgano, ^{18}F-FDG no mostró diferencias en la captación con respecto al grupo control y el aumento en la captación de ^{67}Ga (1.4 veces) no resultó significativo (p=0.07)). Los testículos constituyen uno de los órganos diana de la DOX [30,31,129]. El estrés oxidativo en los testículos incrementa la liberación de citoquinas inflamatorias y la inducción de apoptosis en los espermatocitos, disminuye su recuento y motilidad, y deteriora la función testicular [30,31,129]. Sin embargo, ninguno de los dos RF evidenció cambios significativos en testículos. Igualmente sucedió con el timo, órgano que es particularmente importante en el sistema inmunitario de niños y jóvenes. Se ha reportado que la DOX produce severa degeneración del timo, en particular pérdida de peso (evidenciada en nuestro experimento) y disminución de tamaño [71].

Se observó una discrepancia en la captación de ^{18}F-FDG y de ^{67}Ga-citrato en el corazón de los animales tratados con respecto al grupo control. Se esperaba que ambos RF se captaran más en el grupo tratado con DOX, en correspondencia con la conocida cardiotoxicidad inducida por esta droga. Sin embargo, la captación de ^{67}Ga-citrato no mostró diferencias entre el grupo tratado y el grupo control. La homeostasis del Fe en

el corazón es muy compleja y no se conoce a profundidad [41,130]. Cuando se dañan los cardiomiocitos a causa de la DOX se puede producir deficiencia local de Fe independientemente de su concentración sistémica en la hemoglobina pues pacientes con daño cardiaco muestran deficiencia local de Fe, aunque no tengan anemia [130]. La deficiencia de Fe que la DOX provoca en el corazón afecta el metabolismo del O_2 y provoca disminución de la producción de ATP [130] En estas condiciones el corazón requiere mayor cantidad de glucosa para realizar su función, aumentando la captación de ^{18}F-FDG, evidenciada en nuestro experimento. En el caso del ^{67}Ga-citrato un mecanismo (poco dilucidado aún) que pudiera explicar el fenómeno encontrado reside en el hecho de que en el corazón la homeostasis del Fe está íntimamente ligada a los niveles de Fpn/hepcidina [130, 131]. Cuando se desequilibra la homeostasis del Fe en el miocardio a causa de la DOX, aumenta la expresión de hepcidina [130]. Después del hígado, que es el órgano principal de síntesis de hepcidina, el corazón es el órgano con mayor expresión de esta hormona por lo que su papel en la homeostasis del Fe en este órgano es muy importante [130]. Cuando aumenta la expresión de hepcidina a causa de la inflamación disminuye la expresión de Fpn con el fin de que el Fe quede secuestrado en la célula y no se exporte hacia la circulación [130]. La disminución de Fpn aumenta considerablemente el nivel de Fe^{2+} en la LIP de los cardiomiocitos [131]. Se piensa que el corazón es más sensible que otros órganos al tamaño de la LIP [41,131]. Cuando la LIP aumenta considerablemente de tamaño disminuyen los TfR1 para regular la sobrecarga de Fe, y el ^{67}Ga no pude penetrar a las células

Los resultados obtenidos muestran que ^{18}F-FDG refleja mejor la inflamación de los órganos diana de la DOX en correspondencia con su mayor sensibilidad para detectar focos de inflamación [112]. La captación de ^{18}F-FDG depende del aumento de la captación de glucosa en las células del tejido inflamado y en los neutrófilos y los macrófagos reclutados. La captación de ^{67}Ga en el tejido inflamado, sin embargo, depende de diferentes mecanismos no totalmente comprendidos en los que al parecer juegan un papel importante el estado fisiológico de la membrana celular, así como la

presencia de proteínas enlazadoras de Fe en el exudado inflamatorio. La especificidad de ambos trazadores en sitios de inflamación no es alta [14,113,115]. Como RF para imagen el ^{67}Ga-citrato tiene inconvenientes entre los que destacan su dosimetría, el retraso prolongado entre la administración y la toma de imágenes y poca nitidez de las imágenes, pero sigue siendo útil cuando no se dispone de cámaras PET [115].El ^{18}F-FDG tiene una cinética favorable como trazador, deposita bajas dosis de radiación en el paciente, brinda imágenes de alta calidad en un tiempo razonablemente corto y detecta lesiones que no se ven con ^{67}Ga. [112]. Constituye el gold standard para el diagnóstico de muchas enfermedades inflamatorias. Ambos RF se ha utilizado de forma comparativa en el estudio de pacientes con sarcoidosis [132], con covid-19 [115,133] y con fiebre de origen desconocido [112]. Los resultados obtenidos en el caso de la fiebre de origen desconocido muestran la superioridad del ^{18}F-FDG, pero en sarcoidosis y covid-19 los autores consideran que se requiere realizar más estudios para clarificar el rol de cada trazador. En particular, los resultados de Zamora y cols [133]. confirman que los mecanismos de acumulación del ^{67}Ga en el tejido inflamado continúan siendo controversiales.

5.2. Comparación de la toxicidad inducida por DOX y DLP en ratones macho y hembra CD1 mediante biodistribución del ^{67}Ga-Citrato.

La DLP (Doxopeg, Doxil, Caelyx) es una forma farmacéutica de la DOX que se desarrolló con el objetivo de disminuir su toxicidad multiorgánica, en particular la cardiotoxicidad, e incrementar la efectividad terapéutica [11,12,44-47,50,70,134,135]. Consiste en una solución de liposomas pegilados (80-100nm) compuestos de fosfatidilcolina de soya hidrogenada, N-(carbonil-metoxipolietilenglicol 2000)- 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina en forma de sal sódica (mPEG-DSPE), en los cuales se encuentra encapsulada la DOX. Cada liposoma contiene 10 000-15 000 moléculas de DOX

[34,70,134,136]. La concentración de la solución liposomal es equivalente a la concentración habitual de DOX [135]. DLP se utiliza en una amplia gama de tumores sólidos, hematológicos y metastásicos [11,12,50,134-137]. El derivado de PEG que recubre los liposomas los estabiliza desde el punto de vista estérico y forma una superficie hidrofílica alrededor de la nanopartícula que interfiere su interacción con las proteínas del plasma [12,34,43-45,50,134-136]. De esta manera se evita la alta captación por el MPS, se bloquea la fagocitosis por el sistema inmunológico y se alarga el tiempo de circulación sanguínea [34,43-45,48,50,70,134-137]. Una vez que DLP se encuentra en el tejido, libera la DOX de forma controlada durante varios días [44,46,47,70,134]. Durante la circulación sanguínea > 90% de la DOX permanece encapsulada en los liposomas [47,135,136,138]. La combinación del prolongado tiempo de circulación y la lenta liberación de la DOX incrementa el efecto terapéutico de la DLP El aclaramiento plasmático de DLP (~ 45-50 h en humanos, ~15-20 h en roedores) es más lento que el de la DOX (~ 5-10 min) y, al igual que esta, se elimina por vía renal, aunque más lentamente [34,44-46,50,134-137]. El volumen de distribución de la DLP es mucho menor que el de la DOX [34,44-47,50,136-138]. Sus órganos diana principales son hígado, bazo, pulmones, riñones, intestino y piel [34,44-47,136,137] En cantidades equimolares, la DLP produce menos cardiotoxicidad que la DOX, pero no la suprime totalmente [44,136,138]. También induce mielosupresión [136] y daño hepático dosis dependiente [34,47,136]

5.2.1 Ratones macho

En los ratones macho los patrones de biodistribución de ^{67}Ga-citrato en los animales tratados con DOX y DLP fueron diferentes con respecto al grupo control. En los 3 grupos el riñón y el hígado fueron los órganos con mayor captación de ^{67}Ga-citrato en correspondencia con los patrones habituales del ^{67}Ga-citrato [59,139], la DOX [74] y la DLP [34,70]. Los órganos con menor captación fueron y el corazón y cerebro, en los que apenas hubo diferencia entre el control y el grupo DOX y solo un ligero incremento en

corazón en el grupo DLP, que no resultó significativo (Tabla 7). Resultados similares en la captación de DOX y DLP en cerebro y riñón se han reportado [138]. En el grupo control después de riñón e hígado los órganos con mayor captación fueron timo, páncreas y bazo, en el grupo tratado con DOX fueron bazo pulmón y timo y en el grupo tratado con DLP pulmón bazo y páncreas. El ANOVA de Kruskal Wallis encontró diferencias estadísticamente significativas en la captación de ^{67}Ga-citrato de los animales tratados con DOX y DLP con respecto al control en sangre, bazo, hígado, páncreas, pulmones y riñones, pero la comparación de medias de Tukey mostró que solo en el caso del pulmón hubo diferencias significativas de las dos formulaciones con respecto al grupo control ($p=0.001$).

La captación del ^{67}Ga-citrato en los pulmones de los animales tratados fue 3.3 veces superior con DLP y 1.8 veces superior con DOX con relación al control, lo que indica que a las dosis empleadas la DLP indujo mayor daño pulmonar. Se ha reportado que alrededor de un 5% de DLP tiende a atraparse por los alveolos pulmonares y las células epiteliales del pulmón [70,134,140]. Una vez atrapada en los alveolos pulmonares, la DLP comienza a liberar lentamente la DOX por lo que se acumula una concentración de DOX en el tejido mucho mayor que cuando se administra la DOX [34,45,46]. A medida que la DOX se va liberando en el tejido pulmonar y se va metabolizando comienza a producir ROS y RNS que, como ya se ha descrito, conducen a la inflamación. La aplicación de dosis sucesivas de DLP incrementa paulatinamente la inflamación lo que induce mayor acumulación de la DLP en el tejido pulmonar debido a la permeabilidad microvascular incrementada del tejido inflamado [45,47,70,138].A esto se añade el hecho de que el 10% de la DOX encapsulada en los liposomas se libera durante su permanencia en plasma [135] y la DOX libre también se capta en los pulmones, pues estos constituyen uno de sus órganos diana [74], por lo que su efecto no debe menospreciarse. Se ha sugerido también que la DLP también se capta en los neutrófilos pulmonares [136] lo que pudiera contribuir al incremento de la captación de ^{67}Ga-citrato en los pulmones de los animales tratados con DLP. Los mecanismos de

incremento de la captación pulmonar de ^{67}Ga-citrato a causa de la toxicidad inducida por la DOX ya fueron descritos en el acápite 5.1.3.

En cuanto a la captación del ^{67}Ga-citrato en bazo y riñones, aunque el ANOVA arrojó diferencias significativas en al menos uno de los grupos evaluados (Tabla 7), la prueba de Tukey no mostró diferencias significativas de ninguna de las dos formulaciones con respecto al grupo control Es sabido que para un mismo nivel de significación la prueba de Tukey calcula intervalos de confianza más amplios que los calculados individualmente para cada una de las medias que se comparan y provoca que se cometa el error tipo II. Para comprobar si la prueba de Tukey había conducido a aceptar una hipótesis nula falsa se realizó la prueba U de Mann Whitney por separado entre cada formulación y el grupo control. Los resultados arrojaron que la diferencia encontrada por el ANOVA se debe a que en los animales tratados con DLP la captación del ^{67}Ga-citrato fue significativamente mayor en bazo ($p=0.02$) y riñón ($p= 0.008$) que en el grupo control, en tanto que la DOX no indujo diferencias significativas en la captación del ^{67}Ga-citrato en estos órganos. La DLP resultó ser más tóxica para el bazo y el riñón que la DOX.

El bazo es un órgano del MPS. Su principal función es la destrucción de los glóbulos rojos (RBC) y es también uno de los sitios de almacenamiento del Fe [142]. Juega un papel primordial en la regulación del sistema inmune y el metabolismo de los lípidos [17,142] Después de la destrucción de los RBC, la hemoglobina se digiere y el Fe se libera o se almacena en los macrófagos del bazo de acuerdo con las necesidades del organismo por lo que es muy importante en el reciclado del Fe [142]. Aunque el tamaño y el recubrimiento con PEG reduce la captación de la DLP en el bazo [136] no es posible evitarla totalmente [48,140,141,143]. Diversos estudios demuestran que los liposomas pegilados tienden a localizarse considerablemente en médula, hígado y bazo, que son los principales órganos del MPS [45,47,140,143,144]. Una vez captada la DLP en el bazo, comienza la lenta liberación de la DOX. Se ha demostrado que la DOX liberada de la DLP

permanece más tiempo en el hígado y el bazo que la DOX [47,138]. La prolongada exposición de la DOX en el órgano induce mayor toxicidad por diferentes mecanismos. Uno de ellos, descrito en el epígrafe 5.1.2, conduce al incremento de la captación de glucosa. El otro, conduce al incremento de la captación de ^{67}Ga-citrato ya que está relacionado con la desregulación de la homeostasis del Fe. En los órganos donde la concentración de Fe celular es alta, como en el bazo, la DOX que se va liberando interfiere con las IRP y los IRE incrementando la concentración de Fe libre intracelular, que contribuye a aumentar la captación de ^{67}Ga-citrato (Ver mecanismo en el epígrafe 5.1.3.).

En el caso de los riñones, aunque la captación del ^{67}Ga-citrato fue superior con respecto al control tanto con DOX como con DLP la prueba U de Mann Whitney solo arrojó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.008$) en el caso de la DLP. La mayor toxicidad inducida por la DLP con respecto a la DOX estriba en el hecho de que DLP se acumula y excreta por vía renal [34,135,145] La acumulación de la DLP en los riñones unido a la lenta liberación de la DOX en este órgano conducen a aumentar la toxicidad de la DOX. Los riñones son un órgano importante en la homeostasis del Fe cuya desregulación los afecta severamente [117]. Reciben el 23% del volumen total de sangre del cuerpo [146] para ser filtrado. El Fe se filtra en los glomérulos y se reabsorbe en los túbulos proximales renales para prevenir su excreción a través de la orina. De ahí que el Fe sea esencial para la demanda metabólica de las células renales. El mecanismo implicado en el Fe renal difiere del observado en otros órganos debido a la compleja organización del tejido renal y a su expresión diferencial de los transportadores de Fe. [117]. Con el fin de proporcionar la mayor cantidad posible de Fe a las células tubulares proximales renales los riñones absorben Fe no solo a través de los TfR1, sino a través de otros mecanismos que involucran diferentes transportadores y receptores [79, 117].

Aunque el mecanismo de nefrotoxicidad de la DOX no está totalmente entendido se sugiere que está mediado por la formación del complejo DOX-Fe^{3+} que genera radicales

libres capaces de oxidar diferentes componentes celulares [16,36,39,42]. La formación del complejo DOX-Fe^{3+} produce radicales libres, peroxidación lipídica, disminución de los antioxidantes naturales, sobreactividad de la enzima convertidora de angiotensina tisular y producción de ROS que lideran la disfunción mitocondrial renal [79,117]. Como consecuencia, se produce proteinuria, hipoalbuminemia, dislipidemia, aumento de creatinina en plasma, hipercoagubilidad, anemia, nefromegalia [117].

El aumento de la captación de ^{67}Ga en los riñones de los animales tratados con DLP se debe, al parecer, a varios mecanismos concomitantes, similares a los descritos para los pulmones, con las particularidades de las células renales. Entre ellos:

(**a**)En los túbulos renales y en los neutrófilos infiltrados en el tejido renal inflamado se produce Lcf como mecanismo protector para secuestrar el Fe liberado desde el interior de la célula a causa del estrés oxidativo y la inflamación [147]. El ^{67}Ga presente en el complejo Ga-Tf se transquela hacia la Lcf y se capta por los LcfR y otros receptores presentes en los túbulos proximales renales [79].

(**b**) Cuando el radical $O_2^{-\bullet}$ extrae el Fe de los clusters Fe-S de las proteínas, se incrementa el contenido de Fe libre en el tejido renal [41]. La homeostasis del Fe, regulada por los IRP/IRE, se desequilibra. El DOX-ol que se produce por la metabolización de la DOX, y que se excreta por los riñones, también es capar de extraer el Fe de los clusters Fe-S de las proteínas del tejido renal. En dependencia de la concentración de Fe libre presente se puede producir bien un aumento de Ft, bien un aumento de los TfR1 [41]. Cualquiera de los dos procesos aumenta la captación de ^{67}Ga en el tejido.

(**c**) El Fe se excreta por la orina, unido o no a la Tf [117]. En los riñones hay altos niveles de TfR1 y de otros receptores que facilitan la captación del Fe no unido a Tf, con el objetivo de mantener una concentración de Fe tal que permita a las células realizar su

actividad metabólica normal [79,117]. Cuando se producen los radicales libres a causa del ciclo redox de la DOX dependiente de Fe, se incrementa no solo la cantidad de Fe libre intracelular, sino también en el entorno de la célula [42,76]. Se aumenta entonces el nivel de Ft tanto intracelular como extracelular lo que eleva la captación renal de ^{67}Ga [59].

En el caso del hígado, la diferencia en la captación del ^{67}Ga-citrato encontrada por el ANOVA y la prueba de Tukey se debe a una captación significativamente mayor de DLP (1.6 veces con respecto al control), en tanto que la diferencia en páncreas se debe a una menor captación de DOX (0.7 veces) con respecto al control.

La captación de la DLP en el hígado es inevitable [34,140]. Debido al papel estratégico en la circulación sanguínea, los macrófagos del hígado (células de Kupffer) tienen funciones únicas en la homeostasis y defensa del organismo pues eliminan de la circulación partículas y sustancias nocivas [148]. Se ha demostrado que, aunque en menor medida que los liposomas comunes, los liposomas pegilados se atrapan por los macrófagos del hígado [45,47,70,138,140,143,144,148], pero no pueden penetrar al espacio intracelular de los hepatocitos debido a que las células endoteliales del hígado están perforadas con fenestraciones cercanas a 100-200 nm que actúan como un sistema de ultrafiltración que no deja pasar las partículas grandes como los liposomas [148]. Además, la composición de la DLP tampoco facilita el cruce a través de estas fenestraciones porque los lípidos saturados como la diestearoil-fosfatidiletanolamina son rígidos y difícil de deformar [148]. La DLP se constriñe al espacio vascular pero la DOX que va liberando sí es capaz de pasar a través del tamiz hepático y distribuirse dentro de la célula donde comienza a ejercer su efecto tóxico. Se ha demostrado que la DOX que se libera de la DLP persiste más tiempo en el hígado que la DOX [47,143].

Los mecanismos por los que la DOX induce hepatotoxicidad son los mismos que los descritos para otros órganos: la producción de ROS y RNS que provocan formación de

radicales libres, peroxidación lipídica y oxidación de proteínas de la membrana celular que desencadenan diferentes vías moleculares y celulares que conducen a la inflamación, la apoptosis y la necrosis de los hepatocitos [104,149]. El factor NF-κB, cuyo mecanismo de toxicidad ya ha sido descrito, parece jugar un rol esencial en la hepatotoxicidad que causa la DOX [104] A medida que el tejido hepático se inflama, debido a la DOX que se va liberando lentamente de la DLP, las dosis sucesivas de DLP se acumulan más y más en los macrófagos y la liberación lenta de la DOX produce mayor estrés oxidativo Estudios realizados en animales de experimentación demuestran que la DOX incrementa la peroxidación lipídica en las microsomas y las mitocondrias de las células hepáticas [29].

La mayor captación de ^{67}Ga-citrato en el hígado dañado a causa de la DOX está relacionada con el desequilibrio del metabolismo del Fe en el órgano. El hígado es clave en la regulación de la homeostasis de Fe en todo el organismo [150,151]. Es el órgano principal de almacenamiento de Fe y regula su tráfico en todo el organismo mediante la producción de hepcidina, proteína clave para mantener los niveles adecuados de Fe en las células [130,151]. Además, el hígado sintetiza las proteínas plasmáticas enlazadoras de Fe [151]. Se piensa que los hepatocitos son los principales reguladores de la homeostasis del Fe tanto a nivel del hígado como a nivel de todo el cuerpo [151]. Cuando los hepatocitos se dañan a causa del estrés oxidativo dependiente de Fe que produce la DOX (epígrafe 5.1.1.) las células de Kupffer comienzan a participar también en la regulación de la homeostasis del Fe [151]. A medida que la DOX encapsulada en la DLP se va liberando en el hígado y daña la mitocondria de los hepatocitos y de las células de Kupffer y se desregula la homeostasis de Fe en el órgano, se incrementa la producción de Ferritina (Ft) y de receptores de transferrina (TfR1 y TfR2) que contribuyen a incrementar la captación de ^{67}Ga-citrato (epígrafe 5.1.3).

La menor captación de ^{67}Ga-citrato en el páncreas ya fue analizada en el punto 5.1.3.

5.2.2. Ratones hembra

En el caso de los ratones hembra el patrón de biodistribución del ^{67}Ga-citrato fue también muy complejo y mostró diferencias con respecto a los ratones macho. A diferencia de los ratones macho, la mayor captación de ^{67}Ga-citrato no fue en hígado y riñón, sino en riñón y pulmón. En el grupo control después de hígado y riñón la mayor captación estuvo en bazo, timo y páncreas, en el grupo DOX el orden resultó ser bazo, páncreas y pulmón en tanto que en el grupo DLP la captación de ^{67}Ga-citrato siguió el orden hígado, timo y bazo. (Tabla 8)

La prueba ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los órganos excepto el páncreas. Al efectuar la comparación de medias mediante la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas en sangre y grasa gonadal entre los 3 grupos, lo que indica que tanto la DOX como la DLP influyeron en la captación del ^{67}Ga-citrato de estos tejidos con respecto al control. En cuanto al bazo, corazón, pulmón, riñón, ovarios, timo, grasa inguinal, retroperitoneal y pélvica solo el tratamiento con DLP mostró diferencias significativas con respecto al control. Estos resultados parecen contradecirse con el hecho demostrado de que la DLP induce menos toxicidad que la DOX [12,135]. En ratones, después de una dosis intravenosa la LD_{50} de la DLP es 2 veces la de la DOX [136]. Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos requiere tener en cuenta las siguientes consideraciones:

(**a**) La mayoría de los estudios comparativos de toxicidad DLP vs DOX se han realizado en modelos animales con tumores. En animales sanos, como los usados en nuestro experimento, la DLP se acumula en los órganos del MPS [45,47,70,138,140,143,144,148] y en órganos con alta expresión de macrófagos residentes como los pulmones y los riñones [152,153] (no se estudió la médula). Al evadir, de cierta manera, los órganos del MPS y en ausencia de tumores, la DLP se acumula también (inespecíficamente) en otros órganos [70,153,154], entre los que

destacan los que tienen alta expresión de proteínas plasmáticas como los riñones [153]. Esto explica la alta toxicidad inducida por la DLP en estos órganos.

(**b**) Aunque los liposomas se consideran farmacológicamente inactivos y con una mínima inducción de toxicidad debido a que se componen de fosfolípidos naturales [43,44,70,136,138,153], los liposomas pegilados provocan inmunogenicidad [43,44,145,153,154] La respuesta inmune inducida por los liposomas pegilados está mediada por el bazo y aumenta la inflamación en aquellos órganos donde se acumulan [153,155]. Una vez que la DLP se acumula en un órgano específico, a la inflamación que provoca en éste, se añade la que provoca la DOX que va liberando. DLP en particular produce una seudoalergia denominada *complement activated seudoalergia* (CARPA) que desencadena reacciones entre las que destacan la anafilaxis, la inflamación sistémica y distrés cardiopulmonar [153-155]. Esta seudoalergia se piensa que se debe a la activación del sistema del complemento con la generación subsiguiente de un grupo de toxinas que desencadenan la expresión mediadores inflamatorios e induce severa toxicidad [153-155].

(**c**) Se ha demostrado en varios modelos animales que la administración de dosis repetidas de PLD en intervalos semanales produce un efecto denominado aclaramiento sanguíneo acelerado (ABC por sus siglas en inglés) que depende tanto de la dosis administrada por primera vez como de las propiedades fisicoquímicas del liposoma [153-157]. Consiste en que a medida que se van añadiendo nuevas dosis del liposoma el tiempo de circulación sanguínea va disminuyendo y el liposoma se acumula en el hígado y bazo de manera elevada como sucedió en nuestro experimento. El mecanismo del ABC no está completamente dilucidado [152,154,156], pero se piensa que se debe a una respuesta inmune que produce la aplicación de dosis repetidas de liposomas, relacionada con la expresión de IgM anti-PEG producida por las células B del bazo y los denominados antígenos independientes T-2 del timo (TI-2) [154]. El fenómeno ABC se ha detectado poco en humanos [154].

(**d**) Los liposomas de pequeño tamaño como los utilizados en nuestro experimento se retienen más tiempo en los tejidos [136,153]. A medida que se administran dosis sucesivas, los tejidos se inflaman cada vez más y se incrementa la captación del liposoma debido al aumento de la permeabilidad por lo que el daño final que producen es mayor que en el caso de la DOX.

Todas estas circunstancias explican el hecho de la toxicidad multiorgánica inducida por la DLP, en los ratones hembra utilizados en nuestro experimento.

Un resultado interesante encontrado es que el ^{67}Ga citrato se captó menos de lo esperado en el corazón de los animales tratados tanto con DOX como con DLP. Se esperaba una alta captación del RF en este órgano dada la conocida cardiotoxicidad que induce la DOX. La homeostasis del Fe en el corazón es muy compleja y no se conoce a profundidad [41,130]. Cuando se dañan los cardiomiocitos a causa de la DOX se puede producir deficiencia local de Fe independientemente de su concentración sistémica en la hemoglobina pues pacientes con daño cardiaco muestran deficiencia local de Fe, aunque no tengan anemia [130]. Un mecanismo (poco dilucidado aún) que pudiera explicar el fenómeno encontrado reside en el hecho de que en el corazón la homeostasis del Fe está íntimamente ligada a los niveles de Fpn/hepcidina [130,131]. Cuando se desequilibra la homeostasis del Fe en el miocardio a causa de la DOX, aumenta la expresión de hepcidina [130]. Después del hígado, que es el órgano principal de síntesis de hepcidina, el corazón es el órgano con mayor expresión de esta hormona por lo que su papel en la homeostasis del Fe en el corazón es muy importante [130]. Cuando aumenta la expresión de hepcidina a causa de la inflamación disminuye la expresión de Fpn con el fin de que el Fe quede secuestrado en la célula y no se exporte hacia la circulación [130] La disminución de Fpn aumenta considerablemente el nivel de Fe^{2+} en la LIP de los cardiomiocitos [131]. Se piensa que el corazón es más sensible que otros órganos al tamaño de la LIP [41,131]. Cuando la LIP aumenta considerablemente de

tamaño disminuyen los TfR1 para regular la sobrecarga de Fe, y el ^{67}Ga penetra menos en las células pues los TfR1 son una de las vías de captación celular del ^{67}Ga-citrato.

También se corroboró que la cardiotoxicidad se manifiesta más en las hembras que en los machos. En los ratones macho el corazón y el cerebro fueron los órganos con menor captación de ^{67}Ga-citrato en los 3 grupos (Tabla 7). Sin embargo, en las hembras no sucedió así (Tabla 8). Se ha reportado que en humanos la cardiotoxicidad se manifiesta más en mujeres que en hombres [158].

En el caso de las hembras, no se pudo medir la captación de ^{67}Ga-citrato en las grasas del grupo tratado con DLP. Como muestra la Tabla 1 los animales de este grupo (T-5) tuvieron una pérdida de peso muy grande, con síntomas de caquexia y una mortalidad elevada lo que indica que en animales sanos la DLP tuvo efectos tóxicos sistémicos mayores que la DOX por los mecanismos ya descritos.

5.2.3 Conclusiones parciales.

Uno de los mayores problemas que se encuentra en la bibliografía es que los estudios comparativos de DOX y DLP se han realizado principalmente en animales con diferentes tipos de cáncer. Los experimentos con animales sanos han sido poco abordados. En el presente estudio se realiza una comparación de ambas formulaciones farmacéuticas en ratones CD1 sanos, hembras y machos. Contrario a lo esperado, la DLP indujo mayor toxicidad multiorgánica que la DOX, tanto en ratones macho como hembras, siendo más severa en el caso de las hembras.

La DLP evade, en cierta medida, el MPS [134,136,137]. Esto conduce a que se acumule lentamente en otros órganos [70,153,154]. Al liberar lentamente la DOX, esta ejerce su mecanismo de toxicidad provocando inflamación y daño en los tejidos. La inflamación, como se ha descrito en epígrafes anteriores, provoca el denominado efecto aumentado

de permeabilidad y retención (EPR) que conduce a una mayor captación de la DLP. Por otra parte, como los monocitos se reclutan al sitio de inflamación, incrementan aún más los macrófagos residentes como sucede en el hígado y los pulmones [159]. Estos macrófagos juegan un papel primordial en la progresión de la inflamación [159] pues activan la expresión de citoquinas, como el TNF-α que a su vez aumenta la producción de ROS y RNS. El estrés oxidativo que desencadenan las ROS y RNS contribuye a aumentar la captación de ^{67}GA-citrato en los tejidos dañados.

5.3. Determinación de los valores de las enzimas LDH, CK, CK-MB y AST en los animales tratados con DOX y DLP.

La determinación de enzimas dio como resultado que, excepto la CK-MB cuyo nivel disminuyó en las hembras tratadas con DOX, todas las enzimas aumentaron sus niveles en los grupos tratados con respecto al control (Tabla 4). Sin embargo, la comparación de medias post-ANOVA mostró que el aumento de CK-MB fue significativo solo en los machos del grupo tratado con DOX. La LDH se elevó de manera significativa tanto en machos como hembras en los grupos tratados con DLP. El aumento de AST fue muy escaso en los grupos tratados con DOX de ambos sexos. La CK mostró un aumento que no resultó significativo en ningún grupo (Tabla 4). El pequeño tamaño de la muestra y, probablemente las dosis utilizadas, no permitieron observar un aumento significativo de todas las enzimas.

Si bien las cuatro enzimas estudiadas son indicadoras de inflamación, LDH, CK y CK-MB son específicas de inflamación y daño cardiaco, en particular la CK-MB [14,35,36,76, 82] por lo que su significativo aumento en el grupo tratado con DOX confirma que la DLP induce menos toxicidad que la DOX. Se ha reportado que el aumento de CK-MB es proporcional a la dosis de DOX [36].

El aumento de la concentración de las enzimas estudiadas en sangre se produce debido a que cuando se daña la membrana mitocondrial ellas se fugan hacia la circulación [36]. Los resultados indican que la DOX afecta al tejido cardíaco (valor elevado de CK-MB) y muy probablemente produce daño muscular por distrofia o inflamación (valor elevado de CK), además de daño a corazón, hígado, riñón, músculos, cerebro, células sanguíneas y pulmones (valor elevado de LDH). El aumento de LDH en sangre también se corresponde con la reducción del peso de los animales, pues la DOX afecta el colesterol total, los ácidos grasos libres y el nivel de glucosa en sangre [33].

Los resultados indican que los RF son mucho más sensibles para detectar inflamación multiorgánica inducida por medicamentos que la variación de los niveles plasmáticos de enzimas, detectados por análisis bioquímico.

5.4. Conclusiones

El ^{18}F-FDG es más sensible que el ^{67}Ga-citrato para visualizar inflamación. Esto pudiera atribuirse a que en la inflamación provocada por la DOX la homeostasis energética juega un papel más importante que la homeostasis del Fe. Cuando se daña la mitocondria a causa del estrés oxidativo provocado por la DOX, en aquellos órganos con elevado metabolismo de la glucosa (corazón, cerebro, hígado, bazo, grasas, pulmón y riñón) se incrementan los receptores de glucosa GLUT1 y GLUT3 en la superficie celular con el fin de mejorar la producción de energía lo que conduce a un aumento de la captación de ^{18}F-FDG. El ^{67}Ga-citrato, sin embargo, visualiza la inflamación provocada en aquellos órganos donde la homeostasis del Fe es muy importante (pulmón y riñón). La variación en la captación de ^{67}Ga-citrato en los pulmones de los animales tratados con DOX fue significativa. En riñones también se elevó considerablemente, pero debido a la dispersión de los resultados la variación no fue significativa. Contrario a lo esperado, la captación hepática del ^{67}Ga-citrato en los animales tratados con DOX apenas varió con respecto al control, pero pudiera explicarse por el hecho de que cuando los riñones se inflaman el ^{67}Ga-citrato tiende a captarse menos en hígado [118] Esto confirma que la interpretación de los resultados de biodistribución en el caso del ^{67}GA-citrato es mucho más compleja que en el caso de la DOX, y que los mecanismos de acumulación de ^{67}Ga-citrato en el tejido inflamado no están del todo clarificados.

En ratones que no presentan tumores la DLP resulta más tóxica que la DOX, especialmente en las hembras. Esto se debe a la sinergia que se produce al captarse los liposomas de manera inespecífica en los diferentes órganos seguido de la lenta liberación de la DOX. Los liposomas pegilados de por sí, comprometen el sistema inmune lo que desencadena diversas respuestas que conducen a la inflamación. La liberación lenta de la DOX posibilita que esta pueda inducir más daño aún en las células, lo que se comprobó especialmente en el caso de los ratones hembra que fueron más

sensibles a estos efectos tóxicos. Será necesario realizar un experimento con animales a los que se les haya inducido tumor para poder llegar a conclusiones más precisas.

Una vez más quedó demostrado que los métodos nucleares son mucho más sensibles que los métodos de detección enzimática en sangre. Solo CK-MB en ratones macho tratados con DOX y LDH en machos y hembras tratados con DLP se elevaron de manera significativa. La AST y la CK no mostraron un incremento apreciable a pesar de haberse detectado por los RF utilizados el daño producido en hígado y corazón.

6.0. Referencias Bibliográficas

1. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S. **Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview**. Int J Mol Sci. 2013; 14(10): 21087–21113.

2. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. **Curcumin and Cancer Cells: How Many Ways Can Curry Kill Tumor Cells Selectively?** AAPS J. 2009;11(3):495–510.

3. Organización Mundial de la Salud. **Cáncer**. [Consultado 23 de mayo 2019]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer

4. INEGI. **Características De Las Defunciones Registradas En México Durante 2017**. Comun Prensa Núm 525/18 [Internet]. 2018;1. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/

5. Sociedad Española de Oncología Médica. **Las cifras del cáncer en España. Red Española de Registros de Cáncer; 2019**. [Consultado 24 de Mayo 2019] Disponible en: https://seom.org/dmcancer/wp-content/uploads/2019/Informe-SEOM-cifras-cancer-2019.pdf

6. Organización Mundial de la Salud. GLOBOCAN: Mexico **2018 Mexico, Incidence Mexico, Mortality**. 2019; 283:2018–9.

7. Mitra AK, Agrahari V, Mandal A, Cholkar K, Natarajan C, Shah S, et al. **Novel delivery approaches for cancer therapeutics.** J Control Release. 2015; 219:248–68. Disponible en http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.09.067

8. Pollock R, Morton D. **Principios de oncología quirúrgica**. 6ª ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003

9. Bagnyukova T, Serebriiskii IG, Zhou Y, Hopper-Borge EA, Golemis EA, Astsaturov I. **Chemotherapy and signaling: How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents?** Cancer Biol Ther. 2010;10(9):839–53.

10. Pugazhendhi A, Edison TNJI, Velmurugan BK, Jacob JA, Karuppusamy I. **Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems.** Life Sci. 2018; May 1; 200:26-30.

11. Zhao N, Woodle MC, Mixson AJ. **Advances in Delivery Systems for Doxorubicin** J Nanomed Nanotechnol 2018; 9(5): 519 doi: 10.4172/2157-7439.1000519

12. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, Wei G, Lamba G, Liu D. **Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis.** Experimental Hematology & Oncology 2012; 1:10 http://www.ehoonline.org/content/1/1/10

13. Yurekli Y, Perihan Unak P, Turkan Ertay T, Zumrut Biber Z, Ilker Medine I, Teksoz S. **Radiopharmaceutical model using 99mTc-MIBI to evaluate amifostine**

protection against doxorubicin cardiotoxicity in rats Annals of Nuclear Medicine 2005; 19(3): 197-200.

14. Bulten BF, Sollini M, Boni R, Massri K, de Geus-Oei L-F, van Laarhoven HWM, Slart Riemer HJA, Erba PA. **Cardiac molecular pathways influenced by doxorubicin treatment in mice.** Scientific Reports 2019; 9:2514 |

15. Bauckneht M, Ferrarazzo G, Fiz F, Morbelli S,Sarocchi M et al. **Doxorubicin effect on myocardial metabolism as a pre-requisite for subsequent development of cardiac toxicity: a translational 18F-FDG PET/CT observation** J Nucl Med 2017;58(10):1638-1645.

16. Razaq T, Nisar H, Roohi S, Shehzad A, Ahmad I**. Administration of ^{99m}Tc-DTPA in combination with doxorubicin alters the radiopharmaceutical biodistribution in rats** Iran J Nucl Med 2017;25(2):122-128

17. Sung SA, Sang HH, Seung MJ,Sang-Won L, Yong-Beom P, Mijin Y, Jason JS **Evaluation of Spleen Glucose Metabolism Using ^{18}F-FDG PET/CT in Patients with Febrile Autoimmune Disease** Nucl Med 2017; 58(3):507–513

18. Wei L, Surma M, Gough G, Shi S, Lambert-Cheatham N, Chang J, et al. **Dissecting the mechanisms of doxorubicin and oxidative stress-induced cytotoxicity: The involvement of actin cytoskeleton and ROCK1**. PLoS One. 2015;10(7):1–18.

19. Volkova M, Russell R. **Anthracycline Cardiotoxicity: Prevalence, Pathogenesis and Treatment**. Curr Cardiol Rev. 2012;7(4):214–220.

20. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. **Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologie developments in antitumor activity and cardiotoxicity.** Pharmacol Rev. 2004;56(2):185–229.

21.Tisserand R, Young R. **Toxicity. Chapter 3**. En: **Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals: 2nd Ed.** 2014; Edinburg Elsevier Limited.

22. Deore AB, Dhumane JR, Wagh HV, Sonawane RB. **The Stages of Drug Discovery and Development Process**. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development. 2019; 7(6): 62-67

23. Abola MV, Prassad V, Jena AB. **Association between treatment toxicity and outcomes in oncology clinical trials**. Annals of Oncology 2014; 25: 2284–2289.

24. Abdelrahman AM, Al Suleimani YM, Manoj P, Ashique M, Ali BH. **Effect of infliximab, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 2019; 393(1):121-130.

25. Altınkaynak Y, Kuralb B, Akcanc BA, Bodurb A, Özerb S, Yuluğd E. Munğane S, Kayad C, Öremb A. **Protective effects of L-theanine against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats** Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018; 108: 1524-1534

26. El-Sheikh AAK, Morsy MA, Mahmoud MM, Rifaai RA, Abdelrahman AM. **Effect of Coenzyme-Q10 on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats** Advances in Pharmacological Sciences Volume 2012, Article ID 981461, 8 pages doi:10.1155/2012/981461

27. Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G,Cengiz M, Eser M, Soner BC, Oktem G. **Doxorubicin Induced Nephrotoxicity: Protective Effect of Nicotinamide** International Journal of Cell Biology Volume 2011, Article ID 390238, 9 pages doi:10.1155/2011/390238

28. Chen T, Shen H-M, Deng Z-Y, Yang Z-Z, Zhao R-L, Wang L, Feng Z-P, Liu Ch, Li W-H, Liu Z-J. **A herbal formula, SYKT, reverses doxorubicin-induced myelosuppression and cardiotoxicity by inhibiting ROS-mediated apoptosis** Molecular Medicine Reports 2017; 15: 2057-2066.

29. Aktaş I, Özmen O, Tutun H, Yalçın A, Türk A. **Artemisinin attenuates doxorubicin induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats** Biotech Histochem, 2020; 95(2):121-128.

30. Patil L, Balaraman R. **Effect of Melatonin on Doxorubicin Induced Testicular Damage in Rats** Int.J. PharmTech Res.2009;1(3):879-844

31. Vapa I, Torres VM, Djordjevic A, Vasovic V, Srdjenovic B, Dragojevic Simic V, Popovic JK. **Effect of fullerenol C60(OH)24 on lipid peroxidation of kidneys testes and lungs in rats treated with doxorubicine** Eur J Drug Metab Pharmacokinet 2012;37(4) DOI 10.1007/s13318-012-0092-y

32. Amorim Biondo L, Alves Lima Junior E, Oliveira Souza C, Cruz MM, Cunha RDC, Alonso-Vale MI, Oyama LM, et al. **Impact of Doxorubicin Treatment on the Physiological Functions of White Adipose Tissue** PLoS ONE 2016; 11(3): e0151548.

33. Batatinha H, Souza C, Lima E, Alonso-Vale MI, Cruz M, Da Cunha R, Lira F, Rosa J. **Adipose tissue homeostasis is deeply disrupted by doxorubicin treatment** Cancer & Metabolism 2014; 2(1): P5-P5

34. Tacar O, Sriamornsak P, Dassa CR. **Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems** J Pharm Pharmacol. 2013; 65(2):157–170.

35. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger Ch, Wallimann T, Schlattner U. **New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics.** J Mol Cell Cardiol. 2006; 41:389–405.

36. Guven C, Sevgiler Y, Taskin E. **Mitochondrial Dysfunction Associated with Doxorubicin. En: Mitochondrial Diseases**, 2018; Chapter 13. Disponible en: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80284

37. Zhao L, Zhang B. **Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes** Sci Rep 2017; Mar 16;7:44735.

38. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, CairoG. Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcati S, CairoG. **The role of iron in anthracycline cardiotoxicity** Front Pharmacol 2014; 5:25.

39. Kalyanaraman B. **Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree?** Redox Biology 2019; 29:101394.

40. De Angelis A, Cappetta D, Berrino L, Urbanek K. **Doxorubicin Cardiotoxicity: Multiple Targets and Translational Perspectives** Intech Open 2018; disponible en: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80057

41. Ghigo A, Li M, Hirsch E. **New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity** Biochimica et Biophysica Acta Part B, 2016; 1863 (7) 1916-1925

42. Sterba M, Popelova O, Vavrova A, Jirkovsky E, Kovarikova P, Gers V, Simunek T. **Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection** Antioxid Redox Signal. 2013; 18(8): 899–929.

43. Aranda-Lara L, Morales-Avila E, Luna-Gutiérrez MA, Olivé-Alvarez E, Isaac-Olivé K. **Radiolabeled liposomes and lipoproteins as lipidic nanoparticles for imaging and therapy** Chem Phys Lipids 2020; 230: 104934

44. Bozzuto G, Molinari A. **Liposomes as nanomedical devices**. Int J of Nanomedicine, 2015; 10:975-999.

45. Maurer N, Fenske DB, Cullis PR. **Developements in liposomal drug delivery systems**. Expert Opin. Biol.Ther. 2001; 1(6):923-947.

46. Rahman WT, Wale DJ, Vigliantia BL, Townsend DM, Manganaro MS Gross MD, Wong KK, Rubello D. **The impact of infection and inflammation in oncologic 18F-FDG PET/CT imaging** Biomed. Pharmacother, 2019; 117: 109168.

47. Vail DM, Amantea MA, Colbern GT, Martin FJ, Hilger RA. **Pegylated Liposomal Doxorubicin: Proof of Principle Using Preclinical Animal Models and Pharmacokinetic Studies.** Semin Oncol 2004; 31(13):16-35

48. Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, and Lee KC. **Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size.** Biochim Biophys Acta 1991; 1061:56-64.

49. Pignata S, Scambia G, Savarese A, Breda E, Scollo P, De Vivo R, et al. **Safety of a 3-weekly schedule of carboplatin plus pegylated liposomal doxorubicin as first**

line chemotherapy in patients with ovarian cancer: Preliminary results of the MITO-2 randomized trial. BMC Cancer. 2006;6(1):202–209.

50. Franco YL, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. **Anticancer and cardio-protective effects of liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer.** Breast Cancer Targets Ther. 2018; 10:131–41.

51. IAEA **Radiopharmacy. Quality Control Procedures. Biodistribution**. Disponible en:https://humanhealth.iaea.org/HHW/Radiopharmacy/VirRad/Quality_Control_Procedures/Quality_Control_Module/Biodistribution/index.html

52. Agudo Martínez A, Gómez Perales JL, Tirado JL. **Alteraciones en la biodistribución de los radiofármacos causadas por interacciones medicamentosas**. Alasbimn Journal, ISSN: 0717 - 4055. URL: http://www.alasbimnjournal.net/a/65

53. Gül SS, Aygün H. **Cardioprotective effect of vitamin D and melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat model: an electrocardiographic, scintigraphic and biochemical study** Eur Res. Journal 2019;5(4):649-657

54. Roldán-Valadez E, Vega-González I, Valdivieso-Cárdenas G, Rumoroso-García A, Morales-Santillán O, Osorio-Cardiel L. **Conceptos básicos del 18F-FDG PET/CT.** Gac Méd Méx 2008; 144 (2): 137-146.

55. Wu Ch, Li F, Niu G, Chen X. PET **Imaging of Inflammation Biomarkers**. Theranostics 2013; 3(7):448-466.

56. Ertay T, Eren MS,Karaman M, Oktay G, Durak H. **18F-FDG-PET/CT in Initiation and Progression of Inflammation and Infection** Mol Imaging Radionucl Ther 2017;26:47-52

57. IAEA. **Cyclotron produced radionuclides: Physical Characteristics and Production Methods** IAEA TRS-468, 2009

58. Tsan M-F. **Mechanism of Gallium-67 Accumulation in Inflammatory Lesions** J.Nucl. Med 1985; 26(1): 88-92.

59. Chitambar ChR. **Gallium and its competing roles with iron in biological systems** Biochim Biophys Acta. 2016;1863(8):2044-2053.

60. Ando A, Nitta K, Ando I, Sanada Sh, Katsuda Sh. **Mechanism of gallium 67 accumulation in inflammatory tissue** Eur J Nucl Med 1990; 17(1-2): 21-27

61. Simpson BRS, Ntsoane TP. **Decay scheme of 6**7Ga Applied Radiation and Isotopes 2000; 52: 551-556.

62. De Caprio AP (Ed). **Toxicologic Biomarkers** CRC Press 2006

63.Evalde N, James PO, Onuorah OA, Llo CC, Okeowhor D, Samuel C, Durojaye OA, Sen D. **Clinical Diagnosis of Disease States Using Enzymes and Proteins (Review).** Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology 2018, 1(3): 1-6.

64. **Norma Oficial Mexicana -NOM-062-ZOO-1999** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Gac Méd Méx 2002;138(3):295-298.

65. The National Academies Press (US) **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health** 8th Ed. 2011 DOI: 10.17226/12910

66. Talbot SR, Biernot S, Bleich A, van Dijk MR, Ernst L, Hager Ch, *et al*. **Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal** Laboratory Animals 2019; 0(0) 1–12 DOI: 10.1177/0023677219883319.

67. Su Zh, Ye J, Qin Zh, Ding X. **Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro** Scientific Reports 2015; 5:18314

68. Alves de Lima EJ, Yamashita ASh, Duarte Pimentel G, De Sousa LGO. **Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle**. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle 2016; 7: 615–625.

69. El-Sayed ESM, Mansour AM, El-Sawy WS. **Protective effect of proanthocyanidins against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats** J Biochem Mol Toxicol. 2017;31(1): e21965

70. Çağdaş M, Sezer D, Bucak C. **Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery.** En el libro:Application of Nanotechnology in Drug Delivery 2014; DOI: 10.5772/58459

71. Sultana R, Di Domenico F, Tseng M, Cai J, Noel T. et al. **Doxorubicin-Induced Thymus Senescence** Journal of Proteome Research 2010; 9:6232–6241.

72. van Beek L, van Klinken JB, Pronk ACM, van Dam AD, Dirven E, Rensen PCN, Koning F, van Dijk KW, van Harmelen V. **The limited storage capacity of gonadal adipose tissue directs the development of metabolic disorders in male C57Bl/6J mice** Diabetologia 2015;58(7):1601-1609.

73. Jadapalli JK, Wright GM, Kain V, Sherwani MA, Yusuf N, Halade GV. **Doxorubicin triggers splenic contraction 1 and irreversible dysregulation of COX and LOX that alters inflammation-resolution program in the myocardium** Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2018; 315(5):H1091-H1100.

74. Araujo FI, Proenca FPP, Ferreira CG, Ventilari SC, Rosado de Castro PH, Moreira RD, Fonseca LMB, Souza SAL, Gutlfilen B. **Use of ^{99m}Tc-doxorubicin scintigraphy in females with breast cancer: a pilot study**. Br J Radiol 2015; 88: 20150268

75. Kotamraju S, Chitambar Ch.R, Kalivendi Sh.V, Joseph J. **Transferrin Receptor-dependent Iron Uptake Is Responsible for Doxorubicin-mediated Apoptosis in Endothelial Cells**. J. Biol.Chem. 2002; 277(19):17179–17187.

76.Milic Torres V, Dragojevic Simic V. **Doxorubicin-Induced Oxidative Injury of Cardiomyocytes – Do We Have Right Strategies for Prevention?** In: Cardiotoxicity of Oncologic Treatments Ed by Fiuza M. 2012; Intech Open DOI: 10.5772/34692

77. Kim DR, Lee SY, Kim JS, Kim YG, Moon J-Y, Lee SH, Lee TW, Ihm ChG, Jeong KH. **Ameliorating Effect of Gemigliptin on Renal Injury in Murine Adriamycin-Induced Nephropathy**. Bio Med Res. Int. 2017; 7275109. doi: 10.1155/2017/7275109.

78. Minotti G, Cairo G, Monti E. **Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song?** FASEB Journal 1999; 13(2):199-212

79.Walker VJ, Agarwal A. **Targeting Iron Homeostasis in Acute Kidney Injury** Semin Nephrol. 2016;36(1): 62–70.

80. Kuhn LC. **Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism**. Metallomics 2015, 7:232-243.

81. Allam R, Kumar SVR, Darisipudi MN, Anders H-J. **Extracellular histones in tissue injury and inflammation.** J Mol Med 2014; 92:465–472.

82. Monroy González AG, Sánchez Escalona D, Telich-Tarriba JE, Marroquín Donday L, Juárez Orozco L, Peñarrieta Daher E, Valles Terrazas M, Jiménez M, Alexanderson E. **El uso del PET con ^{18}F-FDG en Cardiología**. UPdate 2012; 1 (2): 33-39.

83. Hrelia S, Fiorentini D, Maraldi T, Angeloni C, Bordoni A, Biagi PL, Hakim G. **Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes** Biochimica et Biophysica Acta 2002; 1567:150– 156,

84. Nebigil CG, Désaubry L. **Updates in Anthracycline-Mediated Cardiotoxicity** Front Pharmacol. 2018; 9:1262.

85. Zhang H, Xu A,Sun X,Yaqing Y,Zhang L,Bai H, Ben J, Zhu X, Li X, Yang Q, Wang Z, Wu W, Yang D, Zhang Y, Xu Y, Chen Q. **Self-Maintenance of Cardiac Resident Reparative Macrophages Attenuates Doxorubicin Induced Cardiomyopathy Through the SR-A1-c-Myc Axis** Circ.Res. 2020;127(5):610-627.

86. Bartels K, Grenz A, Eltzschig HK. **Hypoxia and inflammation are two sides of the same coin** Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(46):18351–18352.

87. Rashid S, Ali N, Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Hasan SK, Sultana S. **Alleviation of doxorubicin induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in wistar rats** Toxicol Mech Methods 2013;23(5):337-345.

88. Khames A, Khalaf MM, Gad AM, Abd El-Raouf OM. **Ameliorative effects of Sildenafil and/or Febuxostat on Doxorubicin-induced nephrotoxicity in Rats** Eur J Pharmacol. 2017; 805:118-124.

89. Lahoti TS, Patel D, Thekkemadom V, Beckett R, Ray SD. **Doxorubicin-Induced In Vivo Nephrotoxicity Involves Oxidative Stress-Mediated Multiple Pro- and Anti-Apoptotic Signaling Pathways** Current Neurovascular Research 2012; 9: 282-295

90. Refaie MMM, Amin EF, El-Tahawy NF,Abdelrahman AM. **Possible Protective Effect of Diacerein on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats** J Toxicol. 2016; 2016:9507563

91. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. **Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy** Med Res Rev. 2014; 34(1):106-135.

92. Eirin A, Lerman A, Lerman LO. **The Emerging Role of Mitochondrial Targeting in Kidney Disease** Handb Exp Pharmacol. 2017; 240: 229–250

93. Heeba GH, Mahmoud ME. **Dual Effects of Quercetin in Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats and its Modulation of the Cytotoxic Activity of Doxorubicin on Human Carcinoma Cells** Environ Toxicol. 2016; 31(5):624-636.

94. Parameswaran N, Patial S. **Tumor Necrosis Factor-α Signaling in Macrophages.** Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2010; 20(2): 87–103

95. Mathis D, Shoelson SE. **Immunometabolism: an emerging frontier** Nat Rev Inmunol. 2011; 11(2):81-83.

96. Siswanto S, Arozal W, Juniantito V, Grace A, Agustini FD,Nafrialdi. **The Effect of Mangiferin Against Brain Damage Caused by Oxidative Stress and Inflammation Induced by Doxorubicin.** HAYATI Journal of Biosciences 2016; 23 (2): 51-55.

97. Tangpong J, Sompol P, Vore M, St. Clair W, Butterfield DA, St.Clair DK. **Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Nitric Oxide Production Enhances Manganese Superoxide Ddismutase Nitration and Mitochondrial Dysfunction in Primary Neurons: an insight into the role of Glial Cells.** Neuroscience 2008; 151(2): 622–629.

98. Tanpong J, Miriyala S, Sinthupibulyakit NC, Jungsuwadee P, St Clair DK. **Doxobubicin-induced central nervous system toxicity and protection by xantone derivative of Garcinia Mangostana**. Neuroscience 2011; 175 (2):292–299.

99. Keeney JTR, Ren X, Warrier G, Noel T, Powell DK, Brelsfoard JM, Sultana R, Saatman KE, St. Clair DK, Butterfield DA. **Doxorubicin-induced elevated oxidative stress and neurochemical alterations in brain and cognitive decline: protection by MESNA and insights into mechanisms of chemotherapy-induced cognitive impairment ("chemobrain")**. Oncotarget, 2018; 9 (54):30324-30339.

100. Mohamed RH, Karam RA, Amerc MG. **Epicatechin attenuates doxorubicin-induced brain toxicity: Critical role of TN-a, iNOS and NF-κB** Brain Res Bull 2011;86 (1-2):22– 28.

101. Janelsins MC, Kohli S, Mohile SG, Usuki K, Ahles TA, Morrow TR. **An Update on Cancer- and Chemotherapy- Related Cognitive Dysfunction: Current Status**. Semin Oncol. 2011;38(3): 431–438.

102. Gotama KT, Soetikno V, Louisa M, Arozal W. **Hepatoptotective effects of L-citrulline against doxorubicin-induced liver damage in rats: an analysis of serum biomarkers** Int.J.Appl.Pharmaceutics 2019; 11(1):230-233

103. Zhao X, Zhang J, Tong N, Chen Y, Luo Y. **Protective Effects of Berberine on Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity in Mice**. Biol. Pharm. Bull. 2012, 35(5): 796–800

104. Chen X, Zhang Y, Zhu Z, Liu H, Guo H, Xiong Ch, Xie K, Zhang X, Su S. **Protective effect of berberine on doxorubicin-induced acute hepatorenal toxicity in rats.** Molec Med Reports. 2016; 13: 3953-3960.

105. Nobashi T, Kubo T, Nakamoto Y, Handa T, Koyasu S, Ishimori T, Mishima M, Togashi K. **FDG uptake in less affected lung field provides prognostic stratification in patients with interstitial lung disease.** J Nucl Med.2016; 57(12):1899-1904.

106. Boukhenouna S, Wilson MA, Bahmed K, Kosmider B. **Reactive Oxygen Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** Oxid Med Cell Longev 2018: Feb 11, 2018:5730395

107. Siques P, Brito J, Pena E. Reactive **Oxygen Species and Pulmonary Vasculature During Hypobaric Hypoxia**. Front Physiol 2018; Disponible en: https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00865

108. Bjørndal B, Burri L, Staalesen V, Skorve J, Berge RK**. Different Adipose Depots: Their Role in the Development of Metabolic Syndrome and Mitochondrial Response to Hypolipidemic Agents** J Obes. 2011; 2011: 490650.doi: 10.1155/2011/490650

109. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. **Relationships between Rodent White Adipose White Pads and Human White Adipose Fats Depots.** Front. Nutr. 2016; 3:10 doi: 10.3389/fnut.2016.00010

110. Bagchi DP, MacDougald OA**. Identification and Dissection of Diverse Mouse Adipose Depots** J. Vis. Exp. 2019;(149):e59499 doi:10.3791/59499

111. Rosen ED, Spiegelman BM. **What We Talk About When We Talk About Fat?** Cell, 2014, 156 (1): 20-44.

112. Kubota K, Tanaka N, Kobayakawa M. **Comparison of ^{18}F-FDG PET/CT and ^{67}Ga-SPECT for the diagnosis of fever of unknown origin: a multicenter prospective study in Japan** Annals of Nuclear Medicine 2020; 34(10) 156 (1): 20-44.

113. Giraudo Ch,Evangelista L, Fraia AS, Lupi A, Quaia E, Cecchin D, Casali M. **Molecular Imaging of Pulmonary Inflammation and Infection** Int. J. Mol. Sci. 2020; 21 (3): 894

114. Nogués IA, Bello Arqués P, Hervás Benito I, Pérez Velasco R, Mut Dólera T, Mateo Navarro A. **Nefritis intersticial demostrada mediante gammagrafía con ^{67}Ga-citrato en el contexto de fiebre de origen desconocido** Rev EspMedNucl.2009;28(5):242–245.

115. Zuckier LS, Valdivia AY, Zamora E. **Does gallium-citrate have yet another story to tell? Lessons relevant to the COVID-19 era** Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2020; May 28 : 1–3.

116. Lane DJR, Merlot AM, Huang, MLH, Bae D-H, Jansson PJ, Sahni S, Kalinowski DS, Richardson DR. **Cellular Iron Uptake, Trafficking and Metabolism: Key Molecules and Mechanisms and their Roles in Disease** Biochim Biophys Acta 2015; 1853(5):1130-44

117. van Swelm RPL, Wetzels JFM, Swinkels DW. **The multifaceted role of iron in renal health and disease** Nat Rev Nephrol, 2020; 16(2):77-98118.

118. Weiner RE, Spencer RP, Dambro TJ, Klein BE. **Gallium-67 Distribution in a Man with a Decrease in Both Transferrin and Hepatic Gallium-67 Concentration** J Nucl Med 1992; 33(9): 1701-1703.

119. Bisson G, Lamoureux G, Bégin R. **Quantitative Gallium 67 Lung Scan to Assess the Inflammatory Activity in the Pneumoconioses** Seminars in Nuclear Medicine, 1987; 17(1): 72-80.

120. Neves J, Haider T, Gassmann M, Muckenthaler MU. **Iron Homeostasis in the Lungs—A Balance between Health and Disease** Pharmaceuticals 2019; 12(1): 5.

121. Ghio AJ, Turi EL, Yang F, Garrick LM, Garrick MD. **Iron homeostasis in the lung**. Biol Res 2006; 39(1): 67-77.

122. Cutone A, Luigi R, Ianiro G, Lepant MS, Bonaccorsi di Patti MC, Valenti P, Musci G. **Lactoferrin's Anti-Cancer Properties: Safety Selectivity, and Wide Range of Action**. Biomolecules 2020; 10(3):456.

123. Kim J, Wessling-Resnick M. **The Role of Iron Metabolism in Lung Inflammation and Injury**. J Aller Ther. 2012;3(4) S4:004

124. Brazzolotto X, Andriollo M, Guiraud P,Favier A, Moulis J-M. **Interactions between doxorubicin and the human iron regulatory system.** Biochim Biophys Acta 2003;1593: 209– 218.

125. Kiefmann R, Rifkind JM, Nagababu E, Bhattacharya J. **Red blood cells induce hypoxic lung inflammation.** Blood 2008; 111(10):5205-5214.

126. Feng JP, Yuan XL, Li M, Fang J, Xie T, Zhou Y, Zhu YM, Luo M, Lin M, Ye DW**. Secondary diabetes associated with 5-fluorouracil-based chemotherapy regimens in non-diabetic patients with colorectal cancer: results from a single-centre cohort study**. Colorectal Dis 2012; 15(1): 27-33.

127. Heart E, Karandrea S, Liang X, Balke ME, Beringer PA, Bobczynski EM, Zayas-Bazán Burgos D, Richardson T, Gray JP. **Mechanisms of doxorubicin toxicity in pancreatic β-cells.** Tox Sci 2016; 152(2):395-405.

128. Fernández-Real JM, McClain D, Manco M. **Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes.** Diabetes Care 2015;38(11): 2169-2176.

129. Kabel AM. **Zinc/alogliptin combination attenuates testicular toxicity induced by doxorubicin in rats: Role of oxidative stress, apoptosis and TGF-β1/NF-κB signaling.** Biomedicine & Pharmacotherapy 2018; 97: 439-449.

130. Bolotta A, Abruzzo PM, Baldassarro VA, Ghezzo A, Scotlandi K, Marini M, Zucchini C. **New Insights into the Hepcidin-Ferroportin Axis and Iron Homeostasis in iPSC-Derived Cardiomyocytes from Friedreich's Ataxia Patient**. Oxid Med and Cell Longev 2019; 2019:7623023. DOI: 10.1155/2019/7623023

131. Lakhal-Littleton S. **Mechanisms of cardiac iron homeostasis and their importance to heart function.** Free Radic Biol Med. 2019; 133: 234–237.

132. Prager E, Wehrschuetz M, Bisail B, Woltsche M, Schwarz T, Lanz H, Sorantin E, Aigner RM. **Comparison of ^{18}F-FDG and ^{67}Ga-citrate in sarcoidosis imaging**. Nuklearmedizin 2008; 47(1):18-23

133. Zamora E, Valdivia AY, Zalta B, Zuckier LS. **[67Ga] Ga-citrate and COVID-19-associated pneumonia: an unexpected absence of uptake**. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 47(9) https://doi.org/10.1007/s00259-020-04886-9

134. Allen TM, Martin FJ. **Advantages of Liposomal Delivery Systems for Anthracyclines** Semin Oncol 2004; 31(3):5-15

135.Laboratoarios Asofarma. **Prospecto DOXOPEG**. Disponible en: http://www.asofarma.com.mx/IPP/oncologia/doxopeg.pdf

136. Gabizon AA. **Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an-Old Drug into a New Form of Chemotherapy**. Cancer Investig. 2001; 19(4):424-436

137. Plosker GL. **Pegylated Liposomal Doxorubicin A Review of its Use in the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma.** Drugs 2008; 68 (17): 2535-2551.

138. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. **Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin Review of Animal and Human Studies.** Clin Pharmacokinet 2003; 42 (5):419-436.

139. Larson SM, Rasey JS, Allen DR, Nelson NJ, Grunbaum Z, Harp GD, Williams DL. **Common Pathway for Tumor Cell Uptake of Gallium-67 and Iron-59 via a Transferrin Receptor**. JNCI 1980; 64(1):41-53.

140. Blume G, Seve G. *Liposomes for the sustained drug release in vivo*. Biochimica et Biophysica Acta, 1990;1029:91-97.

141. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. **Stealth liposomes: review of the basic science,rationale, and clinical applications, existing and potential.** Int J Nanomedicine 2006;1(3): 297–315.

142 Tarantino G, Scalera A, Finelli C. **Liver-spleen axis: Intersection between immunity,infections and metabolism**. World J Gastroenterol 2013; 19(23): 3534-3542.

143. Hsu W-H, Liu S-Y,Chang Y-J, Chang C-H, Ting G, Lee T-W. **The PEGylated liposomal doxorubicin improves the delivery and therapeutic efficiency of 188Re-Liposome by modulating phagocytosis in C26 murine colon carcinoma tumor model.** Nuc Med Biol. 2014;41(9):765-761.

144. Smits EAW, Soetekouw JA, Pieters EHE, Smits CJP, de Wijs-Rot N, Vromans H. **The availability of drug by liposomal drug delivery.** Investigational New Drugs 2018; https://doi.org/10.1007/s10637-018-0708-4.

145.Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peter MA,Vile RG, Stewart JSW. **Effective Targeting of Solid Tumors in Patients With Locally Advanced Cancers by Radiolabeled Pegylated Liposomes.** Clinical Cancer Research 2001;7(2): 243–254.

146. Mihai S, Codrici E, Popescu ID, Enciu A-M, Albulescu L, Necula LG,Mambet C, Anton G, Tanase C. **Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome.** J Inmunol Res. 2018; 2018:2180373. DOI: 10.1155/2018/2180373

147. Abrink M, Larsson E, Gobl A, Hellman L. **Expression of lactoferrin in the kidney: Implications for innate immunity and iron metabolism.** Kidney International 2000; 57:2004-2010.

148.Hilmer SN, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. **The Hepatic Pharmacokinetics of Doxorubicin and Liposomal Doxorubicin**. Drug Metab Dipos 2004; 32(8):794-799.

149. Injac R, Perse M, Cerne M, Potocnik N, Radic N, Govedarica B, Djordjevic A, Cerar A, Strukelj B. **Protective effects of fullerenol C60(OH)24 against doxorubicin-**

induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. Biomaterials 2009; 30(6):1184-1196.

150. Harrison-Findik DD. **Gender-related variations in iron metabolism and liver diseases.** World J Hepatol 2010, 2(8): 302-310

151. Anderson GJ, Frazer DM. **Hepatic Iron Metabolism**. Seminars in Liver Disease 2005 25(4):420-32.

152. Kelly C, Jefferies C, Cryan S-A. **Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages.** J Drug Delivery 2011; Article ID 727241 https://doi.org/10.1155/2011/727241

153. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. **Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery.** Front Pharmacol 2015; https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286

154. Mohamed M, Abu Lila AS, Shimizu T, Alaaeldin E, Hussein A, Sarhan HA, Szebeni J, Ishida T. **PEGylated liposomes: immunological responses**. Sci Tech Adv Materials, 2019; 20:1, 710-724.

155.Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: **A stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals**. Mol Inmunol 2014; 61(2):163-173.

156. Wang XY, Ishida T, Ichihara M, Kiwada H. **Influence of the physicochemical properties of liposomes on the accelerated blood clearance phenomenon in rats**. J Control Release 2005; 104(1):91-102.

157. Dams ETM, Laverman P, Oyen WJG, Storm G, Scherphof GL, van der Meer JWM, Corstens FHM, Boerman OC. **Accelerated Blood Clearance and Altered Biodistribution of Repeated Injections of Sterically Stabilized Liposomes.** Journal Pharm.Exper Therap 2000;292(3):1071-1079.

158. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, Orav EJ, Gelber RD, Solan SD. **Female Sex and Higher Drug Dose as Risk Factors for Late Cardiotoxic Effects of Doxorubicin Therapy for Childhood Cancer.** N Engl J Med 1995; 332:1738-1744.

159. Daemen T, Hofstedem G, Tenk Kate MT, Bakker- Woudenberg IAJM, Scherphof GL. **Liposomal Doxorubicin- InducedTtoxicity: Depletion and Impairment of PhagocyticActivity of Liver Macrophages.** Int. J. Cancer 1995; 61:716-721.