

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LA GLUCÓLISIS Y LA β -OXIDACIÓN DE ÁCIDOS
GRASOS EN EL CRECIMIENTO Y SENSIBILIDAD A
DOXORRUBICINA DE LÍNEAS DE CÁNCER MAMARIO**

POR

M.C.P. CARLOS ROBERTO MONTES DE OCA SAUCEDO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

JULIO, 2024

**“EFECTO DE LA GLUCÓLISIS Y LA β -OXIDACIÓN DE ÁCIDOS
GRASOS EN EL CRECIMIENTO Y SENSIBILIDAD A
DOXORRUBICINA DE LÍNEAS DE CÁNCER MAMARIO”**

Aprobación de tesis:

Dr. C. José Juan Pérez Trujillo

Director

Dr. med. Víctor Manuel Oyervides Juárez

Co-Director

Dr. C. Adolfo Soto Domínguez

Miembro de la Comisión de Tesis

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

M.C.P. Carlos Roberto Montes de Oca Saucedo Fecha de Titulación: Julio, 2024

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título: Efecto de la glucólisis y la β -oxidación de ácidos grasos en el crecimiento y sensibilidad a doxorubicina de líneas de cáncer mamario

Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Morfología

Número de páginas: 99

Área de estudio: Ciencias de la Salud

Propósito y Método de Estudio: El propósito de este estudio fue investigar el efecto de la glucólisis y la β -oxidación en el crecimiento de líneas celulares de cáncer mamario, así como evaluar la sensibilidad de estas líneas a la doxorubicina en presencia de diferentes concentraciones de glucosa y lípidos. Se utilizaron las líneas celulares de cáncer MCF-7 y MDA-MB-231, línea no cancerosa VERO como referencia, y cultivos primarios de biopsias de pacientes con sospecha de cáncer mamario. Las células se expusieron a inhibidores específicos de la glucólisis y la β -oxidación, así como a concentraciones variables de glucosa, piruvato y beta-hidroxibutirato con enfoque en su efecto en la sensibilidad a doxorubicina. Los resultados fueron analizados para determinar las diferencias en la viabilidad celular ante los tratamientos, proporcionando una comprensión más profunda de las adaptaciones metabólicas en células cancerosas y su implicación en la terapia anticancerígena.

Contribuciones y Conclusiones: Este estudio contribuye al conocimiento sobre las adaptaciones metabólicas en células de cáncer de mama y su impacto en la viabilidad y respuesta a tratamientos quimioterapéuticos. Se observó que las células MDA-MB-231 dependen en mayor medida de la glucólisis en comparación a la β -oxidación para su crecimiento, lo que sugiere que las terapias dirigidas a la glucólisis podrían ser efectivas en el tratamiento del cáncer de mama triple negativo (TNBC). Se concluye que la modulación de los niveles de glucosa puede influir significativamente en la eficacia de la doxorubicina, especialmente en condiciones de baja glucosa, donde se observó mayor sensibilidad en las células TNBC. Estos hallazgos subrayan la importancia de considerar el metabolismo celular en el diseño de estrategias terapéuticas contra el cáncer, destacando el potencial de la dieta cetogénica y otras intervenciones metabólicas como complemento a la quimioterapia.

Dr. C. José Juan Pérez Trujillo

Director

AGRADECIMIENTOS

Dedico un agradecimiento muy especial a mi director de tesis, el Dr. C. José Juan Pérez Trujillo. Su inteligencia, paciencia exorbitante y dedicación inquebrantable han sido cruciales para la realización de este trabajo, a pesar de los obstáculos importantes que se presentaron. Sin importar si era fin de semana o tarde en la noche, siempre estaba dispuesto a trabajar en el laboratorio y ayudar a cualquier estudiante o colega. Además de ser una persona excepcionalmente buena y comprensiva, el Dr. José Juan hizo todo lo posible para que pudiera completar mis seminarios y mi tesis. Sin su orientación y esfuerzo, mis pequeños logros no habrían sido posibles. Agradezco mucho su esfuerzo por ayudarme a graduarme en tiempo y forma. En un tono más personal y menos formal, quiero decir que se la rifó como ningún otro. Sus pequeñas anécdotas de anime, frases y recuerdos noventeros, y su particular sentido del humor siempre añadieron un toque de diversión y alivio en momentos en que pensé que esto sería imposible. Su apoyo ha sido invaluable y siempre estaré agradecido por todo lo que ha hecho por mí.

También expreso mi más sincero agradecimiento al Codirector de esta tesis, el Dr. Víctor Oyervides Juárez, así como al Dr. Óscar Vidal Gutiérrez, jefe del Servicio de Oncología y director de nuestro hospital y facultad. Su colaboración fue valiosa, ya que gracias a ellos pudimos acceder a biopsias de pacientes con sospecha de cáncer. Valoro profundamente su esfuerzo y disposición para ayudar en nuestra investigación y por abrirnos las puertas del hospital. Aprecio su papel como enlace para obtener las biopsias y su coordinación con el departamento de radiología. Su contribución fue esencial para el desarrollo de este proyecto. Espero que esta colaboración marque el inicio de un proyecto a mediano-largo plazo en el que podamos llevar los hallazgos de la investigación básica a la práctica clínica.

Un agradecimiento especial al Dr. Adolfo Soto Domínguez. Su apoyo emocional y psicológico siempre fue una bocanada de aire fresco para mi bienestar durante este proceso. Siempre se preocupó por cómo me sentía respecto al trabajo, la familia, los estudios y la tesis, y estuvo dispuesto a dedicar tiempo para conversar sobre cualquier tema. Sus consejos, tanto personales como profesionales, y su disposición para ofrecer su apoyo en cualquier momento, fueron invaluable para mantener mi motivación y continuar con el trabajo. Aprecio enormemente su amistad y su disposición para ayudarme en todo momento.

Quisiera agradecer al Dr. Alberto Montemayor Martínez, jefe del Departamento de Radiología e Imagen, y a la Dra. Yazmín Ramírez Galván por permitirnos obtener las biopsias en el departamento de Radiología y, en coordinación con Oncología, facilitarnos el acceso expedito a las muestras.

También quisiera agradecer a la Dra. Alejandra Martínez Pérez, quien colaboró en los experimentos, nos ayudó a mantener vivas nuestras células y siempre mostró disposición para ayudar y dar consejos.

Igualmente valiosa fue la aportación del Médico Pasante Alder Perales Méndoza, quien estuvo siempre al pendiente de que obtuviéramos nuestras biopsias, siendo la persona clave

en la coordinación entre Oncología, Radiología e Histología. Su seguimiento siempre fue oportuno.

Agradezco las enseñanzas del Dr. Humberto Rodríguez Rocha en los seminarios, y la forma en que cuestiona y profundiza el raciocinio en todos nosotros como investigadores. También a la Dra. María de Jesús Loera Arias por siempre mostrar una sonrisa cuando necesitaba algo. Y a mis demás maestros que aportaron su valioso conocimiento para poder ser un mejor investigador.

A mis padres, mis miembros de comisión de toda la vida, siempre apoyándome incondicionalmente. Tendría que redactarles una tesis entera sólo para agradecerles lo que han hecho por mí.

Quisiera agradecer a mis alumnos de pregrado y becarios de histología por el apoyo moral; ustedes saben quiénes son. Y mención aparte al M.C. Daniel Guzmán Garza por siempre escucharme cuando quería desahogarme y por su apoyo moral en diversas ocasiones.

Agradezco también a las secretarias Juany, Gaby y Silvia, quienes con su eficiencia y amabilidad hicieron que todo el proceso administrativo fuera mucho más llevadero.

A mi esposa, Cinthya Lozano Alvarado, por encargarse del cuidado de nuestros hijos y apoyar el hogar mientras completaba esta tesis.

A mi hija Valentina, mi niña que me mandaba con una sonrisa al trabajo y me recibía con gritos de entusiasmo en las noches. Tu amor y alegría fueron una fuente constante de motivación.

Por último, a mi chaparro hermoso, el más guapo e inteligente de este planeta, mi niño Maximiliano, quien me acompañó en fines de semana e incluso me ayudaba llenando cajas de puntillas mientras yo trabajaba en la campana. Te admiro desde hace años y apenas tienes nueve. Te amo, mi niño hermoso.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN
2. JUSTIFICACIÓN
3. OBJETIVO GENERAL
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS
5. MATERIALES Y MÉTODOS
6. RESULTADOS
7. DISCUSIÓN
8. CONCLUSIONES
9. PERSPECTIVAS
10. BIBLIOGRAFÍA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a la inhibición de la glucólisis.

Figura 2. Efecto en la viabilidad celular de las líneas cancerosas en respuesta a la inhibición de la glucólisis.

Figura 3. Efecto de la suplementación de glucosa en la viabilidad relativa de las líneas celulares.

Figura 4. Comparación de respuesta a glucosa entre las distintas líneas celulares.

Figura 5. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a piruvato.

Figura 6. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a la inhibición de la β -oxidación.

Figura 7. Efecto en la viabilidad celular de MCF-7 en respuesta al ácido palmítico.

Figura 8. Efecto en la viabilidad celular de MDA-MB-231 en respuesta al ácido palmítico.

Figura 9. Efecto en la viabilidad celular de VERO en respuesta al acetato de sodio.

Figura 10. Efecto en la viabilidad celular de MDA-MB-231 y MCF-7 en respuesta al acetato de sodio.

Figura 11. Efecto en la viabilidad celular de MDA-MB-231 en respuesta a beta-hidroxiacetato.

Figura 12. Efecto en la viabilidad celular de MCF-7 en respuesta a beta-hidroxiacetato.

Figura 13 Efecto en la viabilidad celular de VERO en respuesta a beta-hidroxi butirato.

Figura 14. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a doxorubicina.

Figura 15. Comparación del efecto en la viabilidad celular de las tres líneas en respuesta a doxorubicina.

Figura 16. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en la línea VERO.

Figura 17. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en la línea MDA-MB-231.

Figura 18. Efecto de la suplementación de beta-hidroxi butirato en la sensibilidad a doxorubicina en la línea MDA-MB-231 ante distintas condiciones de glucosa.

Figura 19. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en el cultivo primario aislado de paciente con diagnóstico de TNBC.

Figura 20. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en el cultivo primario no tumoral de tejido mamario de paciente.

Figura 21. Porcentaje de células CD44+ presentes en los cultivos celulares

LISTA DE ABREVIATURAS

2-DG: 2-desoxiglucosa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPK: proteína quinasa activada por adenosina 5'-monofosfato

ATP: adenosín trifosfato

BHB: beta-hidroxibutirato

BRCA1: gen de susceptibilidad al cáncer de mama 1

°C: grado Celsius

DE: desviación estándar.

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco.

DMSO: dimetilsulfóxido

DOX: doxorubicina.

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

ER: receptor de estrógeno

FAO: oxidación de ácidos grasos

FGF23: factor de crecimiento de fibroblastos 23

GLUT1: transportador de glucosa tipo 1

HB2: línea celular derivada del epitelio mamario humano no canceroso

HER-2: receptor de factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2

HK2: hexoquinasa-2

HIF-1 α : factor inducible por hipoxia 1-alfa

HR: recombinación homóloga

KD: dieta cetogénica

LDHA: lactato deshidrogenasa A

MCF7: línea celular de cáncer de mama humano positivo para receptor de estrógeno y progesterona

MCT2: transportador de monocarboxilato 2

MDA-MB-231: Línea celular de cáncer de mama triple negativo

μ L: microlitro

μ M: micromolar.

mL: mililitro

mg: miligramo

mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero.

MTT: bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)

NMDA: receptor de N-metil-D-aspartato

ODC: ornitina decarboxilasa.

OXPHOS: fosforilación oxidativa

PBS: solución salina amortiguada por fosfato.

%: por ciento

PR: receptor de progesterona

r/min: revoluciones por minuto

ROS: especies reactivas de oxígeno

RTK: receptor de tirosina cinasa.

SARS-CoV-2: coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2

SFB: suero fetal bovino inactivado

TA: temperatura ambiente

TNBC: cáncer de mama triple negativo

VERO: línea celular derivada del riñón de mono verde africano no cancerosa

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento anormal y descontrolado de las células de un tejido del cuerpo, lo que puede llevarlas a invadir otros tejidos u órganos. Según la Organización Mundial de la Salud (2022), esta enfermedad tiene un impacto significativo a nivel global, afectando no solo la salud física sino también la emocional y financiera de los individuos y sus comunidades.

En 2020, se estimaron 19.3 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10 millones de muertes a nivel mundial (Sung et al., 2021). Para 2040, se proyecta un aumento significativo de estos números, especialmente en los países en desarrollo. En cuanto a tipos específicos, el cáncer de mama es el más diagnosticado a nivel global, seguido por el cáncer de pulmón, colorrectal, próstata y estómago. La mortalidad por cáncer de pulmón sigue siendo la más alta, con 1.8 millones de muertes anuales (Organización Mundial de la Salud, 2022).

Las disparidades en la incidencia y mortalidad del cáncer son evidentes entre los países desarrollados y en desarrollo. Aunque la incidencia es mayor en los países desarrollados, las tasas de mortalidad muestran menos variación, con mayores tasas de mortalidad por cáncer de mama y cuello uterino en los países en desarrollo (Sung et al., 2021).

Según Hanahan y Weinberg (2011), el cáncer se caracteriza por una serie de rasgos distintivos que incluyen el mantenimiento de señales proliferativas, la evasión de inhibidores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la capacidad de

inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y metástasis. Además, la inestabilidad genómica y la inflamación son cruciales en el desarrollo del cáncer. Estos rasgos distintivos y la reprogramación del metabolismo energético son claves para entender las complejidades del cáncer y desarrollar terapias dirigidas.

El metabolismo celular normal implica una red de procesos bioquímicos que regulan la producción de energía y la biosíntesis de macromoléculas. Las células cancerosas, a diferencia de las células normales, a menudo exhiben un aumento en la actividad glucolítica, conocido como el efecto Warburg, lo que les permite satisfacer sus altas demandas energéticas y apoyar su rápido crecimiento y proliferación (Warburg, 1956).

Cáncer de Mama

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial, representando el 30% de todos los cánceres diagnosticados en mujeres (Ubayawansa et al., 2021). Este cáncer comienza en los conductos o lóbulos de la mama y puede invadir el tejido circundante y metastatizar a otros órganos, lo cual puede ser mortal (Organización Mundial de la Salud, 2023).

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con varios subtipos, cada uno con diferentes características biológicas y respuestas al tratamiento. Los subtipos incluyen el luminal A, luminal B, HER2 positivo y triple negativo (TNBC). El TNBC es particularmente agresivo y carece de terapias dirigidas específicas, lo que lo

convierte en un foco principal de investigación para nuevas estrategias terapéuticas (Montalvo-Castro & Salinas-Jazmín, 2022).

Cáncer de Mama Triple Negativo (TNBC)

El TNBC no expresa receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) o HER2, y se caracteriza por alta malignidad, invasión significativa, alto potencial metastásico, tendencia a recaer y mal pronóstico (Yin et al., 2020). Representa del 12-17% de todos los cánceres de mama y tiene opciones terapéuticas limitadas (Gong et al., 2021).

Las células TNBC dependen en gran medida del metabolismo de la glucosa para su supervivencia y proliferación. La inhibición de la glucólisis, mediante compuestos como la 2-desoxiglucosa (2-DG), puede inhibir la proliferación de las células TNBC y activar la apoptosis, reduciendo así el crecimiento tumoral (Samuel et al., 2023).

La quimioterapia sigue siendo el tratamiento estándar para el TNBC, pero los avances en la subclasificación han identificado subtipos distintos de TNBC con biología única, lo que sugiere la necesidad de enfoques de tratamiento personalizados (Abramson et al., 2014). A pesar de los avances, el TNBC sigue siendo difícil de tratar, y los pacientes tienen pronósticos más pobres en comparación con otros subtipos de cáncer de mama (Wu et al., 2021; Choi & Kim, 2023).

Procesos Celulares Metabólicos

La glucólisis, la β -oxidación y la fosforilación oxidativa son procesos celulares metabólicos cruciales. En las células normales, estos procesos están cuidadosamente regulados para mantener la homeostasis energética y la función celular. La glucólisis es una vía metabólica fundamental que implica la descomposición de la glucosa en piruvato, produciendo ATP y NADH. Este proceso ocurre en el citoplasma y proporciona energía rápidamente, especialmente en condiciones anaeróbicas. En condiciones normales, el piruvato generado se convierte en acetil-CoA que entra en el ciclo de Krebs en la mitocondria para una mayor producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa (Morelli & Scholkmann, 2024).

La β -oxidación es el proceso mediante el cual los ácidos grasos son descompuestos en la mitocondria para producir acetil-CoA, NADH y FADH₂. Este proceso es crucial para el metabolismo energético, especialmente durante el ayuno y el ejercicio prolongado. La acetil-CoA generada entra en el ciclo de Krebs para producir ATP adicional, mientras que el NADH y el FADH₂ generados son utilizados en la cadena de transporte de electrones para la producción de ATP. En las células normales, la β -oxidación es una fuente importante de energía, particularmente en tejidos como el corazón y el músculo esquelético, que dependen en gran medida de los ácidos grasos como fuente de combustible (Eaton et al., 1996).

En las células cancerosas, estas vías están desreguladas para apoyar el crecimiento tumoral (Vander Heiden et al., 2009). La reprogramación metabólica en

el cáncer, o efecto Warburg, implica una preferencia por la glucólisis sobre la fosforilación oxidativa incluso en presencia de oxígeno (Warburg, 1956). Este fenómeno se asocia con la generación de lactato y la expresión elevada de isoformas específicas de enzimas glucolíticas en las células cancerosas. Además, proporciona intermediarios para las vías biosintéticas, esenciales para la proliferación y el crecimiento de los tumores, así como mantener el equilibrio redox. (Hanahan & Weinberg, 2011). Dirigirse a estas vías metabólicas podría ofrecer nuevas estrategias terapéuticas (Luengo, Gui, & Vander Heiden, 2017).

Glucólisis y Células Cancerosas

Estudios han demostrado que las células cancerosas dependen en gran medida de la glucólisis para satisfacer sus demandas energéticas y apoyar la rápida proliferación. La sobreexpresión de enzimas y transportadores glucolíticos, como GLUT1, HK2 y LDHA, es común en las células cancerosas (Chelakkot et al., 2023). Además, la desregulación de moléculas como LDHA y PKM2 está vinculada a la promoción del crecimiento tumoral (Kachel et al., 2015). La combinación de inhibidores de la glucólisis con quimioterapia ha mostrado aumentar la eficacia del tratamiento, lo que sugiere una estrategia prometedora para mejorar la eficacia de la terapia contra el cáncer (Maschek et al., 2004).

Disfunción Metabólica en TNBC

Dirigirse a la disfunción metabólica en TNBC muestra un gran potencial terapéutico. El TNBC es particularmente sensible a los inhibidores de la glucólisis. Estudios han demostrado que las células de TNBC dependen en gran medida de la glucólisis debido a su disfunción mitocondrial. La inhibición de la glucólisis en TNBC puede revertir el fenotipo glucolítico, favoreciendo la fosforilación oxidativa (Pelicano et al., 2014). Además, el miR-210-3p modula la actividad de HIF-1 α y p53, reguladores clave del efecto Warburg, sugiriendo su potencial terapéutico (Du et al., 2020).

Los inhibidores de la glucólisis, como la 2-desoxiglucosa, han mostrado potencial en la inhibición selectiva de células cancerosas (Tran et al., 2020). La disfunción metabólica también se ha relacionado con el síndrome metabólico y el peor pronóstico en cáncer de mama, resaltando la importancia de las intervenciones en el estilo de vida, como modificaciones dietéticas y aumento de la actividad física (Chueh & Yoo, 2017).

La inhibición de la oxidación de ácidos grasos (FAO) y la síntesis de poliaminas ha demostrado reducir el crecimiento de TNBC. Las alteraciones metabólicas también se asocian con receptores de tirosina cinasa como EGFR y MET (Camarda et al., 2016). Además, el perfil metabólico alterado del TNBC resalta la necesidad de investigaciones integrales para identificar vulnerabilidades metabólicas específicas y desarrollar estrategias terapéuticas efectivas (Lanning et al., 2017).

El piruvato es un intermediario crucial en el metabolismo celular. En las células cancerosas, la conversión de piruvato a lactato es preferida, lo que apoya su rápido

crecimiento. Además, el transporte mitocondrial del piruvato se ha identificado como un factor crítico en la represión del efecto Warburg y en el control del crecimiento de las células cancerosas del colon, sugiriendo que la manipulación del metabolismo del piruvato podría ser una estrategia terapéutica viable (Schell et al., 2017). Estudios recientes han demostrado que la ausencia de piruvato exógeno bajo condiciones de alta glucosa induce una rápida y extensa muerte celular, subrayando su papel crucial en el mantenimiento de la viabilidad celular y la producción de energía (Yako et al., 2021). Otro estudio muestra que las células de cáncer de mama MCF-7 pueden ajustar significativamente la cantidad de metabolitos y las tasas de reacción, resaltando la importancia del reciclaje del piruvato y su carboxilación para mantener la producción de energía y la síntesis de biomoléculas (Otto, 2020).

Glucosa y Sensibilidad a Quimioterapéuticos

Las concentraciones de glucosa influyen significativamente en la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos, afectando la proliferación celular, la apoptosis y los resultados del tratamiento. Varios estudios han resaltado la relación intrincada entre la disponibilidad de glucosa y las respuestas de las células cancerosas a diversos agentes quimioterapéuticos, arrojando luz sobre los posibles mecanismos y estrategias terapéuticas.

Birsoy et al. (2014) enfatizaron la importancia de considerar las concentraciones de glucosa al evaluar la sensibilidad de las células cancerosas a las biguanidas u otros inhibidores de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). El estudio subrayó cómo la limitación de glucosa y la presencia de biguanidas pueden afectar las respuestas de

las células cancerosas, destacando los determinantes metabólicos que influyen en la sensibilidad a estos tratamientos.

Khajah et al. (2022) investigaron los efectos de la privación de glucosa en líneas celulares de cáncer de mama y su interacción con paclitaxel y doxorubicina. El estudio demostró que las bajas concentraciones de glucosa inducían apoptosis y necrosis celular, mejorando los efectos antiproliferativos de agentes quimioterapéuticos como paclitaxel y doxorubicina, lo que sugiere que los niveles de glucosa pueden modular la eficacia de la quimioterapia en las células de cáncer de mama.

Varghese et al. (2019) exploraron el impacto de las altas concentraciones de glucosa en los efectos antiproliferativos y pro-apoptóticos de la metformina en células de cáncer de TNBC. El estudio reveló que los niveles altos de glucosa reducían significativamente la eficacia de la metformina para inhibir la proliferación celular, la muerte celular y la detención del ciclo celular, indicando una posible conexión entre el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la quimioterapia en el cáncer de mama.

Xu et al. (2018) investigaron cómo la hiperglucemia afecta la eficacia del fármaco quimioterapéutico adriamicina (ADR) a través de la vía AMPK. Descubrieron que la hiperglucemia disminuye significativamente la eficiencia anticancerígena de la ADR al desregular la vía AMPK, lo que a su vez reduce el daño al ADN inducido por la ADR. Este efecto se observó en células de cáncer de hígado HepG2 y Bel-7402, así como en modelos de ratón.

Schroll et al. (2017) investigaron la combinación de restricción de glucosa, inhibición de la autofagia y quimioterapia en esferoides de HCT 116. El estudio demostró que al debilitar las células cancerosas con restricción de glucosa e inhibición de la autofagia antes de la quimioterapia, las células se volvían más sensibles a la terapia, indicando una estrategia potencial para mejorar la eficacia del tratamiento a través de la modulación metabólica.

Otros estudios han resaltado la importancia de la regulación metabólica en la sensibilidad a la quimioterapia. Por ejemplo, Yi et al. (2020) mostraron que la inhibición de la enzima hexoquinasa 2 (HK2), un regulador clave de la glucólisis, podía aumentar la sensibilidad de las células cancerosas al tratamiento con cisplatino. Del mismo modo, Ghanem et al. (2021) encontraron que la manipulación de la vía de la pentosa fosfato podía alterar la resistencia a la quimioterapia en células de cáncer de pulmón, subrayando la interconexión entre el metabolismo de la glucosa y la respuesta al tratamiento.

La Dieta Cetogénica

La dieta cetogénica (KD) ha emergido como una estrategia prometedora en la modulación del metabolismo del cáncer. Esta dieta, caracterizada por un alto contenido de grasas y una muy baja ingesta de carbohidratos, induce un estado metabólico de cetosis donde el cuerpo produce cuerpos cetónicos (como el beta-hidroxibutirato) como fuente principal de energía en lugar de glucosa (Allen et al., 2014).

Numerosos estudios preclínicos han demostrado que la KD puede ralentizar el crecimiento de tumores y aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a la quimioterapia. Por ejemplo, Talib et al. (2021) mostraron que la KD puede reducir la disponibilidad de glucosa para las células cancerosas, limitando su capacidad para proliferar rápidamente. Además, la producción de cuerpos cetónicos puede inducir estrés metabólico en las células cancerosas, promoviendo la apoptosis (Seyfried et al. 2017).

La KD también puede influir en diversas vías de señalización que son cruciales para la supervivencia y proliferación de las células cancerosas. Por ejemplo, el beta-hidroxibutirato puede inhibir la histona deacetilasa (HDAC), modulando la expresión génica y afectando la proliferación celular (Shimazu et al. 2013). La reducción de los niveles de insulina y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) en respuesta a la KD puede disminuir la activación de vías de señalización proliferativas como la PI3K/AKT/mTOR. Además, el beta-hidroxibutirato puede actuar sinérgicamente con la quimioterapia, potenciando sus efectos citotóxicos y reduciendo la viabilidad celular (Cortez & McKenzie, 2021).

La combinación de KD con quimioterapias como la doxorrubicina ha mostrado resultados prometedores. En condiciones de glucosa reducida, las células cancerosas son más vulnerables al daño inducido por la quimioterapia debido a su mayor dependencia de la glucosa para el ATP y la síntesis de biomoléculas (Meidenbauer et al. 2015).

Aunque la evidencia clínica aún es limitada, estudios preliminares sugieren que la KD puede ser beneficiosa para algunos pacientes con cáncer. Estos hallazgos apoyan la necesidad de más estudios clínicos para evaluar la eficacia y seguridad de la KD como un enfoque terapéutico complementario en el tratamiento del cáncer.

Cuerpos Cetónicos

Los cuerpos cetónicos, como el acetoacetato, el beta-hidroxibutirato (BHB) y la acetona, son moléculas producidas en el hígado durante periodos de baja disponibilidad de carbohidratos (Puchalska & Crawford 2021). Estos sirven como fuentes alternativas de energía para los tejidos. En las células cancerosas, el metabolismo de los cuerpos cetónicos ha sido estudiado debido a su potencial impacto en el crecimiento y progresión tumoral (Meidenbauer et al. 2015).

El beta-hidroxibutirato (BHB) es un cuerpo cetónico producido en el hígado a partir de ácidos grasos durante periodos de baja ingesta de alimentos, dietas restrictivas en carbohidratos, ayuno o ejercicio intenso prolongado. El BHB tiene efectos significativos en las células cancerosas, influyendo tanto en la supresión como en la promoción tumoral en diferentes contextos. Por ejemplo, ha mostrado inducir la apoptosis en células de cáncer de pulmón A549 bajo condiciones de privación de glucosa, incrementando los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuyendo la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx) (Shirian et al., 2024).

El BHB puede reducir la viabilidad celular y promover la apoptosis al alterar la glucólisis y aumentar la β -oxidación de ácidos grasos (Kolb et al. 2021). Este

impacto en las vías metabólicas sugiere que el BHB puede reprogramar el metabolismo de las células cancerosas, haciendo que dependan menos de la glucólisis y más de las rutas mitocondriales.

El BHB puede inhibir la proliferación de células cancerosas, como se demostró en células de cáncer de mama que expresan el transportador monocarboxilato 2 (MCT2), donde se observó un aumento en la acetilación de histona H3K9, asociada con la sobreexpresión de genes que promueven el crecimiento tumoral (Huang et al., 2017). Sin embargo, estudios como el de Bartmann et al. (2018) en siete líneas celulares de cáncer de mama bajo condiciones de concentración fisiológica de BHB, mostraron que BHB no tuvo un impacto significativo en la proliferación celular, la viabilidad o la sensibilidad a la quimioterapia y radiación, sugiriendo la seguridad de las dietas cetogénicas en pacientes con cáncer de mama.

El BHB afecta la regulación epigenética de la expresión génica, modulando la acetilación de histonas y regulando genes involucrados en la supervivencia y proliferación de células cancerosas (Shimazu et al., 2013). Feger (2023) reportó que el BHB regula la angiogénesis tumoral al aumentar el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23) a través de la inducción del complejo del factor de transcripción NFκB.

Las dietas cetogénicas, que son altas en grasas y bajas en carbohidratos, han mostrado potencial terapéutico en TNBC. Estudios preliminares han evaluado su efecto combinado con metformina en modelos de ratón, demostrando una

ralentización del crecimiento tumoral mediante la reducción de glucosa sistémica y la inhibición de la gluconeogénesis (Schmidt et al. 2024).

Investigaciones adicionales indican que las dietas cetogénicas pueden inducir apoptosis y reducir la proliferación celular en TNBC, así como modificar el microambiente tumoral para afectar la disponibilidad de nutrientes y las vías metabólicas críticas (Zheng et al., 2021). Estos efectos sugieren que las dietas cetogénicas, en combinación con otros tratamientos, podrían ofrecer una nueva estrategia terapéutica para TNBC.

Uso de las Líneas Celulares Vero, MDA-MB-231 y MCF7 en Investigación

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 son modelos bien establecidos de células de cáncer de mama, representando células positivas y negativas para el receptor de estrógeno, respectivamente. Estas líneas han contribuido significativamente al conocimiento sobre la biología del cáncer de mama, incluyendo la supervivencia celular, la proliferación, la invasión y la respuesta a los tratamientos (Mladkova, 2010).

Las células Vero, derivadas del riñón de un mono verde africano, se utilizan ampliamente en investigaciones de microbiología y biología molecular debido a su capacidad para ser pasadas indefinidamente (Kiesslich & Kamen 2020).

Estudios han investigado la sensibilidad de las líneas celulares de cáncer de mama a los agentes quimioterapéuticos, proporcionando conocimientos sobre las respuestas al tratamiento y posibles marcadores predictivos (Hatzis et al. 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama triple negativo (TNBC) representa un desafío clínico significativo debido a su agresividad y la ausencia de opciones terapéuticas específicas dirigidas. Esta situación ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para controlar el desarrollo tumoral. Una de las opciones prometedoras se basa en aprovechar la reprogramación metabólica que ocurre en las células cancerosas, las cuales dependen en gran medida de la glucólisis para su supervivencia.

Estudios previos han demostrado *in vitro*, tanto en líneas celulares establecidas como en modelos preclínicos, que la inhibición de la glucólisis puede controlar el crecimiento tumoral. Además, se ha obtenido evidencia en humanos de que las dietas con una restricción significativa de carbohidratos pueden tener un impacto positivo en el control del crecimiento del cáncer.

Sin embargo, persiste la necesidad de evidencia más específica sobre el papel de la glucólisis y la β -oxidación en las células tumorales de cáncer de mama y su efecto en la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo analizar *in vitro* el comportamiento de las células tumorales en crecimiento ante distintas condiciones de macronutrientes disponibles en su entorno.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la glucólisis y β -oxidación en el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama y su sensibilidad a doxorubicina.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de la glucólisis en el crecimiento de las líneas celulares de cáncer mamario.
2. Determinar el efecto de la β -oxidación en el crecimiento de las líneas celulares de cáncer mamario.
3. Determinar la sensibilidad de las líneas celulares hacia doxorubicina en presencia de glucosa o lípidos.
4. Determinar la sensibilidad de células primarias de cáncer de mama hacia doxorubicina en presencia de glucosa o lípidos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos y materiales de laboratorio

Medios de Cultivo Celular:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), Sigma-Aldrich ®
- Suero fetal bovino (SFB) para cultivo celular, Corning ®
- Suplemento de glutamina (Gibco)
- Suplemento de piruvato (Gibco)
- Glucosa (Sigma Aldrich)
- Antibiótico /Antimicótico (Gibco)

Inhibidores y Tratamientos:

- 2-DG (2-desoxi-D-glucosa) (ChemCruz)
- Ácido palmítico (Sigma Aldrich)
- Acetato de sodio (Sigma Aldrich)
- Beta-hidroxibutirato de sodio (Sigma Aldrich)
- Doxorrubicina (Sigma Aldrich)
- Trimetazidina (Idaptan)

Sustancias y Soluciones de Prueba:

- Alamar Blue (Thermo Scientific)
- PBS (solución salina tamponada con fosfato)
- Trypsin-EDTA (Gibco)
- MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. (Merck)
- Colagenasa (Thermo Scientific)
- Hialuronidasa (Invitrogen)
- Anticuerpo CD44 (Thermo Scientific)

Consumibles de Cultivo Celular:

- Placas de cultivo celular (6, 12, 24, 96 pocillos) (NUNC)
- Frascos de cultivo celular (T25 y T75) (NUNC)
- Pipetas y puntas estériles (NUNC)
- Tubos (15 ml, 50 ml) (Corning)
- Crioviales para almacenamiento de células (NUNC)
- Strainer (BD)

Líneas celulares utilizadas

Línea Celular MDA-MB-231: Células epiteliales de adenocarcinoma de mama humano (ATCC HTB-26, Manassas, Virginia, EE.UU.). Esta línea celular es ampliamente utilizada en investigaciones sobre cáncer de mama, especialmente en estudios relacionados con el TNBC debido a su naturaleza altamente agresiva y su falta de expresión de receptores hormonales y HER2.

Línea Celular MCF7: Células epiteliales de adenocarcinoma de mama humano positivo para receptores hormonales (ATCC HTB-22, Manassas, Virginia, EE.UU.). La línea MCF7 es utilizada en estudios sobre cáncer de mama debido a su expresión de receptores de estrógeno y progesterona, lo que la hace relevante para investigaciones sobre terapias hormonales.

Línea Celular Vero: Células derivadas del riñón de un mono verde africano (*Chlorocebus sp.*) (ATCC CCL-81, Manassas, Virginia, EE.UU.). La línea Vero es ampliamente utilizada en estudios de virología, toxicología y en investigaciones de biología celular debido a su estabilidad y capacidad para ser cultivada indefinidamente.

Células Primarias de Paciente con TNBC: Células aisladas de una biopsia de un paciente diagnosticado con TNBC. Estas células primarias se obtuvieron del Servicio de Oncología y fueron cultivadas en el laboratorio para su expansión y análisis. Su estudio es fundamental debido a la agresividad y falta de opciones terapéuticas específicas para TNBC.

Células Primarias de Paciente con Papiloma Intraductal: Células aisladas de una biopsia de un paciente diagnosticado con papiloma intraductal. Estas células se utilizaron como control en los experimentos debido a su naturaleza benigna y no cancerosa. Al igual que las células de TNBC, se cultivaron y expandieron en el laboratorio para su análisis comparativo.

Materiales de Documentación y Análisis

1. Software de Análisis de Datos:

- GraphPad (Prism)
- Software ToupView de captura de micrografías

5.1.2 Equipos de laboratorio

Equipos de Cultivo Celular:

- Incubadora de CO₂
- Campana de seguridad biológica Tipo 2
- Microscopio de campo claro
- Microscopio de contraste de fases

Equipos de Análisis y Medición:

- Espectrofotómetro (iMark)
- Citómetro de flujo Acuri C6 (BD)
- Fluorómetro FLx800
- Balanza analítica Serie GR, A&D weighing®

5.2 Métodos

Las líneas celulares MDA-MB-231, MCF7, y Vero fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich ®) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, Corning ®), 1% de suplemento de glutamina, y 1% de antibióticos/antimicóticos (penicilina/estreptomicina). Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células primarias fueron cultivadas en medio DMEM:F12 (Sigma-Aldrich ®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Corning ®), 1% de suplemento de glutamina, y 1% de antibióticos/antimicóticos (penicilina/estreptomicina)

5.2.1 Análisis de la viabilidad celular relativa de las líneas celulares en respuesta a la presencia de glucosa y piruvato.

Se plaquearon 3000 células/pozo en placas de 96 pozos. Tras su adherencia se cambió el medio DMEM 5% FBS 25 mM glucosa por 200 µl de medio DMEM 1% FBS en presencia de distintas concentraciones de glucosa (0-25 mM) y de piruvato (0-10 mM). Se incubó por espacio de 48 h a 37°C 5% CO₂, y se procedió al análisis de viabilidad celular mediante Alamar Blue siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación de la conversión del Alamar Blue fue realizada en fluorómetro FLx800 bajo una longitud de excitación de 528 nM y una longitud de emisión de 590 nM. Se calculó la viabilidad relativa ajustada al control indicado para cada resultado.

5.2.2 Análisis de la viabilidad celular relativa de las líneas celulares en respuesta a la presencia de lípidos.

Se plaquearon 3000 células/pozo en placas de 96 pozos. Tras su adherencia se cambió el medio DMEM 5% FBS 25 mM glucosa por 200 µl de medio DMEM 1% FBS en presencia de distintas moléculas de lípidos: ácido palmítico (0-250 µM), acetato de sodio (0-25mM) y beta-hidroxibutirato (0-25mM). Se incubó por espacio de 48 h a 37°C 5% CO₂, y se procedió al análisis de viabilidad celular mediante Alamar Blue siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación de la conversión del Alamar Blue fue realizada en fluorómetro FLx800 bajo una longitud de excitación de 528 nM y una longitud de emisión de 590 nM. Se calculó la viabilidad relativa ajustada al control indicado para cada resultado.

5.2.3 Análisis de la viabilidad celular relativa de las líneas celulares en respuesta a los inhibidores de glucólisis y beta-oxidación.

Se plaquearon 3000 células/pozo en placas de 96 pozos. Tras su adherencia se cambió el medio DMEM 5% FBS 25 mM glucosa por 200 μ l de medio DMEM 1% FBS en presencia de distintas concentraciones de 2-DG (inhibidor de glucólisis) y Trimetazidina (inhibidor de β -oxidación). Se incubó por espacio de 48 h a 37°C 5% CO₂, y se procedió al análisis de viabilidad celular mediante Alamar Blue siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación de la conversión del Alamar Blue fue realizada en fluorómetro FLx800 bajo una longitud de excitación de 528 nM y una longitud de emisión de 590 nM. Se calculó la viabilidad relativa ajustada al control indicado para cada resultado.

5.2.4 Análisis de la viabilidad celular relativa de las líneas celulares en respuesta a doxorrubicina.

Se plaquearon 3000 células/pozo en placas de 96 pozos. Tras su adherencia se cambió el medio DMEM 5% FBS 25 mM glucosa por 200 μ l de medio DMEM 1% FBS a distintas concentraciones de doxorrubicina (0-10 μ M) en presencia de distintas combinaciones de glucosa + beta-hidroxiacetato. Se incubó por espacio de 48 h a 37°C 5% CO₂, y se procedió al análisis de viabilidad celular mediante Alamar Blue siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación de la conversión del Alamar Blue fue realizada en fluorómetro FLx800 bajo una longitud de excitación de 528 nM y una longitud de emisión de 590 nM. Se calculó la viabilidad relativa ajustada al control indicado para cada resultado.

5.2.5 Aislamiento de células primarias a partir de biopsias de tejido mamario.

Para el cálculo de la muestra de biopsias de células primarias en este estudio, se adoptó un enfoque basado en la disponibilidad de muestras durante un periodo específico. Las biopsias fueron obtenidas del Servicio de Oncología y transportadas inmediatamente al laboratorio de cultivo celular. Las muestras fueron procesadas bajo condiciones estériles en una cabina de seguridad biológica. Los fragmentos de tejido fueron disgregados mecánicamente, tratados con colagenasa:hialuronidasa 1x por espacio de 4 hrs, tratados con una solución de Tripsina-EDTA 0.05% por 5 minutos. La suspensión celular fue cultivada en placas de 6 pozos recubiertas con Matrigel (Corning) y con medio DMEM:F12 (Sigma-Aldrich ®) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Corning ®), 1% de suplemento de glutamina, y 1% de antibióticos/antimicóticos (penicilina/estreptomicina). En la siembra para los ensayos de viabilidad celular, se ajustó de 10% SFB a 5% SFB.

5.2.6 Citometría de flujo para detección del marcador CD44 en superficie celular.

Se colectaron 200 000 células de cada línea celular cultivada en sus condiciones de medio suplementado para subcultivos. Las células fueron lavadas con buffer FACS 1x (PBS 1x, 1 mM EDTA, 1% BSA) por 2 ocasiones, y se añadió 100 µl de FACS 1x con el anticuerpo CD44 (1:200) marcado con Alexa Fluor 488. Se incubó a 4°C en oscuridad por espacio de 30 minutos, y posteriormente se realizaron 2 lavados con buffer FACS 1x. Se resuspendió el pellet final en 300 µl del mismo buffer. La lectura se realizó 2 horas posteriores al marcaje usando un citómetro de Accuri C6 (BD).

5.2.7 Análisis estadístico

Estadística Inferencial: Para evaluar las diferencias significativas entre los grupos experimentales, se emplearon análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Esta prueba estadística permite determinar si existen diferencias significativas en las medias de múltiples grupos, considerando dos factores independientes.

- **ANOVA de Dos Vías:** Esta prueba se utilizó para evaluar la interacción entre los distintos factores experimentales. El ANOVA de dos vías permitió identificar no solo los efectos principales de cada factor, sino también las interacciones entre ellos.
- **Pruebas Post Hoc:** Cuando el ANOVA de dos vías indicó diferencias significativas, se realizaron pruebas post hoc para identificar específicamente cuáles grupos diferían entre sí. Dependiendo del diseño experimental y los objetivos específicos de cada análisis, se emplearon las siguientes pruebas post hoc:
 - **Prueba de Tukey:** Utilizada para comparaciones múltiples cuando se deseaba controlar el error de tipo I y proporcionar intervalos de confianza para las diferencias entre pares de medias.
 - **Prueba de Dunnett:** Empleada para comparaciones específicas de cada grupo experimental con un grupo control, ideal para evaluar el efecto de tratamientos en comparación con un control estándar.

El software GraphPad Prism fue utilizado para realizar todos los análisis estadísticos y generar las gráficas correspondientes. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo en todas las pruebas realizadas.

6. RESULTADOS

6.1 EFECTO DE LA GLUCÓLISIS EN EL CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER MAMARIO

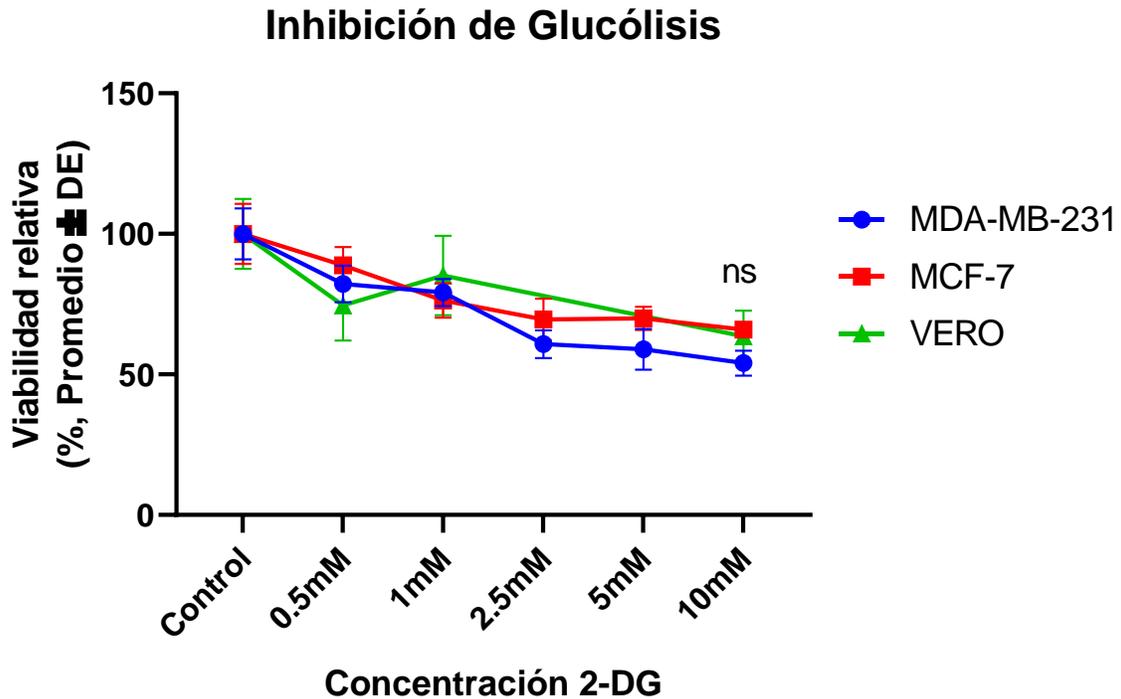


Figura 1. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a la inhibición de la glucólisis. La viabilidad relativa se expresa como un porcentaje del control (100%) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

De acuerdo a la figura 1, observamos:

- A medida que aumenta la concentración de 2-DG de 0.5 mM a 10 mM, la viabilidad relativa de todas las líneas celulares disminuye.
- La línea MDA-MB-231 (azul) muestra una mayor sensibilidad a la inhibición de la glucólisis, con una disminución más marcada de la viabilidad a partir de 5 mM.

- La línea MCF-7 (rojo) y la línea VERO (verde) también muestran una disminución en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de 2-DG, aunque con una menor sensibilidad en comparación con MDA-MB-231; sin embargo, no es estadísticamente significativo.

Interpretación

- Estos resultados indican que la inhibición de la glucólisis mediante 2-DG afecta la viabilidad de las células cancerosas MDA-MB-231 y MCF-7, así como de las células no cancerosas Vero. Pero al comparar solamente las 2 líneas cancerosas, se obtiene una diferencia significativa en cuanto a viabilidad a partir de 5 Mm de 2-DG, como se muestra en la figura 2.

Inhibición de glucólisis

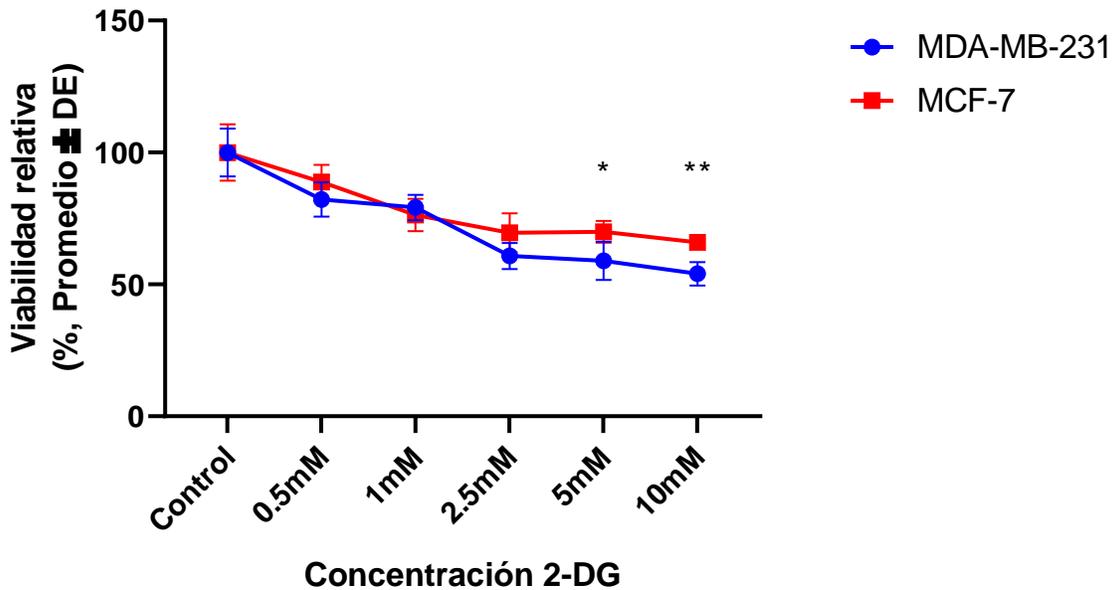


Figura 2. Efecto en la viabilidad celular de las líneas cancerosas en respuesta a la inhibición de la glucólisis. La gráfica muestra la viabilidad relativa de las dos líneas celulares cancerosas (MDA-MB-231 y MCF-7) en función de diferentes concentraciones de 2-DG (2-desoxi-D-glucosa), un inhibidor de la glucólisis. La viabilidad relativa se expresa como un porcentaje del control (100%) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados Observados

- A medida que aumenta la concentración de 2-DG de 0.5 mM a 10 mM, la viabilidad relativa de ambas líneas celulares disminuye.
- La línea MDA-MB-231 (azul) muestra una disminución de la viabilidad y diferencia significativa con la MCF7 a partir de 5 mM de 2-DG.
- La línea MCF-7 (rojo) también muestra una disminución en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de 2-DG, aunque con una menor sensibilidad en comparación con MDA-MB-231.

- Las diferencias en la viabilidad celular entre las diferentes concentraciones de 2-DG se representan mediante barras de error, indicando la desviación estándar de los datos.

Interpretación

Estos resultados indican que la inhibición de la glucólisis mediante 2-DG afecta la viabilidad de las células cancerosas MDA-MB-231 y MCF-7. La mayor sensibilidad observada en la línea MDA-MB-231 sugiere una mayor dependencia de esta línea celular a la glucólisis para su supervivencia y crecimiento.

Posteriormente, se evaluó la viabilidad de las líneas celulares en diferentes concentraciones de glucosa después de 48 horas de incubación, como se muestra en la figura 3.

Suplementación de glucosa en diferentes concentraciones

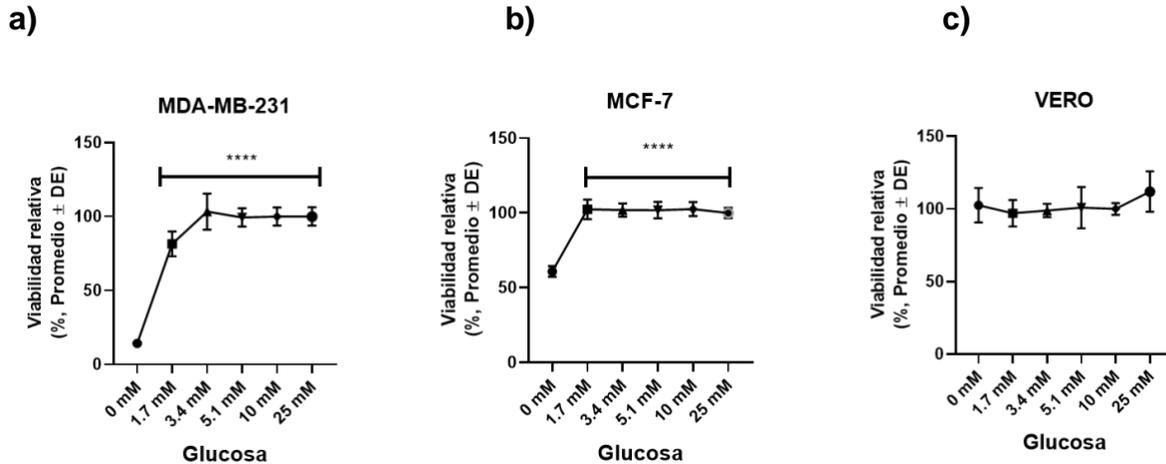


Figura 3. Efecto de la suplementación de glucosa en la viabilidad relativa de las líneas celulares. Se utilizó al control (0 mM de glucosa) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados observados:

a) MDA-MB-231: La viabilidad celular aumenta significativamente con la adición de glucosa, alcanzando una meseta a partir de 3.4-5 mM. La viabilidad relativa se mantiene alta hasta 25 mM de glucosa, indicando una fuerte dependencia de esta línea celular en la glucosa para su supervivencia y crecimiento.

b) MCF-7: Similar a MDA-MB-231, la viabilidad celular de MCF-7 también aumenta significativamente con la adición de glucosa y se estabiliza a partir de 1.7-3.4 mM, manteniéndose alta hasta 25 mM de glucosa.

c) VERO: Las células Vero muestran una viabilidad relativa constante en todas las concentraciones de glucosa, indicando una flexibilidad metabólica que les permite mantener la viabilidad incluso en ausencia de glucosa.

Interpretación

Estos resultados indican que tanto las células MDA-MB-231 como las MCF-7 dependen significativamente de la glucosa para su viabilidad y crecimiento, mientras que las células Vero son capaces de mantener su viabilidad a través de otras rutas metabólicas, independientemente de la concentración de glucosa disponible. En la figura 4 se pueden analizar en conjunto las gráficas de la figura 3.

Efecto de la glucosa en la viabilidad celular

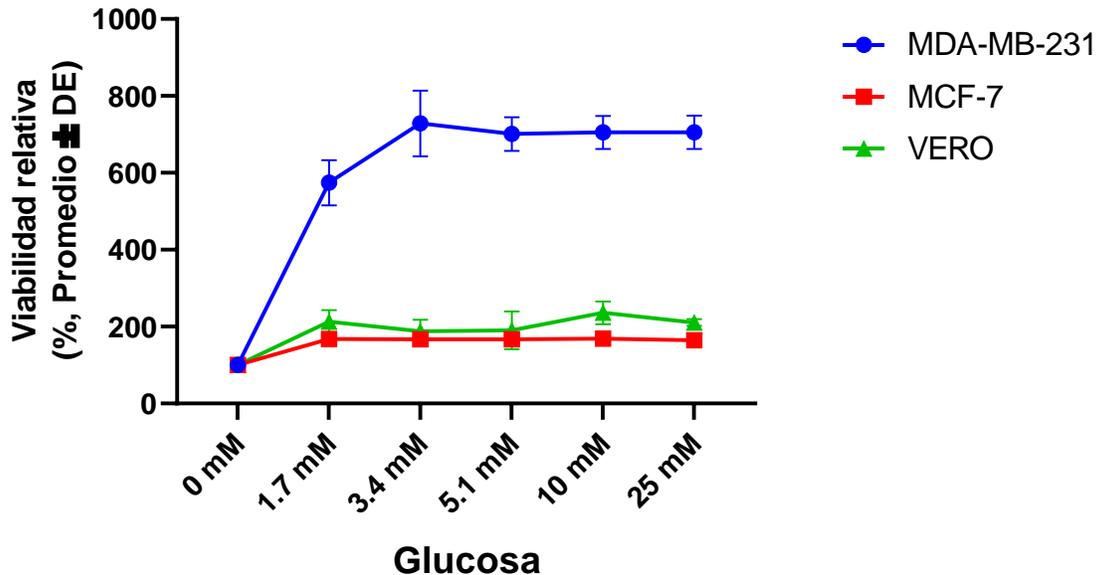


Figura 4. Comparación de respuesta a glucosa entre las distintas líneas celulares. Viabilidad relativa de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y VERO en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 mM de glucosa) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados observados:

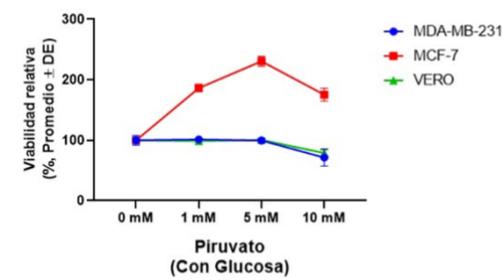
Las células MDA-MB-231 y MCF-7 presentan un notable incremento en viabilidad celular con concentraciones crecientes de glucosa, mientras que la viabilidad de las células Vero permanece constante.

Interpretación

Estos resultados sugieren que tanto las células MDA-MB-231 como las MCF-7 dependen de manera notable de la glucosa para su viabilidad y crecimiento. En contraste, las células Vero son capaces de mantener su viabilidad a través de otras rutas metabólicas, independientemente de la concentración de glucosa disponible.

Efecto del piruvato en la viabilidad celular

a)



b)

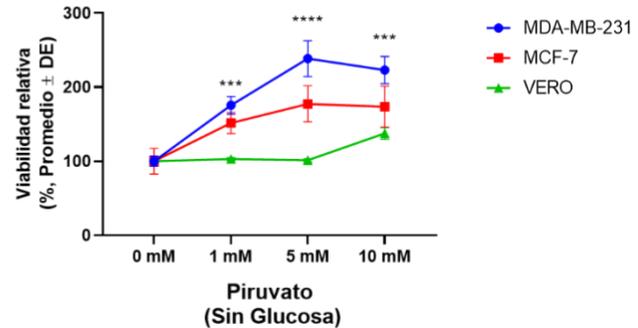


Figura 5. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a piruvato. Viabilidad relativa de las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y VERO en respuesta a diferentes concentraciones de piruvato. En a) se presenta la suplementación con 25 mM de Glucosa y en b) a 0 mM de glucosa. La viabilidad relativa se expresa partiendo del control (0 mM de piruvato) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados observados:

Las gráficas en la Figura 5 muestran la respuesta de las tres líneas celulares a diferentes concentraciones de piruvato bajo dos condiciones:

- **Con Glucosa (a), 25 mM:**
 - **MDA-MB-231:** La viabilidad celular se mantiene constante y no muestra una respuesta significativa al piruvato en presencia de glucosa.
 - **MCF-7:** Las células MCF-7 muestran un aumento en la viabilidad con la adición de piruvato, alcanzando un pico en 5 mM antes de disminuir significativamente a 10 mM.

- **VERO:** Las células Vero mantienen una viabilidad constante y no muestran una respuesta significativa al piruvato en presencia de glucosa.
- **Sin Glucosa (b), 0 mM:**
 - **MDA-MB-231:** Las células MDA-MB-231 muestran un aumento significativo en viabilidad con la adición de piruvato, alcanzando un máximo a 5 mM antes de disminuir ligeramente a 10 mM.
 - **MCF-7:** Las células MCF-7 también muestran un aumento significativo en viabilidad con la adición de piruvato, similar a las MDA-MB-231.
 - **VERO:** Las células Vero muestran un aumento en viabilidad a 10 mM de piruvato, pero en menor medida que las líneas cancerosas.

Interpretación

Estos resultados sugieren que, en ausencia de glucosa, el piruvato puede ser utilizado como una fuente alternativa de energía por las células MDA-MB-231 y MCF-7, aumentando significativamente su viabilidad. En presencia de glucosa, el efecto del piruvato es menos pronunciado, especialmente en las células MDA-MB-231 y Vero. En cuanto a las MCF7, esto puede deberse a una mayor actividad mitocondrial. La información presentada indica que las células cancerosas pueden tener una mayor flexibilidad metabólica para utilizar piruvato en ausencia de glucosa, mientras que las células no cancerosas (Vero) dependen menos de esta fuente de energía alternativa.

6.2 EFECTO DE LA β -OXIDACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER MAMARIO

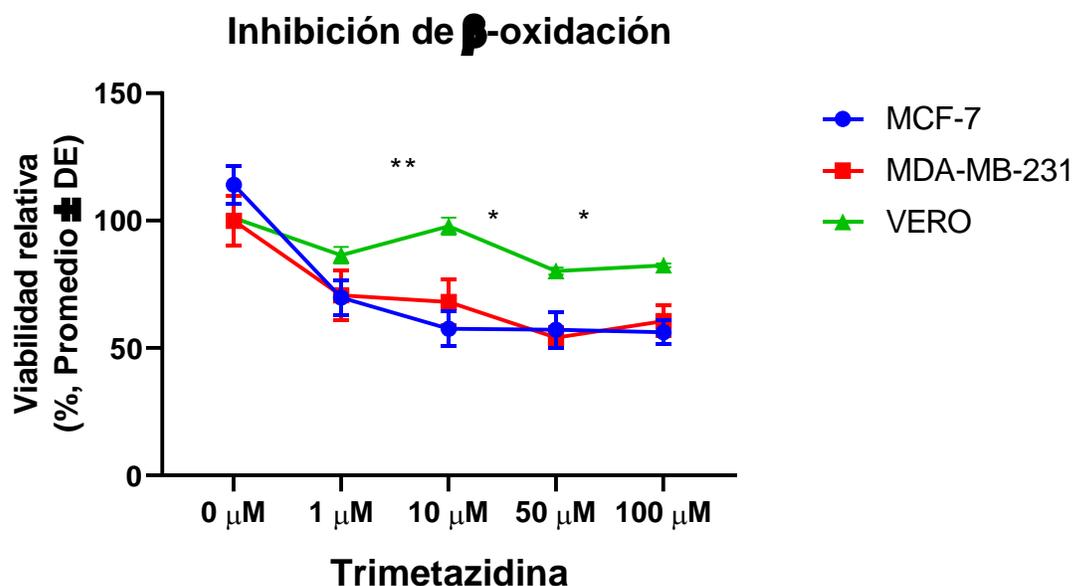


Figura 6. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a la inhibición de la beta-oxidación. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μ M de trimetazidina) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados

- **MCF-7:** La viabilidad celular disminuye significativamente con la adición de trimetazidina, especialmente a concentraciones de 1 μ M y superiores.
- **MDA-MB-231:** Similar a las MCF-7, las células MDA-MB-231 muestran una disminución significativa en viabilidad con la adición de trimetazidina, alcanzando una reducción notable a partir de 10 μ M.
- **VERO:** Las células Vero también muestran una disminución en viabilidad con la adición de trimetazidina, pero el efecto es menos pronunciado en comparación con las líneas cancerosas.

Interpretación

Estos resultados indican que la trimetazidina, un inhibidor de la β -oxidación, reduce significativamente la viabilidad de las líneas celulares cancerosas (MCF-7 y MDA-MB-231) y no cancerosas (Vero). Sin embargo, las células cancerosas muestran una mayor sensibilidad a la inhibición de la β -oxidación en concentraciones más bajas de trimetazidina en comparación con las células Vero. Esto sugiere que la β -oxidación es una ruta metabólica importante para la viabilidad de las células cancerosas y que la inhibición de esta ruta puede ser una estrategia terapéutica efectiva.

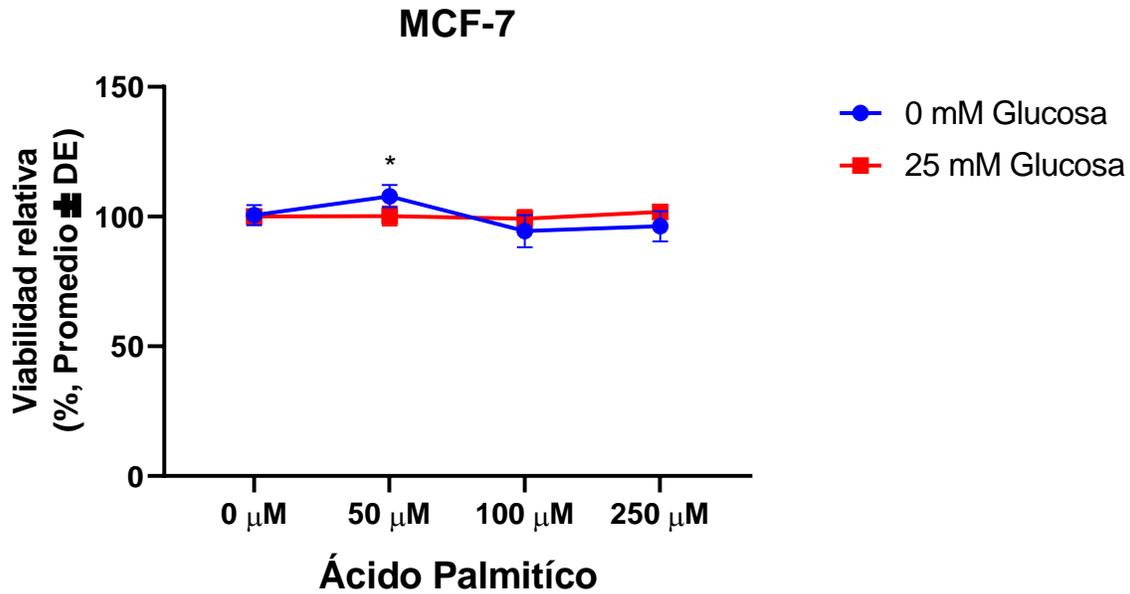


Figura 7. Efecto en la viabilidad celular de MCF-7 en respuesta al ácido palmítico. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de ácido palmítico) y se presenta como promedio ± desviación estándar (DE). ANOVA, post-hoc Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados observados:

La gráfica en la Figura 7 muestra la respuesta de la línea celular MCF-7 a diferentes concentraciones de ácido palmítico bajo dos condiciones de glucosa:

- **0 mM Glucosa:** La viabilidad celular se mantiene relativamente constante con la adición de ácido palmítico.
- **25 mM Glucosa:** La viabilidad celular permanece estable en todas las concentraciones de ácido palmítico evaluadas, sin cambios significativos en comparación con el control.

Interpretación

Estos resultados sugieren que la adición de ácido palmítico no afecta significativamente la viabilidad de las células MCF-7 con o sin presencia de glucosa. Esto podría reflejar una capacidad de estas células para utilizar el ácido palmítico sin comprometer su viabilidad, independientemente de la disponibilidad de glucosa.

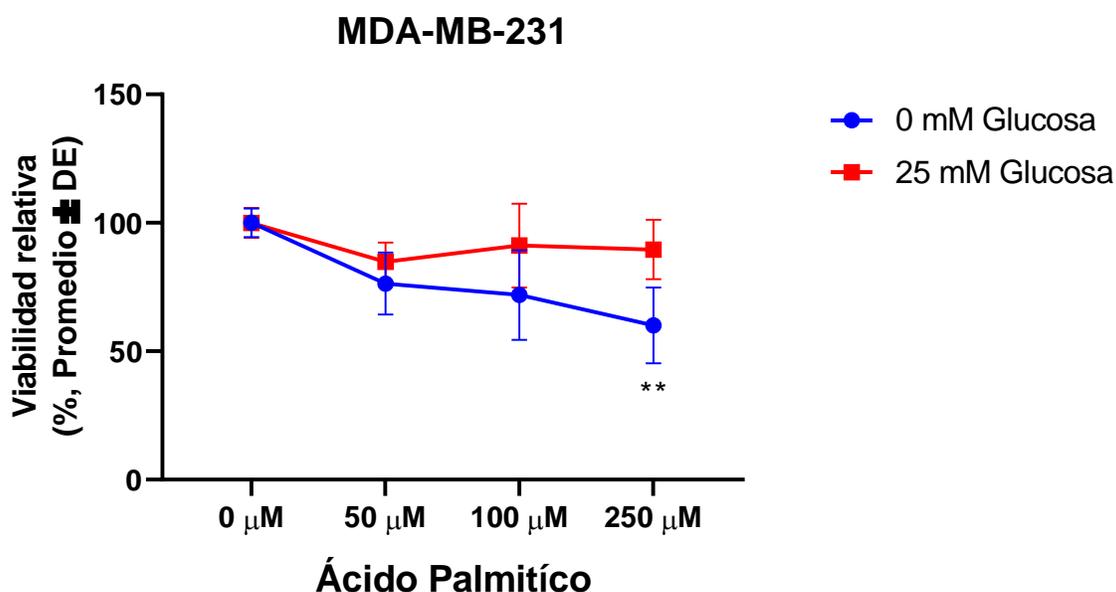


Figura 8. Efecto en la viabilidad celular de MDA-MB-231 en respuesta al ácido palmítico. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de ácido palmítico) y se presenta como promedio ± desviación estándar (DE). ANOVA, post-hoc Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 8 muestra la respuesta de la línea celular MDA-MB-231 a diferentes concentraciones de ácido palmítico bajo dos condiciones de glucosa:

- **0 mM Glucosa:** La viabilidad celular disminuye con la adición de ácido palmítico, con una tendencia muy marcada desde 100 μ M y una reducción significativa observada a 250 μ M. Se ha reportado un posible efecto apoptótico del ácido palmítico sobre esta línea, lo que coincide con nuestros resultados (Yang et al., 2018)
- **25 mM Glucosa:** La viabilidad celular se mantiene más estable en todas las concentraciones de ácido palmítico evaluadas, sin cambios significativos en comparación con el control. La presencia de glucosa podría explicar que, a pesar de haber inducción de apoptosis, basta con la glucosa para mantener viable a las células.

Interpretación

Estos resultados sugieren que las células MDA-MB-231 son más sensibles al ácido palmítico en ausencia de glucosa, mostrando una disminución significativa en viabilidad a 250 μ M. En presencia de glucosa, las células parecen ser más resistentes al efecto citotóxico del ácido palmítico. Esto podría indicar que la disponibilidad de glucosa proporciona una protección metabólica a las células MDA-MB-231 contra el estrés inducido por el ácido palmítico, reflejando la importancia de la glucosa en la supervivencia celular y en la resistencia a ácidos grasos específicos.

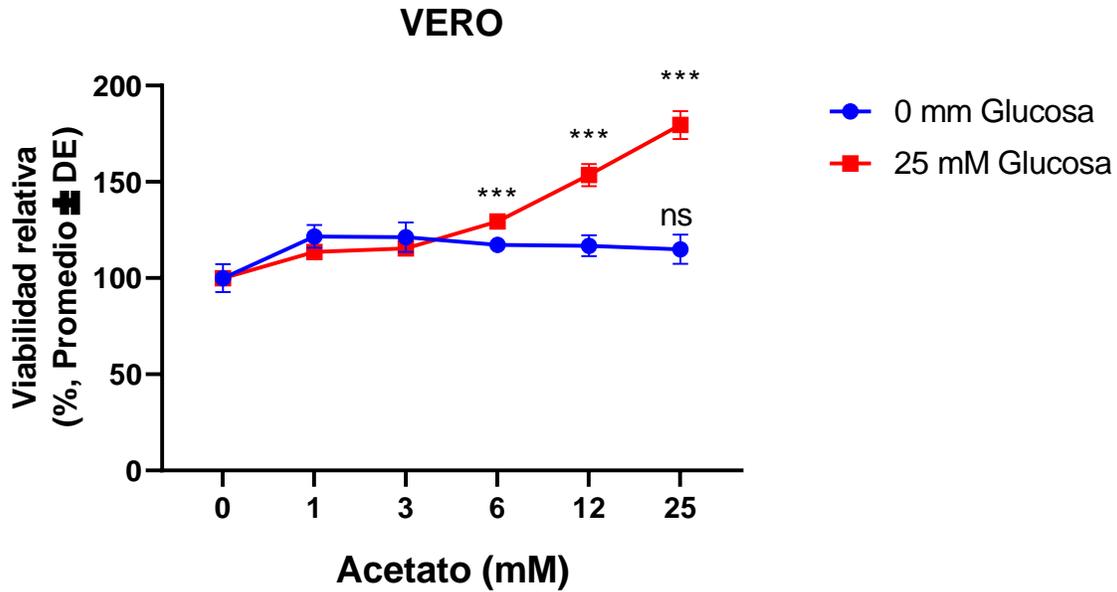


Figura 9. Efecto en la viabilidad celular de VERO en respuesta al acetato de sodio. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 mM de acetato) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA, post-hoc Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 9 muestra la respuesta de la línea celular Vero a diferentes concentraciones de acetato bajo dos condiciones de glucosa:

- **0 mM Glucosa:** La viabilidad celular se mantiene relativamente constante en todas las concentraciones de acetato evaluadas, sin cambios significativos en comparación con el control.
- **25 mM Glucosa:** La viabilidad celular aumenta significativamente con la adición de acetato, con un incremento notable a partir de 6 mM, manteniéndose en aumento hasta 25 mM.

Interpretación

Estos resultados sugieren que las células Vero son capaces de utilizar el acetato como una fuente de energía alternativa en presencia de glucosa, lo que se refleja en el aumento significativo de la viabilidad celular. En ausencia de glucosa, el acetato no parece tener un efecto significativo en la viabilidad celular. Esto indica que la disponibilidad de glucosa es un factor crucial para la utilización del acetato en las células Vero, demostrando capacidad para adaptarse a diferentes fuentes de energía.

Acetato de sodio en líneas cancerosas

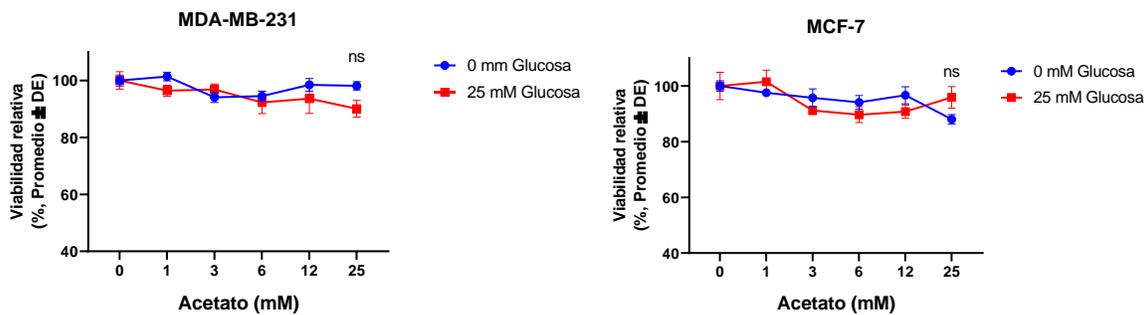


Figura 10. Efecto en la viabilidad celular de MDA-MB-231 y MCF-7 en respuesta al acetato de sodio. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 mM de acetato) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA, post-hoc Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados

- **MDA-MB-231:** La gráfica muestra que la viabilidad de las células MDA-MB-231 se mantiene relativamente constante a través de todas las concentraciones de acetato en ambas condiciones de glucosa (0 mM y 25 mM). No se observan diferencias significativas en la viabilidad celular.
- **MCF-7:** Similar a las MDA-MB-231, en las células MCF-7 tampoco se presenta una variabilidad en la viabilidad relativa en respuesta al acetato en ambas condiciones de glucosa.

Interpretación

Estos resultados sugieren que tanto las células MDA-MB-231 como las MCF-7 no presentan una variación significativa en su viabilidad en respuesta al acetato, independientemente de la presencia o ausencia de glucosa. Esto indica que el

acetato no es un factor crítico para la viabilidad de estas líneas celulares en las condiciones experimentales probadas. Es posible que sí se esté utilizando como fuente de energía, pero también puede que exista un arresto celular inducido por acetato, como se ha reportado en la literatura (Sahuri-Arisoylu et al., 2021).

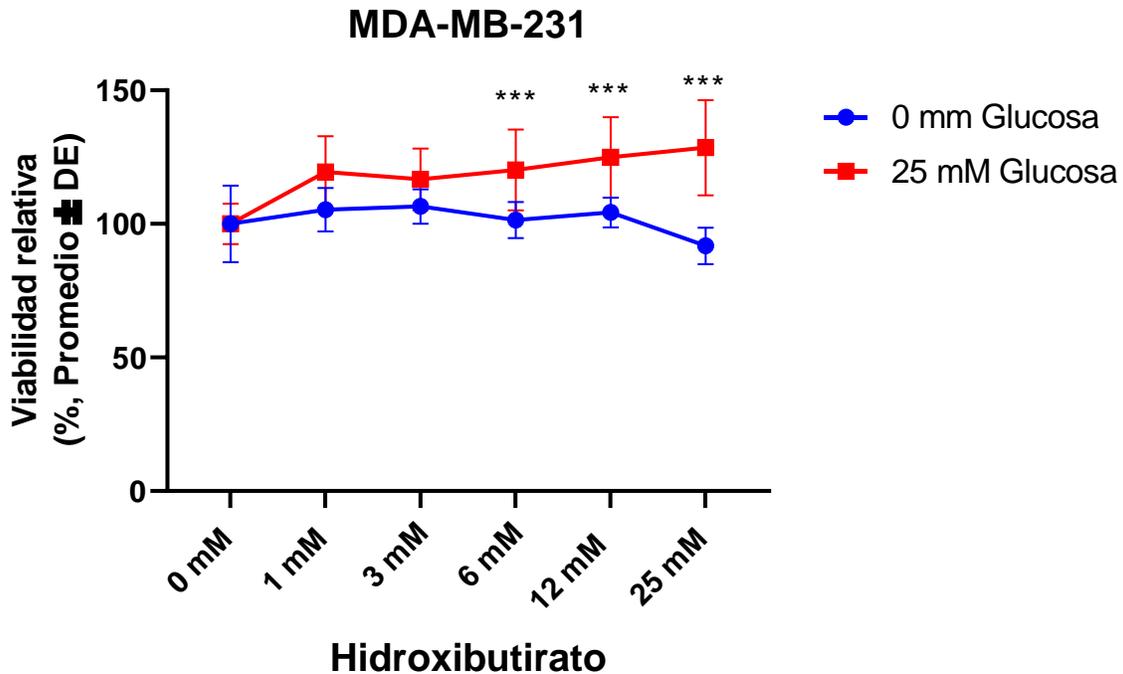


Figura 11. Efecto en la viabilidad celular de MDA-MB-231 en respuesta al beta-hidroxiacetato. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 mM de BHB) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA, post-hoc Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados

- MDA-MB-231:** La gráfica muestra que la viabilidad de las células MDA-MB-231 aumenta significativamente en presencia de glucosa (25 mM) y concentraciones de BHB a partir de 6 mM en adelante. En ausencia de glucosa (0 mM), la viabilidad celular se mantiene relativamente constante y no muestra aumentos significativos en respuesta al BHB.

Interpretación

Estos resultados sugieren que las células MDA-MB-231, una línea de TNBC, responden favorablemente al BHB cuando se encuentran en un entorno con alta concentración de glucosa (25 mM). La mejora en la viabilidad celular en presencia de BHB y glucosa puede estar relacionada con la capacidad del BHB para proporcionar una fuente alternativa de energía a través de la cetogénesis, además de sus propiedades protectoras contra el estrés oxidativo.

En contraste, en ausencia de glucosa, las células MDA-MB-231 no muestran una variación significativa en su viabilidad con diferentes concentraciones de BHB. Esto indica que la presencia de glucosa es crucial para que el BHB ejerza su efecto positivo sobre la viabilidad celular. Este hallazgo es coherente con estudios previos que sugieren que el BHB puede potenciar el crecimiento celular y la viabilidad en condiciones de alto contenido de glucosa, proporcionando una fuente energética adicional y modulando vías metabólicas y de señalización celular involucradas en la supervivencia y proliferación celular (Kolb et al., 2021).

Estudios adicionales sobre BHB pueden enriquecer los conocimientos debido a su importancia en la dieta cetogénica.

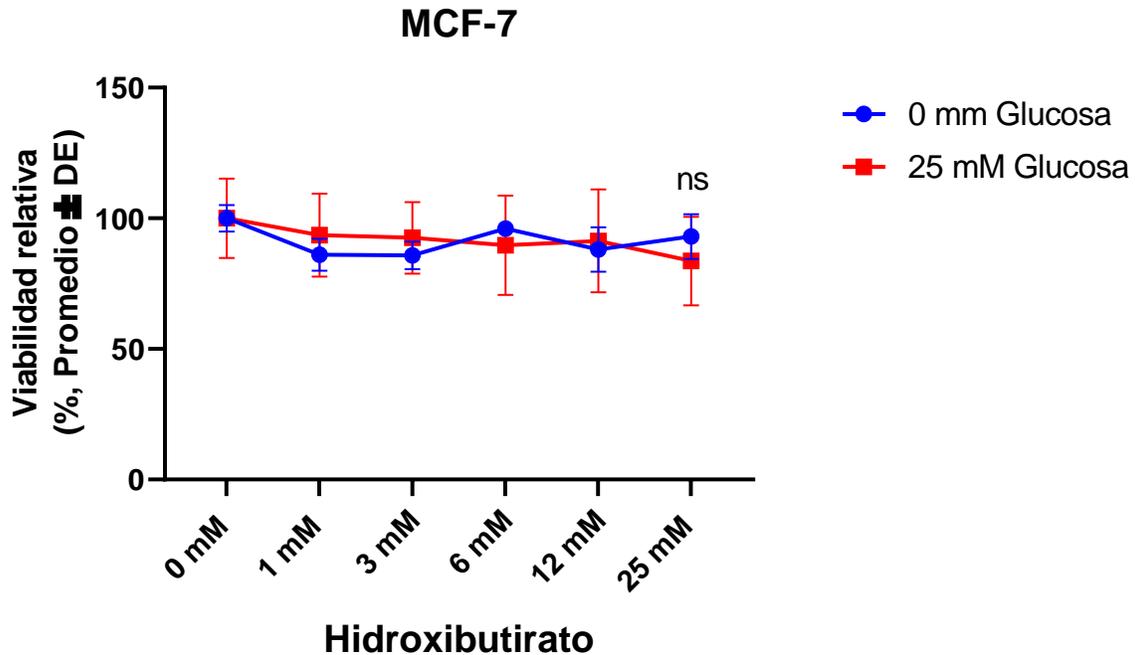


Figura 12. Efecto en la viabilidad celular de MCF-7 en respuesta a beta-hidroxiacetato. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 mM de BHB) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA, post-hoc Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 12 muestra la respuesta de la línea celular MCF-7 a diferentes concentraciones de beta-hidroxiacetato (BHB) en dos condiciones de glucosa:

- **0 mM Glucosa:** La viabilidad celular se mantiene constante a través de las diferentes concentraciones de BHB, sin cambios significativos.
- **25 mM Glucosa:** Similarmente, la viabilidad celular no presenta cambios significativos en respuesta al BHB en comparación con el control.

Los resultados muestran que el beta-hidroxibutirato no afecta significativamente la viabilidad de las células MCF-7 en condiciones tanto de ausencia como de alta concentración de glucosa.

Interpretación

Estos resultados sugieren que, a diferencia de las células MDA-MB-231, las células MCF-7 no son sensibles al BHB como fuente de energía alternativa ni presentan cambios en viabilidad cuando se les administra BHB, independientemente de la disponibilidad de glucosa. Esto podría estar relacionado con diferencias en las rutas metabólicas preferidas por las células MCF-7 en comparación con las MDA-MB-231, así como en la capacidad de utilización del BHB.

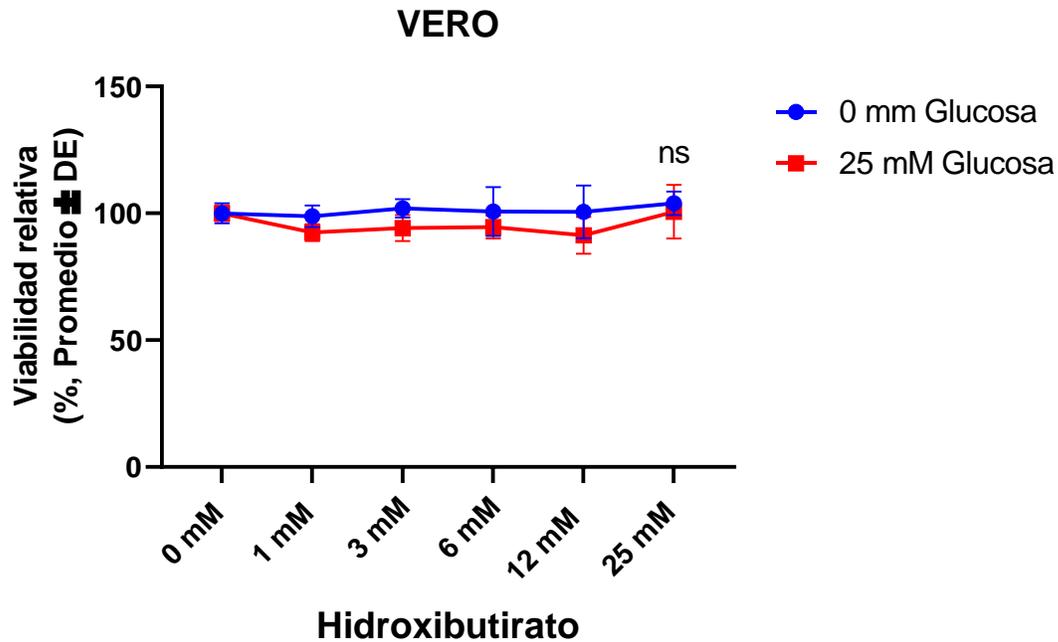


Figura 13. Efecto en la viabilidad celular de VERO en respuesta a beta-hidroxibutirato. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 mM de BHB) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA, post-hoc Dunnet ($p \leq 0.05$).

Resultados

La gráfica en la Figura 13 muestra la respuesta de la línea celular Vero a diferentes concentraciones de beta-hidroxibutirato (BHB) en dos condiciones de glucosa:

- **0 mM Glucosa:** La viabilidad celular se mantiene constante a través de las diferentes concentraciones de BHB, sin cambios significativos.
- **25 mM Glucosa:** Similarmente, la viabilidad celular no presenta cambios significativos en respuesta al BHB en comparación con el control.

Los resultados muestran que el beta-hidroxibutirato no afecta significativamente la viabilidad de las células Vero en condiciones tanto de ausencia como de alta concentración de glucosa.

Interpretación

Estos resultados muestran que, al igual que las células MCF-7, las células VERO no presentan cambios en viabilidad cuando se les administra BHB, independientemente de la disponibilidad de glucosa. Sin embargo, sí es posible que las células Vero estén utilizando el BHB para mantener su viabilidad, pero debido a su flexibilidad metabólica, no muestran una variación significativa en la viabilidad. Esto indica que las células Vero pueden mantener su viabilidad utilizando otras rutas metabólicas, sin depender exclusivamente del BHB o de glucosa.

6.3 SENSIBILIDAD DE LAS LÍNEAS CELULARES HACIA DOXORRUBICINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA O LÍPIDOS

Sensibilidad a la Doxorubicina en Líneas Celulares MDA-MB-231, MCF-7 y VERO

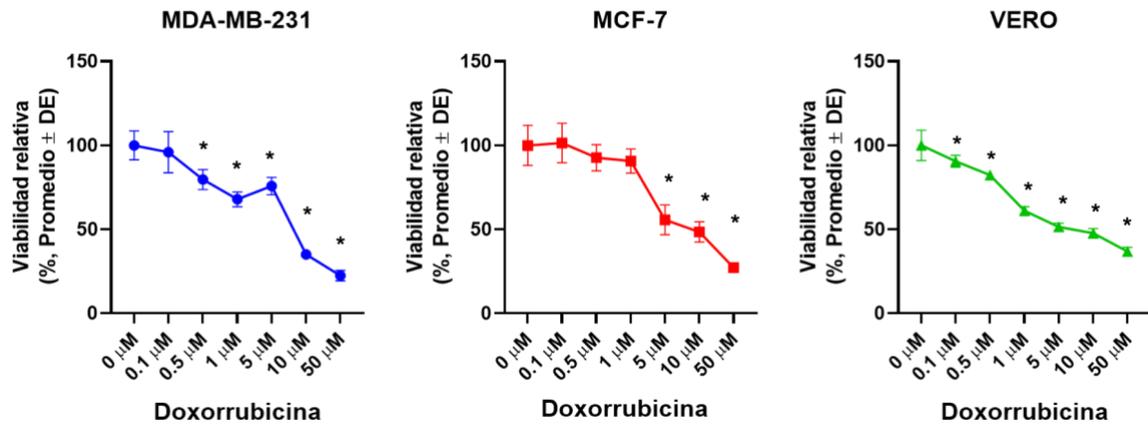


Figura 14. Efecto en la viabilidad celular en respuesta a doxorubicina. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 µM de doxorubicina) y se presenta como promedio ± desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Dunnet ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 14 muestra la respuesta de tres líneas celulares a diferentes concentraciones de doxorubicina:

- **MDA-MB-231:** La viabilidad celular disminuye significativamente con el aumento de la concentración de doxorubicina, mostrando una clara respuesta dosis-dependiente.

- **MCF-7:** Similar a MDA-MB-231, la viabilidad celular de MCF-7 también disminuye con el aumento de la concentración de doxorubicina.
- **VERO:** Las células Vero muestran una disminución en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de doxorubicina, aunque la respuesta es menos pronunciada en comparación con las líneas cancerosas.

Los resultados indican que todas las líneas celulares son sensibles a la doxorubicina, mostrando una disminución en la viabilidad celular con el aumento de la concentración del quimioterapéutico. Las células MDA-MB-231 y MCF-7 muestran una mayor sensibilidad en comparación con las células Vero.

Interpretación

Estos resultados sugieren que la doxorubicina es efectiva en la reducción de la viabilidad celular en líneas cancerosas MDA-MB-231 y MCF-7, así como en las células no cancerosas Vero. La mayor sensibilidad observada en las líneas cancerosas respalda el uso de doxorubicina como agente quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer de mama. La respuesta dosis-dependiente también indica que la eficacia de la doxorubicina aumenta con su concentración, lo cual es consistente con su mecanismo de acción como agente que induce daño en el ADN y apoptosis en células cancerosas. En la figura 15 se han combinado los datos de cada una de estas líneas celulares en una sola grafica para ofrecer una visión comparativa y comprensiva de los resultados obtenidos en los experimentos.

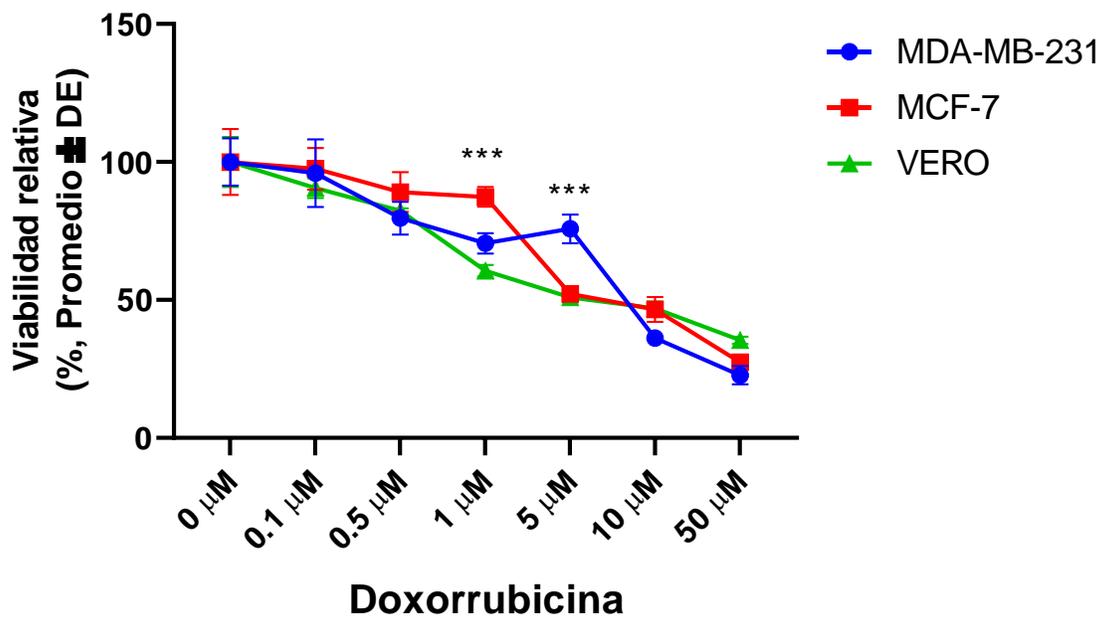


Figura 15. Comparación del efecto en la viabilidad celular de las tres líneas en respuesta a doxorubicina. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de doxorubicina) y se presenta como promedio ± desviación estándar (DE). Se muestran las curvas de doxorubicina de la figura pasada en una sola gráfica, pudiendo observar como las líneas cancerosas fueron más sensibles a la doxorubicina que la línea Vero. ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

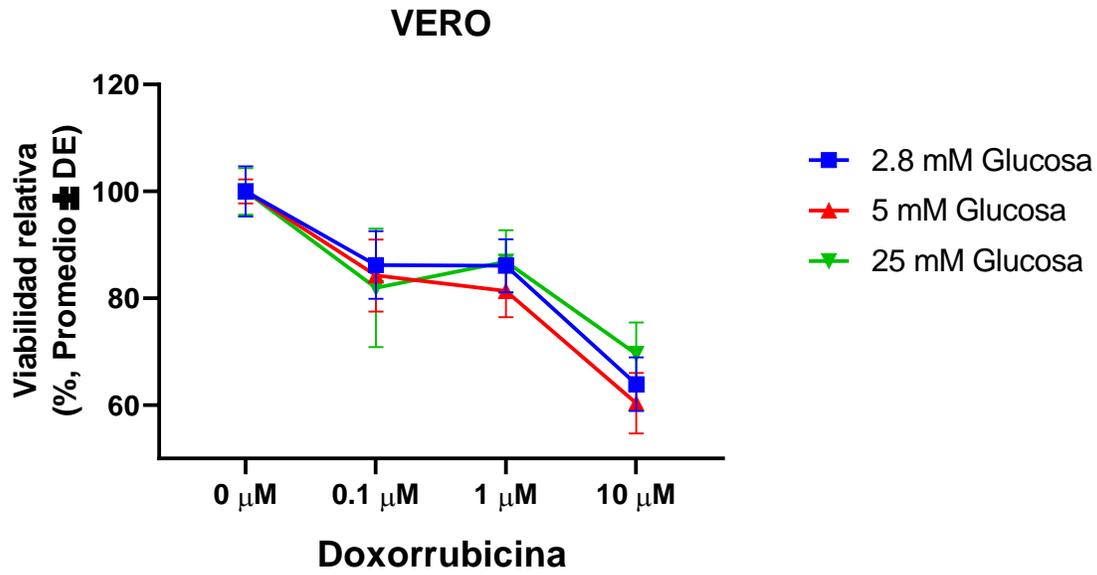


Figura 16. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en la línea VERO. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de doxorubicina) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 16 muestra la respuesta de la línea celular VERO a diferentes concentraciones de doxorubicina bajo tres niveles de glucosa:

- **VERO (2.8 mM Glucosa):** La viabilidad celular disminuye con el aumento de la concentración de doxorubicina, mostrando una respuesta dosis-dependiente.
- **VERO (5 mM Glucosa):** Similar a la condición de 2.8 mM, se observa una disminución en la viabilidad celular con el incremento de la concentración de doxorubicina.

- **VERO (25 mM Glucosa):** Las células Vero también presentan una reducción en la viabilidad con el aumento de la concentración de doxorubicina, aunque la respuesta es comparable a las otras condiciones de glucosa.

Los resultados indican que las células Vero son sensibles a la doxorubicina en todas las concentraciones de glucosa evaluadas. La disminución en la viabilidad celular es consistente y dosis-dependiente, sugiriendo que la doxorubicina es efectiva independientemente del nivel de glucosa en el medio de cultivo.

Interpretación

Estos hallazgos sugieren que la sensibilidad de las células Vero a la doxorubicina no está significativamente influenciada por la concentración de glucosa. Esto podría implicar que las células Vero mantienen mecanismos de respuesta a la doxorubicina que son independientes de su metabolismo glucolítico. La respuesta dosis-dependiente observada reafirma la eficacia de la doxorubicina como agente citotóxico en células no cancerosas bajo diversas condiciones de glucosa.

Este análisis proporciona una base para comparar la respuesta de las células Vero con las líneas celulares cancerosas, ayudando a entender las diferencias en la sensibilidad a quimioterapéuticos y la influencia del metabolismo celular en la eficacia del tratamiento.

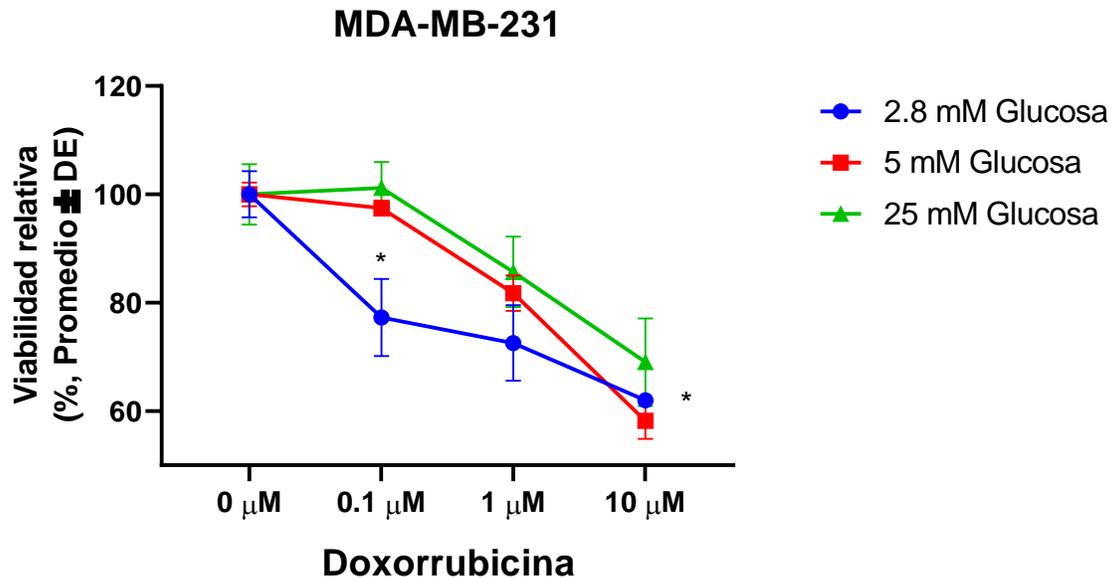


Figura 17. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en la línea MDA-MB-231. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de doxorubicina) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 17 muestra la respuesta de la línea celular MDA-MB-231 a diferentes concentraciones de doxorubicina bajo tres niveles de glucosa:

- **2.8 mM Glucosa:** Se observa una marcada disminución en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de doxorubicina. La disminución es significativa a partir de 0.1 μM de doxorubicina.
- **5 mM Glucosa:** La viabilidad celular disminuye de manera similar con el aumento de la concentración de doxorubicina, aunque la respuesta es menos pronunciada en comparación con 2.8 mM de glucosa.
- **25 mM Glucosa:** Aunque también se observa una disminución en la viabilidad celular con el aumento de la concentración de doxorubicina, esta

condición muestra una menor sensibilidad comparada con 2.8 mM y 5 mM de glucosa.

Los resultados indican que las células MDA-MB-231 son más sensibles a la doxorubicina en condiciones de baja glucosa (2.8 mM), mostrando una disminución significativa en la viabilidad celular.

Interpretación

Estos hallazgos sugieren que la reducción de la concentración de glucosa en el entorno celular aumenta la sensibilidad de las células MDA-MB-231 a la doxorubicina. Esto podría estar relacionado con la dependencia de estas células del metabolismo glucolítico para su viabilidad y proliferación. La mayor efectividad de la doxorubicina en condiciones de baja glucosa resalta la importancia de considerar el entorno metabólico en el diseño de estrategias terapéuticas para el TNBC.

La comparación de la sensibilidad a la doxorubicina bajo diferentes condiciones de glucosa proporciona información valiosa sobre cómo el metabolismo celular puede influir en la eficacia del tratamiento quimioterapéutico.

Sensibilidad a doxorrubicina a diferentes concentraciones de doxorrubicina y beta-hidroxitirato

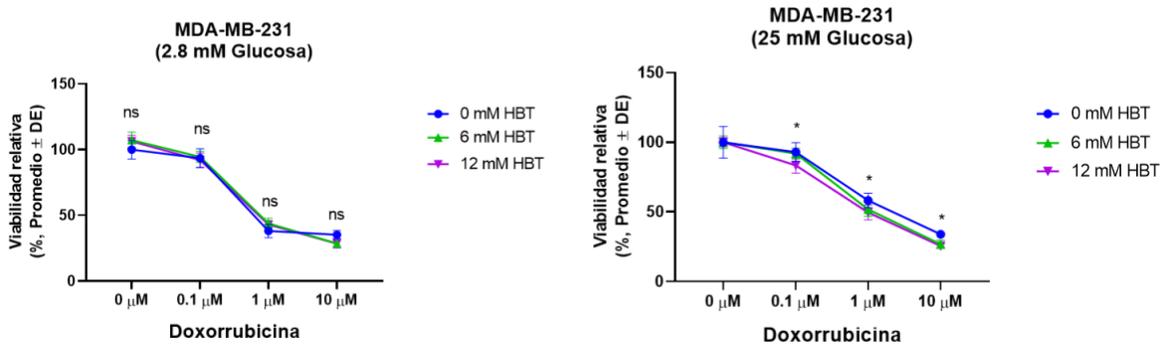


Figura 18. Efecto de la suplementación de beta-hidroxitirato en la sensibilidad a doxorrubicina en la línea MDA-MB-231 ante distintas condiciones de glucosa. Viabilidad relativa de la línea celular MDA-MB-231 en respuesta a diferentes concentraciones de doxorrubicina (0.1 μM , 1 μM y 10 μM) y en presencia de beta-hidroxitirato (BHT) a 0 mM, 6 mM y 12 mM, bajo condiciones de glucosa a a) 2.8 mM y b) 25 mM. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de doxorrubicina) y se presenta como promedio \pm desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 18 muestra la respuesta de la línea celular MDA-MB-231 a diferentes concentraciones de doxorrubicina bajo dos niveles de glucosa (2.8 mM y 25 mM) y en presencia de beta-hidroxitirato:

- **2.8 mM Glucosa:**
 - Sin BHT (0 mM): La viabilidad disminuye con el aumento de la concentración de doxorrubicina.
 - Con BHT (6 mM y 12 mM): No se observan diferencias significativas en la viabilidad celular comparado con la condición sin BHT.

- **25 mM Glucosa:**

- Sin BHB (0 mM): La viabilidad disminuye con el aumento de la concentración de doxorubicina.
- Con BHB (6 mM y 12 mM): Se observa una disminución adicional en la viabilidad celular, siendo esta disminución significativa.

Las células MDA-MB-231 muestran diferencias en la sensibilidad a la doxorubicina dependiendo de la concentración de glucosa y la presencia de beta-hidroxibutirato. Los resultados indican que la presencia de beta-hidroxibutirato (BHB) no afecta significativamente la viabilidad de las células MDA-MB-231 en condiciones de baja glucosa (2.8 mM). Sin embargo, en condiciones de alta glucosa (25 mM), el beta-hidroxibutirato aumenta la sensibilidad a la doxorubicina, reduciendo la viabilidad celular de manera significativa a 1 μM y 10 μM de doxorubicina.

Interpretación

Estos hallazgos sugieren que el beta-hidroxibutirato puede influir en la efectividad de la doxorubicina, particularmente en entornos con altas concentraciones de glucosa. La mayor sensibilidad observada en estas condiciones puede deberse a la capacidad del beta-hidroxibutirato para modificar el metabolismo celular, afectando la viabilidad de las células cancerosas cuando se combina con quimioterapéuticos como la doxorubicina. Este efecto sinérgico resalta la importancia de considerar el metabolismo energético en el diseño de terapias combinadas para el tratamiento del TNBC.

La interacción entre beta-hidroxiacetato y doxorubicina bajo diferentes condiciones de glucosa proporciona una perspectiva valiosa sobre cómo las intervenciones metabólicas pueden mejorar la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos.

6.4 SENSIBILIDAD DE CÉLULAS PRIMARIAS DE CÁNCER DE MAMA HACIA DOXORRUBICINA EN PRESENCIA DE GLUCOSA O LÍPIDOS

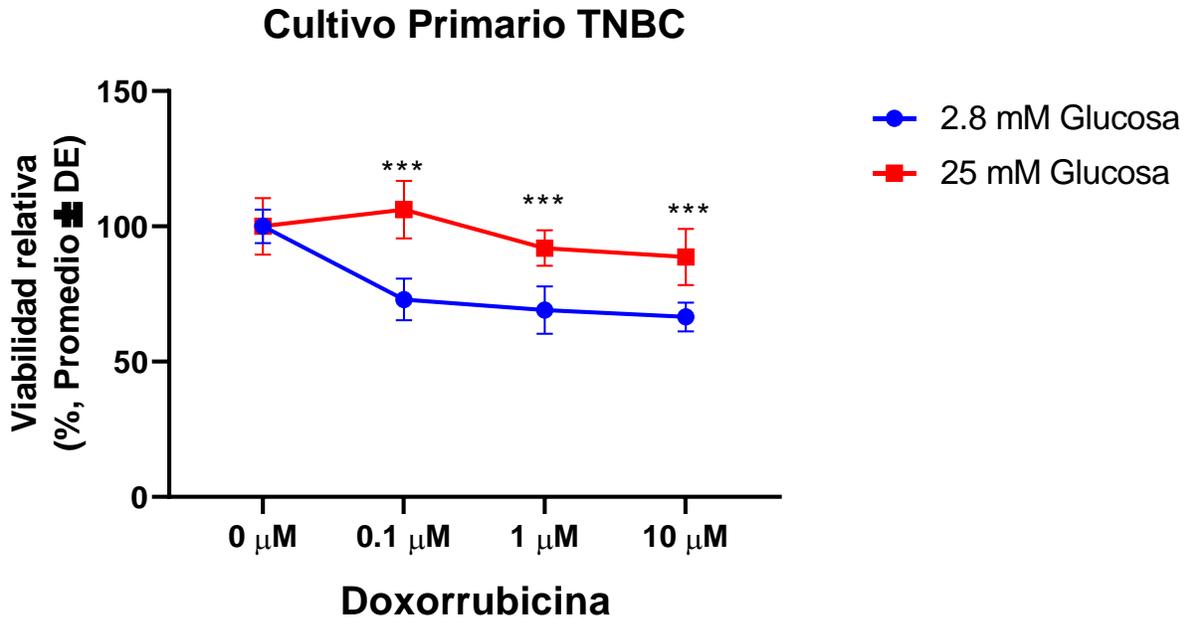


Figura 19. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en el cultivo primario aislado de paciente con diagnóstico de TNBC. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de doxorubicina) y se presenta como promedio ± desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados observados:

La gráfica en la Figura 19 muestra la respuesta de las células primarias de TNBC a diferentes concentraciones de doxorubicina bajo dos niveles de glucosa (2.8 mM y 25 mM):

- **Cultivo Primario TNBC (2.8 mM Glucosa):**
 - La viabilidad celular disminuye significativamente con el aumento de la concentración de doxorubicina.
 - Las células muestran una alta sensibilidad a la doxorubicina, con una reducción notable de la viabilidad a todas las concentraciones probadas.

- **Cultivo Primario TNBC (25 mM Glucosa):**
 - La viabilidad celular se mantiene significativamente más alta comparada con las condiciones de baja glucosa.
 - A pesar de la disminución de viabilidad con el aumento de la concentración de doxorubicina, las células bajo alta glucosa muestran mayor resistencia comparado con 2.8 mM de glucosa.

Los resultados indican que las células primarias de TNBC tienen una mayor sensibilidad a la doxorubicina en condiciones de baja glucosa (2.8 mM) en comparación con alta glucosa (25 mM). La viabilidad celular disminuye significativamente en presencia de doxorubicina a bajas concentraciones de glucosa, mientras que la alta glucosa proporciona cierta protección contra la toxicidad del fármaco.

Interpretación

Estos hallazgos sugieren que la concentración de glucosa en el microambiente tumoral puede influir significativamente en la eficacia de la doxorubicina en células primarias de TNBC. La mayor sensibilidad observada en condiciones de baja glucosa podría deberse a la dependencia de las células de TNBC a la glucólisis para su viabilidad. Este efecto resalta la importancia de considerar el metabolismo energético en el diseño de tratamientos personalizados para el TNBC.

La interacción entre la concentración de glucosa y la efectividad de la doxorubicina proporciona una perspectiva valiosa para el desarrollo de estrategias terapéuticas que modulan el metabolismo glucolítico para mejorar la respuesta a la quimioterapia.

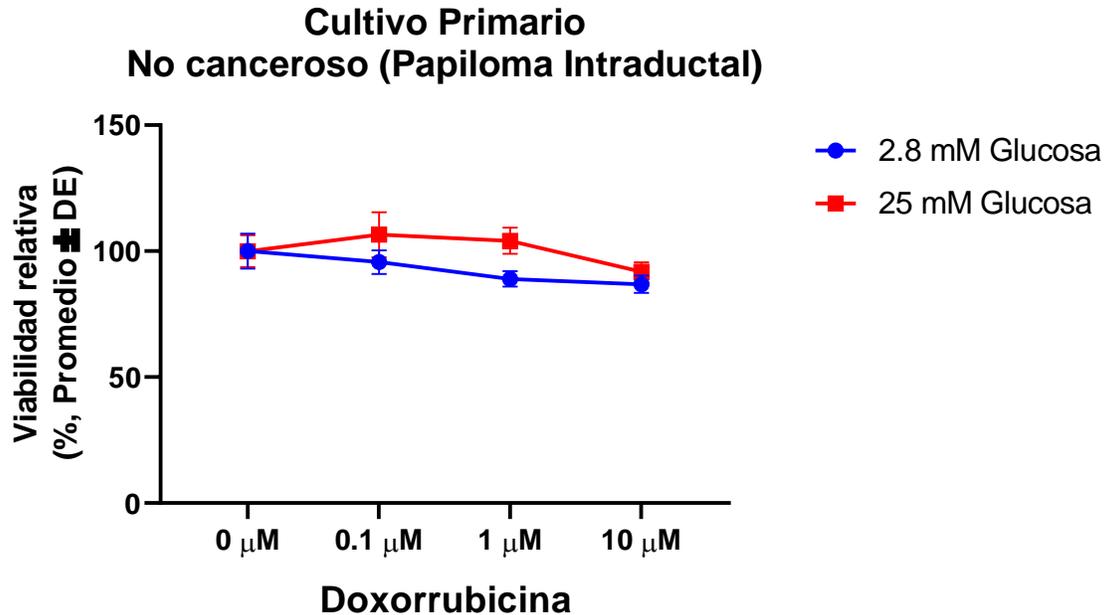


Figura 20. Efecto de la concentración de la glucosa en la sensibilidad a doxorubicina en el cultivo primario no tumoral de tejido mamario de paciente. La viabilidad relativa se expresa como porcentaje del control (0 μM de doxorubicina) y se presenta como promedio ± desviación estándar (DE). ANOVA dos vías, post-hoc: Tukey ($p \leq 0.05$)

Resultados

La gráfica en la Figura 20 muestra la respuesta de las células primarias no cancerosas a diferentes concentraciones de doxorubicina bajo dos niveles de glucosa (2.8 mM y 25 mM):

- **Cultivo Primario No Canceroso (2.8 mM Glucosa):**
 - La viabilidad celular se mantiene estable con el aumento de la concentración de doxorubicina.
 - No se observa una disminución significativa de la viabilidad a todas las concentraciones probadas.

- **Cultivo Primario No Canceroso (25 mM Glucosa):**

- La viabilidad celular también se mantiene estable con el aumento de la concentración de doxorrubicina.
- No se observan diferencias significativas en comparación con la condición de baja glucosa.

Los resultados indican que las células primarias no cancerosas de papiloma intraductal tienen una viabilidad relativamente constante en respuesta a la doxorrubicina, independientemente de la concentración de glucosa. Esto sugiere que estas células no son sensibles a la doxorrubicina bajo las condiciones de glucosa probadas.

Interpretación

Estos hallazgos sugieren que la concentración de glucosa en el microambiente no tiene un impacto significativo en la viabilidad de las células primarias no cancerosas en presencia de doxorrubicina. La falta de sensibilidad observada en estas células podría deberse a su naturaleza no cancerosa, lo que podría implicar una menor susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos comparado con las células cancerosas. Este resultado refuerza la importancia de entender las diferencias metabólicas y de sensibilidad a fármacos entre células cancerosas y no cancerosas para el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas.

Expresión del marcador de superficie CD44

Línea Celular	CD44+
MDA-MB-231	97%
Vero	0.40%
CP - no cancerosa	8.50%
CP - TNBC	34%

Figura 21. Porcentaje de células CD44+ presentes en los cultivos celulares. La tabla presentada muestra los resultados de la citometría de flujo para la expresión del marcador de superficie CD44 en diferentes líneas celulares y células primarias. A continuación, se detalla un análisis exhaustivo de estos resultados.

Expresión de CD44 en Líneas Celulares y Células Primarias

1. Línea Celular MDA-MB-231:

- **Expresión de CD44: 97%**
- **Interpretación:**
 - La línea celular MDA-MB-231, un modelo de TNBC, presenta una alta expresión de CD44. Este marcador es conocido por estar asociado con células madre cancerosas y la capacidad de formar tumores. (Sheridan, 2006). La alta expresión de CD44 en MDA-MB-231 sugiere que esta línea celular tiene un

alto potencial de agresividad y capacidad de invasión, lo cual es consistente con la naturaleza agresiva de TNBC.

2. Línea Celular VERO:

- **Expresión de CD44: 0.4%**
- **Interpretación:**
 - La línea celular VERO, una línea no cancerosa derivada de riñón de mono, muestra una expresión casi nula de CD44. Esto es esperable, ya que las células no cancerosas típicamente no expresan altos niveles de marcadores asociados con células madre cancerosas y la agresividad tumoral. La baja expresión de CD44 en Vero refuerza su uso como control no canceroso en estudios comparativos.

3. Células Primarias No Cancerosas (CP-no cáncer):

- **Expresión de CD44: 8.5%**
- **Interpretación:**
 - Las células primarias obtenidas de un papiloma intraductal, una condición no cancerosa, presentan una expresión baja de CD44. Esto es coherente con la naturaleza benigna del papiloma intraductal, ya que la expresión de CD44 no está típicamente elevada en condiciones no malignas. La presencia

moderada de CD44 podría indicar una población celular con cierto grado de plasticidad, pero sin la capacidad agresiva de las células cancerosas.

4. Células Primarias TNBC (CP-TNBC):

- **Expresión de CD44: 34%**
- **Interpretación:**
 - Las células primarias derivadas de un tumor de TNBC muestran una expresión intermedia de CD44. Aunque no es tan alta como en la línea MDA-MB-231, el 34% indica una población significativa de células con características de células madre cancerosas. Esta expresión intermedia de CD44 puede estar relacionada con la heterogeneidad del tumor primario, donde no todas las células tienen el mismo potencial de agresividad e invasión.

Análisis Comparativo y Relevancia Biológica

- **Comparación entre MDA-MB-231 y CP-TNBC:**
 - La línea celular MDA-MB-231 presenta una mayor expresión de CD44 en comparación con las células primarias TNBC. Esto podría deberse a que las líneas celulares establecidas suelen estar seleccionadas para características de crecimiento rápido y supervivencia en cultivo, mientras que las células primarias son más heterogéneas y representan mejor la diversidad del tumor original.
- **Relevancia de CD44 en la Investigación del Cáncer:**
 - La alta expresión de CD44 en células cancerosas está asociada con propiedades de células madre cancerosas, incluidas la capacidad de autorrenovación, resistencia a la quimioterapia y potencial metastásico. En el contexto del cáncer de mama, CD44 se ha implicado en la regulación de varias vías de señalización que promueven la invasión y la metástasis. Por lo tanto, la evaluación de CD44 puede proporcionar información valiosa sobre la agresividad del tumor y la respuesta potencial al tratamiento.

Implicaciones para el Tratamiento y la Investigación Futura

- **Desarrollo de Terapias Dirigidas:**

- Dado que CD44 es un marcador de células madre cancerosas, su alta expresión en MDA-MB-231 y CP-TNBC sugiere que estas células pueden ser dianas efectivas para terapias dirigidas que apunten a CD44 o sus vías de señalización asociadas. El desarrollo de anticuerpos monoclonales o inhibidores específicos de CD44 podría ser una estrategia prometedora para tratar TNBC.

- **Estrategias de Diferenciación:**

- Reducir la expresión de CD44 o inducir la diferenciación de las células madre cancerosas podría disminuir la agresividad del tumor y aumentar la sensibilidad a los tratamientos convencionales. Investigaciones futuras podrían enfocarse en identificar compuestos que modulen la expresión de CD44 y evalúen su eficacia en combinación con quimioterapias estándar.

En conclusión, la evaluación de la expresión de CD44 mediante citometría de flujo ha proporcionado información crucial sobre las propiedades de diferentes líneas celulares y células primarias utilizadas en este estudio. La alta expresión de CD44 en células cancerosas refuerza su papel como marcador de agresividad y potencial terapéutico.

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación destacan varios aspectos críticos del metabolismo celular y la respuesta a tratamientos en líneas celulares de cáncer de mama y células primarias. En particular, las células MDA-MB-231 demostraron una alta dependencia de la glucólisis para su viabilidad, lo que se evidencia por su sensibilidad a la inhibición de la glucólisis y a la disponibilidad de glucosa. Este hallazgo sugiere que las terapias dirigidas a la glucólisis podrían ser efectivas en el tratamiento de TNBC (Pavlova & Thompson, 2016).

La β -oxidación también juega un papel importante en la viabilidad de las células cancerosas, con una inhibición significativa observada en las líneas MDA-MB-231 y MCF7. Este resultado sugiere que la β -oxidación es una ruta metabólica crítica para estas células, y su inhibición podría ser una estrategia terapéutica viable (DeBerardinis & Chandel, 2016).

En términos de sensibilidad a la doxorrubicina, las células MDA-MB-231 mostraron una mayor respuesta a bajas concentraciones de glucosa, lo que indica que la modulación de los niveles de glucosa podría influir en la eficacia del tratamiento con doxorrubicina. Este efecto se observó también en células primarias de TNBC, reforzando la relevancia de dicho enfoque (Pavlova & Thompson, 2016).

Finalmente, la combinación de beta-hidroxibutirato con doxorrubicina en condiciones de alta glucosa mostró una disminución en la viabilidad celular, sugiriendo una posible sinergia entre estos tratamientos que podría explorarse más a fondo (Shimazu et al., 2013).

Efecto de la Glucólisis en el Crecimiento de las Líneas Celulares de Cáncer Mamario

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la glucólisis mediante 2-DG reduce significativamente la viabilidad celular en todas las líneas estudiadas, siendo la MDA-MB-231 la más sensible a esta inhibición. Este hallazgo es consistente con la literatura que describe a las células de TNBC como altamente dependientes de la glucólisis para satisfacer sus demandas energéticas y biosintéticas (Pavlova & Thompson, 2016). La notable reducción en la viabilidad de las células MDA-MB-231 a concentraciones de 5 mM de 2-DG sugiere una mayor vulnerabilidad de estas células a la perturbación del metabolismo glucolítico, lo que podría ser explotado terapéuticamente.

Por otro lado, las células Vero demostraron una notable flexibilidad metabólica, manteniendo su viabilidad incluso en ausencia de glucosa. Esto contrasta con las células cancerosas, subrayando la capacidad de las células no malignas para utilizar rutas metabólicas alternativas, como la oxidación de ácidos grasos y la fosforilación oxidativa, para la producción de ATP (DeBerardinis & Chandel, 2016).

La adición de glucosa a las líneas celulares resultó en un aumento significativo en la viabilidad celular de las MDA-MB-231, seguido de las MCF7, mientras que las células Vero mostraron poca variación. Esto refuerza la hipótesis de que las células TNBC dependen en gran medida de la glucólisis para su supervivencia y proliferación, un fenómeno conocido como el efecto Warburg (Warburg, 1956). La capacidad de las células Vero para mantener su viabilidad en diversas condiciones

de glucosa resalta su adaptabilidad metabólica, una característica que podría protegerlas contra ciertos tipos de estrés metabólico y energético (Varghese et al., 2019).

Impacto del Piruvato en la Viabilidad Celular

El piruvato, un metabolito clave en la glucólisis, mostró efectos variados en las líneas celulares dependiendo de la presencia de glucosa. En presencia de glucosa (25 mM), la viabilidad de las células MDA-MB-231 y Vero se mantuvo, mientras que las MCF7 mostraron un aumento, sugiriendo una mayor actividad mitocondrial en estas últimas. Este aumento podría estar relacionado con una mayor capacidad de las células MCF7 para canalizar el piruvato hacia la fosforilación oxidativa, aumentando así la producción de ATP (Louie et al., 2020).

En ausencia de glucosa, la suplementación con dosis bajas de piruvato permitió a las células cancerosas mantener su viabilidad, pero mostró una disminución significativa a concentraciones más altas (10 mM). Esto podría deberse a un desbalance energético causado por la desviación del flujo metabólico hacia la respiración mitocondrial, generando estrés oxidativo y alteraciones en la señalización celular (Shimazu et al., 2013). Las células Vero, por otro lado, comenzaron a utilizar el piruvato a partir de concentraciones de 10 mM, indicando una mayor flexibilidad metabólica en comparación con las células cancerosas.

Efecto de la β -Oxidación en el Crecimiento Celular

La inhibición de la β -oxidación mostró una reducción significativa en la viabilidad de las líneas cancerosas, particularmente en las MDA-MB-231. Esto sugiere que la β -oxidación es una ruta metabólica crucial para la supervivencia de estas células, probablemente debido a su necesidad de NADPH y otros metabolitos derivados de los ácidos grasos para la proliferación y la protección contra el estrés oxidativo (Eaton et al., 1996).

El ácido palmítico, un ácido graso saturado, mantuvo la viabilidad de las células MCF7 pero indujo apoptosis en las MDA-MB-231. Este resultado es consistente con estudios previos que muestran que ciertos ácidos grasos pueden tener efectos citotóxicos específicos en subtipos de cáncer de mama (Yang et al., 2018). La viabilidad estable de las células Vero en presencia de ácido palmítico sugiere una menor susceptibilidad a la apoptosis inducida por ácidos grasos, lo que puede estar relacionado con diferencias en la regulación de las vías apoptóticas entre células cancerosas y no cancerosas.

Sensibilidad a la Doxorrubicina en Diferentes Condiciones Metabólicas

La sensibilidad de las líneas celulares a la doxorrubicina varió significativamente con las concentraciones de glucosa. En condiciones de baja glucosa (2.8 mM), las células MDA-MB-231 mostraron una mayor sensibilidad a la doxorrubicina, indicando que la restricción de glucosa podría potenciar la eficacia de la quimioterapia en células TNBC. Este hallazgo es consistente con la literatura que

sugiere que la disponibilidad de glucosa puede influir en la resistencia a la quimioterapia (Birsoy et al., 2014).

La adición de beta-hidroxibutirato (BHB) en presencia de glucosa alta (25 Mm) también mostró una disminución en la viabilidad celular en las MDA-MB-231 tratadas con doxorubicina. Esto sugiere una posible sinergia entre el BHB y la doxorubicina, donde el BHB puede inducir un estrés metabólico adicional que potencia el efecto citotóxico de la doxorubicina (Shimazu et al., 2013).

Sensibilidad de Células Primarias de TNBC

Las células primarias de TNBC mostraron una mayor sensibilidad a la doxorubicina en condiciones de baja glucosa (2.8 mM), similar a lo observado en las líneas celulares MDA-MB-231. Este resultado subraya la relevancia de los hallazgos *in vitro* en contextos clínicos, sugiriendo que la manipulación de los niveles de glucosa podría ser una estrategia viable para mejorar la eficacia de la quimioterapia en pacientes con TNBC (Pavlova & Thompson, 2016).

Implicaciones Terapéuticas y Futuras Direcciones

Reprogramación Metabólica como Estrategia Terapéutica

Los hallazgos de este estudio apoyan la noción de que la reprogramación metabólica puede ser una estrategia efectiva para el tratamiento del cáncer de mama, particularmente en subtipos agresivos como el TNBC. La inhibición de la glucólisis y la β -oxidación, así como la manipulación de los niveles de glucosa y

lípidos, muestran un potencial significativo para reducir la viabilidad celular y mejorar la sensibilidad a los tratamientos quimioterapéuticos (Pavlova & Thompson, 2016).

Potencial de la Dieta Cetogénica

La dieta cetogénica, que induce un estado de cetosis mediante la restricción de carbohidratos y el aumento de grasas, podría ser una intervención dietética prometedora para los pacientes con TNBC. Los cuerpos cetónicos, como el beta-hidroxibutirato, no solo sirven como fuentes alternativas de energía, sino que también pueden inducir estrés metabólico en las células cancerosas, potenciando los efectos de la quimioterapia (Seyfried et al., 2017; Talib et al., 2021).

Biomarcadores Metabólicos

Identificar biomarcadores metabólicos específicos que predigan la respuesta a la quimioterapia y la susceptibilidad a la reprogramación metabólica podría mejorar significativamente el tratamiento personalizado del cáncer de mama. Marcadores como la expresión de GLUT1, HK2 y LDHA podrían ser útiles para identificar pacientes que se beneficiarían de intervenciones dirigidas a la glucólisis (Chelakkot et al., 2023).

Limitaciones del Estudio

Modelos *In Vitro*

Aunque los modelos *in vitro* proporcionan una valiosa información inicial, es esencial validar estos hallazgos en modelos *in vivo* y estudios clínicos para confirmar su

relevancia terapéutica. Las condiciones de cultivo celular no siempre replican fielmente el microambiente tumoral complejo y heterogéneo presente en los pacientes (Hatzis et al., 2011).

Diversidad Genética y Fenotípica

Las líneas celulares utilizadas en este estudio representan solo una fracción de la diversidad genética y fenotípica de los tumores de cáncer de mama. Futuras investigaciones deberían incluir un mayor número de líneas celulares y células primarias derivadas de pacientes para capturar mejor la heterogeneidad del cáncer de mama (Fulman-Levy et al., 2024).

Recomendaciones

Este estudio proporciona evidencia de que la manipulación del metabolismo celular puede influir significativamente en la viabilidad de las células de cáncer de mama y su respuesta a la quimioterapia. Las estrategias que combinan la inhibición de la glucólisis y la β -oxidación con la modulación de la dieta cetogénica muestran un potencial prometedor para el desarrollo de terapias más efectivas y personalizadas.

Se recomienda la realización de estudios adicionales que exploren la interacción entre el metabolismo celular y la respuesta a la quimioterapia en modelos animales y ensayos clínicos. Además, la identificación de biomarcadores metabólicos específicos podría facilitar la selección de pacientes que se beneficiarían de estas estrategias terapéuticas.

8. CONCLUSIONES

1. Las células MDA-MB-231 demuestran una mayor dependencia de la glucosa para su crecimiento, evidenciando su alta actividad glucolítica.
2. En condiciones de ausencia de glucosa, las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 utilizan el piruvato como fuente alternativa de energía.
3. Tanto las líneas MCF7 como MDA-MB-231 recurren a la β -oxidación para sostener su crecimiento, indicando la importancia de esta ruta metabólica en su viabilidad.
4. En ausencia de glucosa, el acetato no impacta significativamente la viabilidad celular de las líneas estudiadas. Sin embargo, el ácido palmítico reduce la viabilidad de las células MDA-MB-231, posiblemente induciendo apoptosis.
5. La disminución de glucosa incrementa la sensibilidad a la doxorrubicina en la línea MDA-MB-231, sugiriendo que la restricción de glucosa puede potenciar la eficacia de este agente quimioterapéutico.
6. Las células primarias de TNBC presentan una mayor sensibilidad a la doxorrubicina en condiciones de baja glucosa, en comparación con las células primarias no cancerosas, lo que podría indicar un enfoque terapéutico viable para este tipo agresivo de cáncer.

9. PERSPECTIVAS

1. **Evaluar en Otras Líneas de TNBC:** Ampliar la investigación a otras líneas celulares de TNBC para confirmar la aplicabilidad general de los resultados obtenidos y explorar posibles variaciones entre diferentes líneas.
2. **Replicar Ensayos en Muestras Mayores de Aislados Primarios:** Realizar ensayos con una mayor cantidad de aislados primarios de pacientes para obtener datos más robustos y estadísticamente significativos, mejorando la representatividad de los hallazgos.
3. **Determinar los Mecanismos del Uso de Piruvato en Ausencia de Glucosa:** Investigar en profundidad los mecanismos moleculares y bioquímicos que permiten a las células cancerosas utilizar el piruvato como fuente de energía en ausencia de glucosa, proporcionando una comprensión más completa de su flexibilidad metabólica.
4. **Evaluar la Sensibilidad a Otros Quimioterapéuticos en Baja Concentración de Glucosa:** Examinar cómo otros agentes quimioterapéuticos, además de la doxorubicina, afectan a las células cancerosas en condiciones de baja concentración de glucosa, lo que podría revelar nuevas oportunidades para terapias combinadas.
5. **Determinar Tiempos Máximos de Viabilidad Celular sin Glucosa:** Estudiar los tiempos máximos durante los cuales diferentes sustratos pueden mantener la viabilidad celular en ausencia de glucosa, identificando potenciales limitaciones y oportunidades para intervenciones metabólicas.

6. **Caracterizar Poblaciones Celulares en Cultivos Primarios:** Realizar una caracterización detallada de las poblaciones celulares presentes en los cultivos primarios, utilizando técnicas avanzadas como la citometría de flujo y la secuenciación de ARN de célula única, para entender mejor la heterogeneidad del tumor.
7. **Analizar la Expresión Génica y Metabolismo en Células TNBC:** Correlacionar la expresión génica de las células TNBC en cultivos primarios con su metabolismo celular y sensibilidad a agentes quimioterapéuticos, identificando posibles biomarcadores y dianas terapéuticas.
8. **Evaluación de Dieta Cetogénica *In Vitro* e *In Vivo*:** Refinar las condiciones experimentales para evaluar los efectos de una dieta cetogénica tanto *in vitro* como *in vivo*, explorando su potencial terapéutico y mecanismos de acción en el contexto del cáncer de mama.
9. **Medicina Traslacional y Personalizada:** Aplicar los hallazgos de esta investigación en un contexto de medicina traslacional, con el objetivo de desarrollar estrategias de tratamiento personalizadas que se adapten a las necesidades específicas de cada paciente, mejorando así los resultados clínicos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abramson, V., Lehmann, B., Ballinger, T., & Pietenpol, J. (2014). Subtyping Of Triple-negative Breast Cancer: Implications For Therapy. *Cancer*, 121(1), 8-16. <https://doi.org/10.1002/cncr.28914>
- Allen, B. G., Bhatia, S. K., Anderson, C. M., Eichenberger-Gilmore, J. M., Sibenaller, Z. A., Mapuskar, K. A., Schoenfeld, J. D., Buatti, J. M., Spitz, D. R., & Fath, M. A. (2014). Ketogenic diets as an adjuvant cancer therapy: History and potential mechanism. *Redox biology*, 2, 963–970. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.08.002>
- Bartmann, C., Raman, S. R. J., Flöter, J., Schulze, A., Bahlke, K., Willingstorfer, J., Strunz, M., Wöckel, A., Klement, R. J., Kapp, M., Djuzenova, C. S., Otto, C., & Kämmerer, U. (2018). Beta-hydroxybutyrate (3-OHB) can influence the energetic phenotype of breast cancer cells, but does not impact their proliferation and the response to chemotherapy or radiation. *Cancer & Metabolism*, 6(8). <https://doi.org/10.1186/s40170-018-0180-9>
- Birsoy, K., Possemato, R., Lorbeer, F. K., Bayraktar, E. C., Thiru, P., Yucel, B., Wang, T., Chen, W. W., Clish, C. B., & Sabatini, D. M. (2014). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature*, 508(7494), 108-112. <https://doi.org/10.1038/nature13110>
- Camarda, R., Zhou, A., Kohnz, R., Balakrishnan, S., Mahieu, C., Anderton, B., ... & Goga, A. (2016). Inhibition Of Fatty Acid Oxidation As a Therapy For Myc-overexpressing Triple-negative Breast Cancer. *Nature Medicine*, 22(4), 427-432. <https://doi.org/10.1038/nm.4055>

- Chelakkot, C., Chelakkot, V. S., Shin, Y., & Song, K. (2023). Modulating glycolysis to improve cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2606. <https://doi.org/10.3390/ijms24032606>
- Choi, H., & Kim, K. (2023). Theranostics For Triple-negative Breast Cancer. *Diagnostics*, 13(2), 272. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020272>
- Chueh, H., & Yoo, J. (2017). Metabolic Syndrome Induced By Anticancer Treatment In Childhood Cancer Survivors. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 22(2), 82. <https://doi.org/10.6065/apem.2017.22.2.82>.
- Cortez, N. E., & Mackenzie, G. G. (2021). Ketogenic diets in pancreatic cancer and associated cachexia: Cellular mechanisms and clinical perspectives. *Nutrients*, 13(9), 3202. <https://doi.org/10.3390/nu13093202>
- Debarardinis, R. J. & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science advances*, 2(5), e1600200. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Du, Y., Wei, N., Ma, R., Jiang, S., & Song, D. (2020). A miR-210-3p regulon that controls the Warburg effect by modulating HIF-1 α and p53 activity in triple-negative breast cancer. *Cell death & disease*, 11(9), 731. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02952-6>
- Eaton, S., Bartlett, K., & Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *The Biochemical journal*, 320 (Pt 2)(Pt 2), 345–357. <https://doi.org/10.1042/bj3200345>
- Feger, M., Alber, J., Strotmann, J., Grund, A., Leifheit-Nestler, M., Haffner, D., & Föller, M. (2023). Short-term fasting of mice elevates circulating fibroblast

growth factor 23 (FGF23). *Acta physiologica (Oxford, England)*, 239(4), e14049. <https://doi.org/10.1111/apha.14049>

- Fulman-Levy, H., Cohen-Harazi, R., Levi, B., et al. (2024). Metabolic alterations and cellular responses to β -Hydroxybutyrate treatment in breast cancer cells. *Cancer Metabolism*, 12(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s40170-024-00339-1>
- Ghanem, N., El-Baba, C., Araj, K., El-Khoury, R., Usta, J., & Darwiche, N. (2021). The pentose phosphate pathway in cancer: Regulation and therapeutic opportunities. *Chemotherapy*, 66(5-6), 179-191. <https://doi.org/10.1159/000519784>
- Gong, Y., Ji, P., Yang, Y. S., Xie, S., Yu, T. J., Xiao, Y., Jin, M. L., Ma, D., Guo, L. W., Pei, Y. C., Chai, W. J., Li, D. Q., Bai, F., Bertucci, F., Hu, X., Jiang, Y. Z., & Shao, Z. M. (2021). Metabolic-Pathway-Based Subtyping of Triple-Negative Breast Cancer Reveals Potential Therapeutic Targets. *Cell Metabolism*, 33(1), 51-64.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.10.012>.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hatzis, C., Pusztai, L., Valero, V., Booser, D. J., Esserman, L., Lluch, A., Vidaurre, T., Holmes, F., Souchon, E., Wang, H., Martin, M., Cotrina, J., Gomez, H., Hubbard, R., Chacón, J. I., Ferrer-Lozano, J., Dyer, R., Buxton, M., Gong, Y., Wu, Y., ... Symmans, W. F. (2011). A genomic predictor of response and survival following taxane-anthracycline chemotherapy for invasive breast cancer. *JAMA*, 305(18), 1873–1881. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.593>

- Huang, C. K., Chang, P. H., Kuo, W. H., Chen, C. L., Jeng, Y. M., Chang, K. J., Shew, J. Y., Hu, C. M., & Lee, W. H. (2017). Adipocytes promote malignant growth of breast tumours with monocarboxylate transporter 2 expression via β -hydroxybutyrate. *Nature Communications*, 8, 14706. <https://doi.org/10.1038/ncomms14706>
- Kachel, P., Trojanowicz, B., Sekulla, C., et al. (2015). Phosphorylation of pyruvate kinase M2 and lactate dehydrogenase A by fibroblast growth factor receptor 1 in benign and malignant thyroid tissue. *BMC Cancer*, 15(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1135-y>
- Khajah, M. A., Khushaish, S., & Luqmani, Y. A. (2022). Glucose deprivation reduces proliferation and motility, and enhances the anti-proliferative effects of paclitaxel and doxorubicin in breast cell lines in vitro. *PloS one*, 17(8), e0272449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272449>
- Kiesslich, S., & Kamen, A. A. (2020). Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnology advances*, 44, 107608. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107608>
- Kolb, H., Kempf, K., Röhling, M., Lenzen-Schulte, M., Schloot, N. C., & Martin, S. (2021). Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC Medicine*, 19(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02185-0>
- Lanning, N. J., Castle, J. P., Singh, S. J., et al. (2017). Metabolic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities. *Cancer Metabolism*, 5(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40170-017-0168-x>

- Louie, M. C., Ton, J., Brady, M. L., Le, D. T., Mar, J. N., Lerner, C. A., Gerencser, A. A., & Mookerjee, S. A. (2020). Total cellular ATP production changes with primary substrate in MCF7 breast cancer cells. *Frontiers in Oncology*, *10*, 1703. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01703>
- Luengo, A., Gui, D. Y., & Vander Heiden, M. G. (2017). Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell chemical biology*, *24*(9), 1161–1180. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.08.028>
- Maschek, G., Savaraj, N., Priebe, W., Braunschweiger, P., Hamilton, K., Tidmarsh, G. F., De Young, L. R., & Lampidis, T. J. (2004). 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer research*, *64*(1), 31–34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3294>
- Meidenbauer, J. J., Mukherjee, P., & Seyfried, T. N. (2015). The glucose ketone index calculator: a simple tool to monitor therapeutic efficacy for metabolic management of brain cancer. *Nutrition & metabolism*, *12*, 12. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0009-2>
- Mladkova, J., Sanda, M., Matouskova, E. *et al.* (2010) Phenotyping breast cancer cell lines EM-G3, HCC1937, MCF7 and MDA-MB-231 using 2-D electrophoresis and affinity chromatography for glutathione-binding proteins. *BMC Cancer* **10**, 449. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-449>
- Montalvo-Castro, Rebeca E., & Salinas-Jazmín, Nohemí. (2022). Relación entre la expresión de proteínas inhibidoras de complemento y la eficacia terapéutica de anticuerpos en cáncer de mama. *Gaceta médica de*

México, 158(3), 150-159. Epub 28 de septiembre de 2022.<https://doi.org/10.24875/gmm.22000004>

- Morelli, A. M., & Scholkmann, F. (2024). Should the standard model of cellular energy metabolism be reconsidered? Possible coupling between the pentose phosphate pathway, glycolysis and extra-mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimie*, 221, 99-109.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2024.01.018>
- Organización Mundial de la Salud (2022). *Cancer*.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *Breast cancer*.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Otto, A. M. (2020). Metabolic constants and plasticity of cancer cells in a limiting glucose and glutamine microenvironment—A pyruvate perspective. *Frontiers in Oncology*, 10, 596197.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.596197>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*, 23(1), 27–47.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Pelicano, H., Zhang, W., Liu, J., Hammoudi, N., Dai, J., Xu, R., ... & Huang, P. (2014). Mitochondrial Dysfunction in Some Triple-negative Breast Cancer Cell Lines: Role of Mtor Pathway and Therapeutic Potential. *Breast Cancer Research*, 16(5). <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0434-6>

- Puchalska, P., & Crawford, P. A. (2017). Multi-dimensional Roles of Ketone Bodies in Fuel Metabolism, Signaling, and Therapeutics. *Cell metabolism*, 25(2), 262–284. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.022>
- Sahuri-Arisoylu, M., Mould, R. R., Shinjyo, N., Bligh, S. W. A., Nunn, A. V. W., Guy, G. W., Thomas, E. L., & Bell, J. D. (2021). Acetate induces growth arrest in colon cancer cells through modulation of mitochondrial function. *Frontiers in Nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.588466>
- Samuel, S. M., Varghese, E., Satheesh, N. J., Triggle, C. R., & Büsselberg, D. (2023). Metabolic heterogeneity in TNBCs: A potential determinant of therapeutic efficacy of 2-deoxyglucose and metformin combinatory therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 164, 114911. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114911>
- Schell, J. C., Wisidagama, D. R., Bensard, C., Zhao, H., Wei, P., Tanner, J., Flores, A., Mohlman, J., Sorensen, L. K., Earl, C. S., Olson, K. A., Miao, R., Waller, T. C., Delker, D., Kanth, P., Jiang, L., DeBerardinis, R. J., Bronner, M. P., Li, D. Y., Cox, J. E., Christofk, H. R., Lowry, W. E., Thummel, C. S., & Rutter, J. (2017). Control of intestinal stem cell function and proliferation by mitochondrial pyruvate metabolism. *Nature Cell Biology*, 19(9), 1027–1036. <https://doi.org/10.1038/ncb3583>
- Schmidt, K., Thatcher, A., Grobe, A., et al. (2024). The combined treatment with ketogenic diet and metformin slows tumor growth in two mouse models of triple-negative breast cancer. *Translational Medicine Communications*, 9(21). <https://doi.org/10.1186/s41231-024-00178-8>

- Schroll, M. M., LaBonia, G. J., Ludwig, K. R., & Hummon, A. B. (2017). Glucose Restriction Combined with Autophagy Inhibition and Chemotherapy in HCT 116 Spheroids Decreases Cell Clonogenicity and Viability Regulated by Tumor Suppressor Genes. *Journal of proteome research*, 16(8), 3009–3018. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00293>
- Seyfried, T. N., Yu, G., Maroon, J. C., & D'Agostino, D. P. (2017). Press-pulse: A novel therapeutic strategy for the metabolic management of cancer. *Nutrition & Metabolism*, 14, 19. <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0178-2>
- Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C. A., Lim, H., Saunders, L. R., Stevens, R. D., Newgard, C. B., Farese, R. V., de Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., & Verdin, E. (2013). Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, 339(6116):211-4. [https://doi: 10.1126/science.1227166](https://doi.org/10.1126/science.1227166).
- Shirian, F. I., Karimi, M., Alipour, M., & Tavakoli-Yaraki, M. (2024). Beta hydroxybutyrate induces lung cancer cell death, mitochondrial impairment and oxidative stress in a long-term glucose-restricted condition. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 567. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09501-w>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ... & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

- Talib, W. H., Mahmood, A. I., Kamal, A., Rashid, H. M., Alashqar, A. M. D., Khater, S., Jamal, D., & Waly, M. (2021). Ketogenic diet in cancer prevention and therapy: Molecular targets and therapeutic opportunities. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(2), 558-589.
<https://doi.org/10.3390/cimb43020042>
- Tran, Q., Lee, H., Kim, C., Kong, G., Gong, N., Kwon, S. H., Park, J., Kim, S.-H., & Park, J. (2020). Revisiting the Warburg effect: Diet-based strategies for cancer prevention. *BioMed Research International*, 2020, 8105735.
<https://doi.org/10.1155/2020/8105735>
- Ubayawansa, B., Shilpage, S., & Silva, K. (2021). Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Cancer: Experience in a Tertiary Care Cancer Centre in Sri Lanka. *Anuradhapura Medical Journal*, 15(1),
<https://doi.org/10.4038/amj.v15i1.7697>
- Yako, H., Niimi, N., Kato, A., Takaku, S., Tatsumi, Y., Nishito, Y., Kato, K., & Sango, K. (2021). Role of pyruvate in maintaining cell viability and energy production under high-glucose conditions. *Scientific Reports*, 11, 18910.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98082-w>
- Yang, L., Guan, G., Lei, L., et al. (2018). Palmitic acid induces human osteoblast-like Saos-2 cell apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Stress and Chaperones*, 23(5), 1283-1294.
<https://doi.org/10.1007/s12192-018-0936-8>
- Yi, Y., Zhou, Z., Shu, S., Fang, Y., Twitty, G., Hilton, T. L., Zhu, Y., Xu, W., & Wang, Z. (2020). Metabolic reprogramming in triple-negative breast

cancer through Myc suppression of hexokinase 2. *Frontiers in Oncology*, 10, 176. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00176>

- Yin, L., Duan, J., Bian, X., & Yu, S. (2020). Triple-negative Breast Cancer Molecular Subtyping and Treatment Progress. *Breast Cancer Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Varghese, S., Samuel, S. M., Varghese, E., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). High Glucose Represses the Anti-Proliferative and Pro-Apoptotic Effect of Metformin in Triple Negative Breast Cancer Cells. *Biomolecules*, 9(1), 16.
- Warburg O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Wu, S., Su, R., & Jia, H. (2021). Cyclin B2 (Ccnb2) Stimulates the Proliferation Of Triple-negative Breast Cancer (Tnbc) Cells In Vitro And In Vivo. *Disease Markers*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2021/5511041>
- Xu, X., Xu, X., Si, M., Lou, H., Yan, Y., Liu, Y., Zhu, H., Lou, X., Ma, J., Zhu, D., Wu, H., Yang, B., Wu, H., Ding, L., & He, Q. (2018). Hyperglycemia decreases anti-cancer efficiency of adriamycin via AMPK pathway. *Endocrine-Related Cancer*, 25(11), 955-966. Retrieved Jul 3, 2024, from <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0036>

- Zheng, H., Siddharth, S., Parida, S., Wu, X., & Sharma, D. (2021). Tumor microenvironment: Key players in triple-negative breast cancer immunomodulation. *Cancers*, 13(13), 3357.
<https://doi.org/10.3390/cancers13133357>