



---

**Universidad de Valladolid**

**EL EFECTO WARBURG Y LOS CAMBIOS  
METABÓLICOS ASOCIADOS AL CÁNCER:  
REVERSIÓN POR DICLOROACETATO EN  
CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN NUTRICIÓN HUMANA Y  
DIETÉTICA**

**AUTOR: MARTA LOZANO MARTÍN**

**TUTOR: LUCÍA NÚÑEZ LLORENTE**

**CURSO 2016-2017**



## **RESUMEN**

El origen genético del cáncer está siendo motivo de controversia por diversos autores, los cuales sugieren que el cáncer es en realidad una enfermedad metabólica. Bajo esta perspectiva, la nutrición puede utilizarse como terapia adyuvante para el tratamiento de dicha enfermedad. A su vez, diferentes estudios experimentales han mostrado el potencial terapéutico del ácido dicloroacético (DCA), un compuesto que revierte el efecto Warburg, el cambio metabólico asociado al cáncer. Las células cancerosas poseen un potencial de membrana mitocondrial más hiperpolarizado que las células normales, el cual puede reducirse gracias al DCA. De esa manera con el tratamiento de DCA las células tumorales tendrán un metabolismo más parecido al de las células normales.

## **ABSTRACT**

The genetic origin of cancer is being the subject of controversy by several authors, which suggest that cancer is actually a metabolic disease. From this perspective, nutrition can be used as adjuvant therapy for the treatment of such disease. In turn, different experimental studies have shown the therapeutic potential of dichloroacetic acid. Cancer cells have a mitochondrial membrane potential more hyperpolarized than normal cells, which can be reduced by dichloroacetic acid. In fact, with DCA treatment tumoral cells will have similar metabolism to normal cells.

## **PALABRAS CLAVE**

Cáncer, enfermedad metabólica, dieta cetogénica, glucosa, ácido dicloroacético

## **KEYWORDS**

Cancer, metabolic disease, ketogenic diet, glucose, dichloroacetic acid



# ÍNDICE

---

## ÍNDICE GENERAL:

1. Introducción.....	1
1.1. La enfermedad del cáncer .....	2
1.2. El cáncer como enfermedad metabólica .....	5
1.3. Cetosis contra el cáncer.....	8
1.4. Fármacos que afectan esta vía metabólica: dicloroacetato .....	13
2. Objetivos .....	16
3. Materiales y métodos .....	17
3.1 Materiales .....	17
3.2 Métodos .....	17
3.2.1 Cultivos celulares.....	17
3.2.2 Estudio del potencial mitocondrial.....	18
4. Resultados .....	20
4.1. Caracterización de los cultivos celulares .....	20
4.2. Las mitocondrias de las células tumorales están hiperpolarizadas.....	21
4.3. El DCA despolariza las mitocondrias .....	22
5. Conclusiones.....	24
6. Referencias bibliográficas .....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1 .....	3
Figura 2 .....	4
Figura 3 .....	6
Figura 4 .....	8
Figura 5 .....	9
Figura 6 .....	10
Figura 7 .....	12
Figura 8 .....	15
Figura 9. ....	18
Figura 10. ....	20
Figura 11 .....	21
Figura 12. ....	23

## **GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS**

**SEOM:** Sociedad Española de Oncología Médica

**IARC:** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

**CRC:** Cáncer colorrectal

**AIF 1:** Factor inductor de la apoptosis tipo 1

**PDK:** Piruvato deshidrogenasa kinasa

**PDC:** Complejo piruvato deshidrogenasa

**DC:** Dieta cetogénica

**VCT:** valor calórico total

**MCT:** Triglicéridos de cadena media

**ROS:** Especies reactivas derivadas del oxígeno

**THO<sub>2</sub>:** Oxígeno hiperbárico

**2DG:** 2-deoxi-D-glucosa

**3BP:** 3-bromopiruvato

**DCA:** Acido dicloroacético

**DCA-Na:** Dicloroacetato de sodio

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco

**MEC:** Medio Externo Completo

**PBS:** Tampón fosfato salino

**TMRM:** Ester metílico de tetrametilrodamina

# **1.INTRODUCCIÓN**

## **1.1. LA ENFERMEDAD DEL CÁNCER**

El origen del término cáncer se atribuye a Hipócrates (460-370 aC), médico griego pionero en utilizar el término “karnikos” (cangrejo) para referirse a la enfermedad. Posteriormente, el médico romano Celso (28-50 aC), fue quien empezó a utilizar el término latino cáncer propiamente dicho.

Actualmente, el crecimiento anómalo y sin control de células en un tejido del organismo se denomina neoplasia. Las neoplasias, también denominadas tumores, a su vez pueden ser malignos (tumores cancerosos) o benignos (tumores benignos) según su capacidad de hacer metástasis. Según el tejido o tipo celular del que proceden los tipos de cáncer se agrupan en:

- Carcinomas: se originan a partir de células epiteliales
- Sarcomas: se originan a partir del tejido conjuntivo o conectivo
- Leucemias: se originan en células de la médula ósea
- Linfomas: se originan a partir del tejido linfático
- Mielomas: se originan en las células plasmáticas

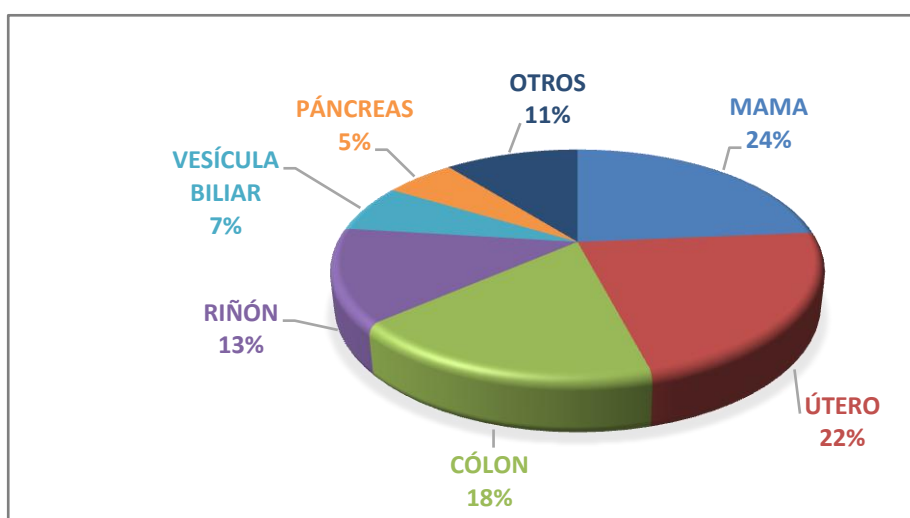
En los últimos 20 años el número de tumores diagnosticados en España ha sufrido un importante aumento, dados el incremento de la población, las técnicas de detección precoz, el aumento de la esperanza de vida y los hábitos poco saludables. Según el informe anual editado por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), los tumores que fueron diagnosticados más frecuentemente en 2015 (en ambos sexos) fueron el colorrectal y los de próstata, pulmón, mama, vejiga y estómago, siendo el número total anual de nuevos casos de 247.771.

Dada su elevada prevalencia, o número de pacientes diagnosticados de un tipo determinado de tumor que continúan vivos al año, a los 3 o a los 5 años del diagnóstico, los tumores son una de las principales causas de ingreso hospitalario. Según la SEOM, los tumores más prevalentes en España en el año 2012 en la población general fueron los de próstata, mama, colorrectal y vejiga. Según el Centro Nacional de Epidemiología, la mortalidad por cáncer en España fue de 106.039 fallecimientos en el año 2014. Los responsables del mayor número de fallecimientos en la población general fueron el cáncer de pulmón y el colorrectal. A pesar de la



elevada cifra, el riesgo de mortalidad por cáncer ha disminuido en las últimas dos décadas.

Una de las causas que aumenta el riesgo de fallecer del cáncer es la obesidad. La página web de cáncer y obesidad del Observatorio Mundial del Cáncer (GCO) proporciona estimaciones del número de casos de cáncer que se pueden atribuir a un exceso de peso corporal (figura 1). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) afirma que existen datos suficientes para asegurar que eliminar el exceso de grasa corporal es un factor protector frente al cáncer.



**Figura 1** .Casos de cáncer atribuibles a la obesidad por tipo de tumor a nivel mundial en el año 2012. Fuente: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC).

Para que una célula se convierta en cancerosa tiene que adquirir una serie de características que las distinguen de las células normales. Estas características comprenden seis capacidades biológicas incluyendo: el mantenimiento de la señal proliferativa, la resistencia a la muerte celular, la inducción de la angiogénesis, la inmortalidad replicativa, la activación de la invasión y la metástasis y, finalmente, la evasión de supresores de crecimiento. Los nuevos avances realizados en la investigación del cáncer han añadido cuatro nuevas marcas distintivas, las cuales comprenden, la promoción de la inflamación, la inestabilidad genómica y mutacional, la desregulación energética y la evasión del sistema inmune (figura 2).



**Figura 2.** *Marcas distintivas del cáncer. Fuente: Principios de cirugía (2015).*

El cáncer es considerado actualmente una enfermedad genética dada la evidencia de las mutaciones que se producen en el ADN (1). Los mecanismos que pueden conducir a alteraciones en los genes pueden ser genéticos, como resultado de herencia genética, errores producidos en la división celular o inducidos por exposición a sustancias que dañan el ADN, como son ciertas sustancias químicas, exposición a radiaciones, etc. o epigenéticos, por alteraciones en las enzimas o sustratos de las mismas (2).

Existen dos clases de genes relevantes que son afectados por estos mecanismos, los protooncogenes, cuyas mutaciones (cambios) en ellos pueden hacer que se conviertan en oncogenes, los cuales pueden favorecer el crecimiento y/o la invasividad tumoral, y los genes supresores de tumores, que limitan el crecimiento tumoral. La importancia de estos dos grupos de genes radica en su papel de control

de la carcinogénesis a través de la reparación del ADN y la apoptosis o “muerte celular programada” (3). Es cierto que en la mayoría de los cánceres humanos se han descrito numerosas anomalías genéticas, pero las mutaciones que conducen al cáncer no siguen un patrón definido (4).

## 1.2. EL CÁNCER COMO ENFERMEDAD METABÓLICA

El dogma tradicional es que el cáncer es una enfermedad genética, pero diferentes observaciones sugieren que muchas de las alteraciones genéticas encontradas en las células cancerosas pueden surgir después de un daño en la estructura y la función de las mitocondrias. Estos orgánulos subcelulares además de encargarse de la producción de energía, juegan un papel determinante en la apoptosis o muerte celular programada (5). Las células cancerosas deciden no “suicidarse”, replicándose sin control. Las mitocondrias cuando están muy activas, además, generan ROS que son potencialmente mutagénicos. En consecuencia, las anomalías asociadas al tumor y los desequilibrios cromosómicos pueden surgir como resultado de un deterioro progresivo de la función mitocondrial (6).

En las células normales del organismo en presencia de oxígeno el metabolismo está dirigido hacia la respiración mitocondrial, que acaba en la fosforilación oxidativa y la obtención de gran cantidad de ATP. Así mismo, en las células normales, en ausencia de oxígeno, el metabolismo está dirigido hacia la glucólisis, se activa la captación de glucosa y se produce ATP liberando lactato. En 1942, el investigador alemán Otto Warburg observó que las células cancerígenas metabolizan la glucosa de forma distinta a las células normales. Warburg planteó una teoría en la cual la función bioenergética de las mitocondrias de las células tumorales se encuentra alterada, presentando una “desregulación metabólica”. Warburg demostró que en la mayoría de los tumores el metabolismo está dirigido hacia la glucólisis, la captación de glucosa y la producción de lactato aun en presencia de altos niveles de oxígeno. La captación de glucosa y la glucólisis funcionan unas diez veces más deprisa en la mayoría de tumores sólidos que en los tejidos no cancerosos (figura 3). Otto Warburg postuló que este cambio en el metabolismo es la causa fundamental del cáncer recibiendo el premio Nobel en 1931 por sus hallazgos. Este cambio metabólico se conoce como “**Efecto Warburg**” y es común en muchos tumores malignos, incluyendo el cáncer colorrectal (CRC) (7).

<b>Mecanismo</b>	<b>Explicación / ejemplo</b>	<b>Referencia</b>
1. defectos mitocondriales	mutaciones de ADNmt conducen a un mal funcionamiento en la respiración y la fosforilación oxidativa	Carew y Huang (2002), Singh (2004), Taylor y Turnbull (2005)
2. La hipoxia	La adaptación a la supresión respiratoria debido a la falta de oxígeno en microambiente	Gatenby y Gillies (2004), Brahimi-Horn y Pouyssegur (2005)
3. señales oncogénicas	Ras, Src	Aviador <i>et al.</i> (1987), Ramanathan <i>et al.</i> (2005)
	Akt,	Elstrom <i>et al.</i> (2004), Gottlob <i>et al.</i> (2001)
	Bcr-abl	Boren <i>et al.</i> (2001), y Serkova Boros (2005)
4. enzimas metabólicas alteradas	hexoquinasa II	Bustamante y Pedersen (1977), Rempel <i>et al.</i> (1996)
	sobreexpresión TKTL1	Coy <i>et al.</i> (2005)
	FH y SDH mutación	Astuti <i>et al.</i> (2001), Neumann <i>et al.</i> (2004), Pawlu <i>et al.</i> (2005), Selak <i>et al.</i> (2005)

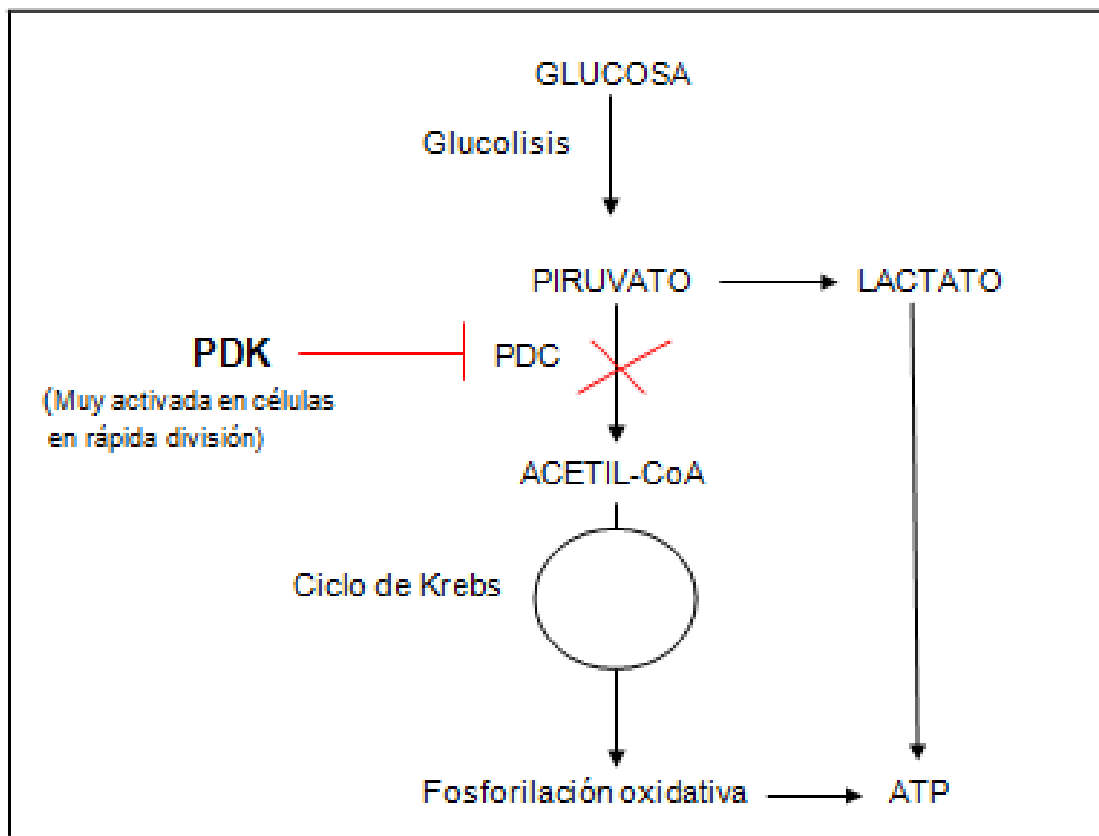
**Figura 3.** Los posibles mecanismos que conducen al aumento de la glucólisis en las células cancerosas. Fuente: *Oncogene* (2006).

Las células malignas suelen sufrir hipoxia y tienen, típicamente, unas tasas de consumo de glucosa unas 200 veces mayores que las de las células normales que les dieron origen para mantener suficiente suministro de ATP para su metabolismo y proliferación, pasando esta glucosa a piruvato y posteriormente a lactato mientras reciclan el NADH. A este lactato se le atribuye la capacidad de acelerar el crecimiento de los tumores y promover la angiogénesis y metástasis, así como de crear un ambiente ácido alrededor de las células cancerígenas haciendo de barrera e impidiendo la acción del sistema inmune en contra de las células cancerígenas. El gen responsable de eliminar el exceso de receptores de glucosa se encuentra inhibido en las células tumorales. Cuando se inhibe, esos receptores se multiplican, captando todas las moléculas de glucosa de su alrededor y usándolas para obtener energía para proliferar (8). En paralelo, las células tumorales tienen un bajo número de mitocondrias, por lo que al haber menos ATP procedente de la fosforilación oxidativa que ocurre en las mitocondrias, las células tumorales tienen una mayor demanda de glucólisis.

La fosforilación oxidativa acopla la oxidación de combustibles de carbono procedentes del ciclo de Krebs a la síntesis de ATP a través de un gradiente de protones. Es el final de una serie de transformaciones energéticas que se conocen como respiración celular. Los combustibles de carbono se oxidan primero en el ciclo del ácido cítrico para producir electrones con un alto potencial de transferencia. En la fosforilación oxidativa, se forma una fuerza protón-motriz (que es muy negativa en la parte interior de la membrana mitocondrial interna) de unos -180 mV, llevada a cabo por medio de una cadena de transporte de electrones que consiste en tres bombas de protones impulsadas por electrones. La fase final de la fosforilación oxidativa se lleva a cabo por medio de la ATP sintasa, un ensamblaje que sintetiza ATP y que está propulsado por la vuelta del flujo de protones a la matriz mitocondrial a favor de gradiente. El rendimiento neto es de 30 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada. En las células del cáncer, por diferentes razones, el transporte de electrones no se acopla a la síntesis de ATP (las mitocondrias permanecerán hiperpolarizadas), por lo que se reduce la capacidad respiratoria contribuyendo a la formación de lactato. Esta producción excesiva de lactato es necesaria para mantener la producción de energía y así compensar la escasa energía proveniente de la respiración. De hecho, en muchos tumores la ATP sintasa no funciona correctamente ya que esta inhibida por un modulador negativo, el factor inductor de la apoptosis tipo 1 (AIF1) (9).

Los mecanismos por los que se produce el efecto Warburg son campo de estudio de muchos investigadores actualmente y solo son conocidos parcialmente. El efecto Warburg podría ser simplemente la consecuencia de un daño en las mitocondrias debido al cáncer, una adaptación al ambiente bajo en oxígeno que existe dentro del tumor, o el resultado de que los genes cancerosos inhiben las mitocondrias debido al rol que desempeñan estas en la apoptosis que de otra forma terminaría por matar a las células cancerosas. Podría tratarse también de un efecto asociado a la proliferación celular. Sin embargo, en marzo de 2008, Lewis C. Cantley y sus colegas de la Harvard Medical School anunciaron haber identificado una de las enzimas responsables del efecto Warburg, la PDK tumoral, una isoforma de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK). Esta enzima inhibe la acción del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC) que actúa potenciando el paso de piruvato a acetil CoA favoreciendo así la incorporación de acetil CoA a la mitocondria y la fosforilación oxidativa (figura 4). La PDK está muy activada en todas las células que se encuentran en rápida división, y es la responsable de capacitar a las células cancerosas para

consumir glucosa a un ritmo acelerado. Esta isoenzima normalmente no se encuentra en los tejidos sanos, aunque aparentemente es necesaria cuando las células necesitan multiplicarse con mucha rapidez, por ejemplo para sanar heridas o en el caso de la hematopoyesis.



**Figura 4.** El efecto Warburg. PDK = Piruvato Deshidrogenasa Kinasa tumoral, PDC = Complejo Piruvato Deshidrogenasa. Fuente: adaptada de Novoa N, (2014).

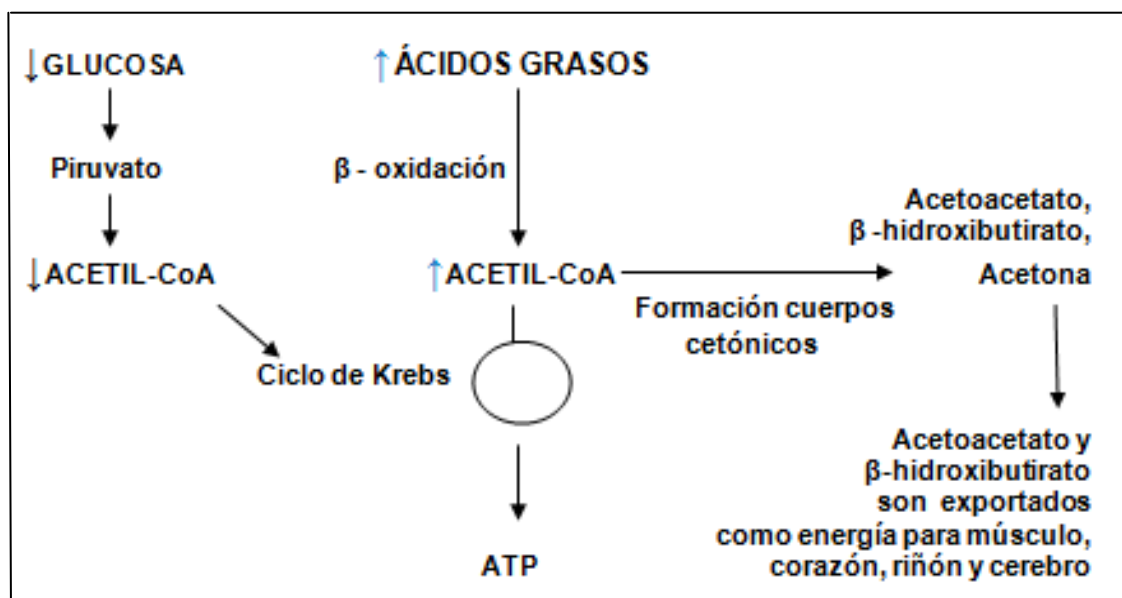
Además de la glucosa, la glutamina también puede ser la fuente de energía para algunos tipos de cáncer. La glutamina es un aminoácido anaplerótico y puede metabolizarse rápidamente a glutamato y a alfa-cetoglutarato para la entrada en el ciclo de Krebs (10) (11).

### 1.3. CETOSIS CONTRA EL CÁNCER

La cetosis nutricional es un estado metabólico en el que el hígado produce cuerpos cetónicos para alimentar a los órganos cuando no existe suficiente glucosa disponible. Esto se consigue cuando se reducen los carbohidratos de la dieta a menos

de 50 gramos al día, por lo que la fuente energética principal circula a cargo de las grasas. El organismo elimina los cuerpos cetónicos sobrantes durante las primeras semanas en cetosis, mostrando que funciona correctamente. La formación de los cuerpos cetónicos en los seres humanos y en la mayoría de los mamíferos, se produce en el hígado durante la oxidación de los ácidos grasos. Se pueden formar los cuerpos cetónicos D-β-hidroxiacetato, acetoacetato y acetona para después exportarse a otros tejidos. El acetoacetato y el D-β-hidroxiacetato son transportados por la sangre desde el hígado a los tejidos extrahepáticos, donde pueden proporcionar parte de la energía necesaria para los tejidos. El cerebro, que normalmente utiliza glucosa como combustible, se puede adaptar al uso de acetoacetato y el D-β-hidroxiacetato cuando la glucosa es deficitaria.

Una nueva estrategia para tratar la desregulación metabólica producida en las células tumorales es el empleo de la dieta cetogénica (DC). La DC es una dieta alta en grasas, moderada en proteínas y muy baja en carbohidratos que produce un aumento de los cuerpos cetónicos y una disminución de la glucosa en sangre, evocando un estado fisiológico similar al que produce el ayuno y favoreciendo un entorno hostil para las células cancerígenas (figura 5).



**Figura 5.** Dieta Cetogénica. Guía metabólica. Fuente: adaptada de Hospital Sant Joan de Déu. (2014).

Los diferentes tipos de DC se clasifican en:

- DC clásica: proporciona el 90% del valor calórico total (VCT) en forma de grasa, posee muy bajo contenido de glúcidos y una cantidad adecuada de proteínas.
- DC con triglicéridos de cadena media (MCT): posee una proporción de grasa del 71%, aproximadamente. El aporte de MCT en forma de aceite es del 60% del VCT (figura 6).
- DC de Atkins modificada: El 65% de las calorías totales proceden de la grasa. Se llama “modificada” porque la restricción de los carbohidratos es indefinida y porque el objetivo no es la pérdida de peso.

Ingesta	Plato
Desayuno	<b>Batido de yogur desnatado con sandía y tostada de pan integral</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 125 ml yogur desnatado</li> <li>• 50 g sandía</li> <li>• 20 g pan integral</li> <li>• 5 ml aceite de oliva</li> <li>• 30 ml aceite MCT</li> </ul>
Comida	<b>Revuelto de champiñones con judía verde y huevo</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 g champiñones</li> <li>• 200 g judía verde</li> <li>• 40 g huevo</li> <li>• 35 ml aceite MCT</li> <li>• 20 g pan integral</li> </ul>
Merienda	<b>Copa de yogur batido con MCT y melón</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 125 g yogur desnatado</li> <li>• 50 g melón</li> <li>• 15 g nueces</li> <li>• 30 ml aceite MCT</li> </ul>
Cena	<b>Arroz integral con brócoli y merluza</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 30 g arroz integral</li> <li>• 200 g brócoli</li> <li>• 100 g merluza plancha</li> <li>• 35 ml aceite MCT</li> </ul>

MCT: triglicéridos de cadena media.

**Figura 6.** Ejemplo de cálculo de DC-MCT de 2000 Kcal. Fuente: Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (2016).

La DC es conocida sobre todo hoy en día por su utilización para la pérdida de peso, hecho popularizado por el doctor Robert Atkins, pero también tiene utilidad en ámbitos terapéuticos. Esta dieta tuvo sus inicios en 1921 por su efecto anticonvulsivo. Su uso disminuyó con la aparición de fármacos antiepilépticos, hasta que en los últimos años ha resurgido como tratamiento de la epilepsia refractaria a los fármacos (12). Se postulan varios mecanismos de acción, entre ellos, la acción a nivel de



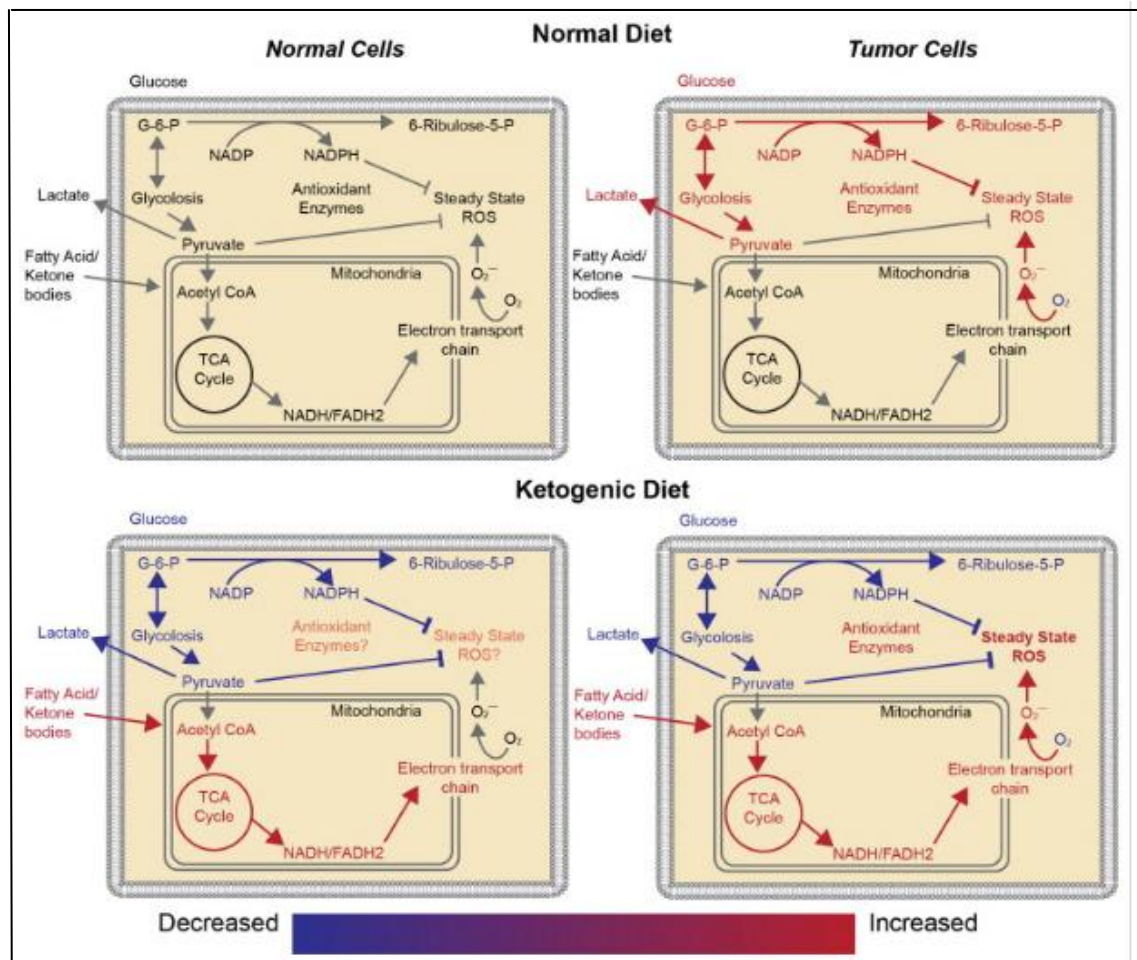
neurotransmisores que favorece la síntesis de glutamina, precursor del GABA, que es un importante agente anticonvulsivo.

La DC también podría tener un papel importante como terapia adyuvante para el tratamiento de diferentes tipos de tumores malignos. Esto es debido a que las células normales se pueden adaptar al uso de los cuerpos cetónicos como fuente de energía, pero las células malignas no, ya que su metabolismo está direccionado hacia la glucólisis y no hacia la fosforilación oxidativa. Por lo cual, en ausencia de glucosa, reducen su capacidad de proliferación celular (13).

Además de elevar la producción de GABA, los cuerpos cetónicos aumentan la producción de acetil-CoA, que también es capaz de impulsar el ciclo de Krebs aumentando así el nicotinamida adenina nucleótido reducido (NADH) mitocondrial (figura 7). Dado que el  $\beta$ -hidroxibutirato es más rico en energía que el piruvato, es capaz de producir más cantidad de ATP. La cetosis también aumenta la producción de diversos antioxidantes que compiten con tóxicos de nuestro organismo, disminuyendo el estrés oxidativo mitocondrial de las células sanas.

Las células cancerígenas poseen dificultades para suicidarse porque, aunque generan una elevada cantidad de oxidantes, lo suplen generando un exceso de antioxidantes. Con todo esto se podría decir que, un exceso de antioxidantes endógenos (como es el glutatión) protegen contra el cáncer, pero ese exceso en una célula cancerígena protege al tumor. Evitar la obtención de estos antioxidantes a través de la membrana mitocondrial podría ser una forma de alcanzar el estrés oxidativo de las células tumoral.

El mecanismo por el que la DC es capaz de aumentar este estrés, sería explicado por la capacidad para bloquear la coenzima NADPH en células tumorales, ya que esta potencia la forma reducida del glutatión, en cuyo estado ejerce funciones como antioxidante. La DC, al potenciar la forma oxidada del glutatión, incrementa el estrés oxidativo de las células cancerosas. Este aumento del estrés podría optimizar los efectos de la quimioterapia y radioterapia, probado en estudios con ratones (14) (15) (16).



**Figura 7.** Mecanismo de acción de la dieta cetogénica. Fuente: *Redox Biol.* (2014); 2: 963-970.

Recientemente, los resultados más positivos de esta dieta se han visto en casos de tumores cerebrales. La literatura actual sugiere que la DC es segura para el tratamiento de pacientes con glioma maligno, disminuyendo la vascularización y el crecimiento de este tipo de tumor (17). No obstante, la eficacia terapéutica atribuida a esta dieta se debe a la ingesta de la misma en cantidades restrictivas (15).

Por su parte, diversos estudios en animales revelan que la restricción calórica, por sí misma, retrasa la progresión de los tumores al reducir los niveles de glucosa en sangre y aumentar los cuerpos cetónicos (18). En casos de tumores cerebrales humanos, también se le atribuyen efectos antiangiogénicos y proapoptóticos (19).

De acuerdo con la hipótesis de Warburg, aunque la mayoría de los tumores muestran un aumento del metabolismo de la glucosa, la glutamina también es un combustible energético para las células de muchos tipos de cáncer. Seyfried y sus

colaboradores mostraron un estudio con ratones en el que un antagonista de la glutamina junto con la restricción calórica manifestaron un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral de los roedores (20).

Evidencias recientes indican que existe una asociación sinérgica entre la DC y la terapia con oxígeno hiperbárico (THO<sub>2</sub>) (21). Actualmente, se está desarrollando una nueva estrategia terapéutica "press-pulse" para el manejo metabólico no tóxico del cáncer diseñada para que las células tumorales mediante la DC sean privadas de sus combustibles más importantes, la glucosa y la glutamina, y mediante el THO<sub>2</sub> sean capaces de reducir la proliferación y estimular la apoptosis (22).

En cuanto a los efectos adversos que se pueden producir debido a un alto consumo de grasa se encuentran náuseas, vómitos, dolor abdominal y aumento del colesterol; además de la posible hipoglucemia ocasionada por el bajo consumo de hidratos de carbono. A pesar de ello, casi todos los efectos son temporales y acaban desapareciendo según el organismo se va adaptando a este tipo de dieta.

Vistos todos estos estudios, aunque no se conoce el verdadero mecanismo de esta dieta por el cual ejerce efectos positivos contra el cáncer, muestra buenas perspectivas. A pesar de ello, según revisiones sistemáticas actuales, se necesita una evidencia clínica más sólida antes de recomendarla como terapia adyuvante de esta enfermedad (23) (24).

#### 1.4. FÁRMACOS QUE AFECTAN ESTA VÍA METABÓLICA:

##### DICLOROACETATO

Debido al aumento de la glucólisis aeróbica que se ha visto en diversos tipos de cáncer se han desarrollado diversas sustancias capaces de inhibir la glucólisis que actualmente están siendo foco de atención por su probable uso como agentes anticancerígenos. Entre estos inhibidores, se incluyen al SB-204990, la 2-deoxi-D-glucosa (2DG), 3-bromopiruvato (3BP), la 5-tioglucona y el ácido dicloroacético (DCA) (25). Los estudios más prometedores se han desarrollado con DCA.

El DCA es una pequeña molécula inhibidora de la PDK (figura 8) capaz de penetrar en las membranas celulares y en la mayoría de los tejidos, incluso en el cerebro, y de regular el proceso de glucólisis in vitro e in vivo. El DCA inhibe la PDK que está bloqueando al complejo piruvato deshidrogenasa que potencia el paso del

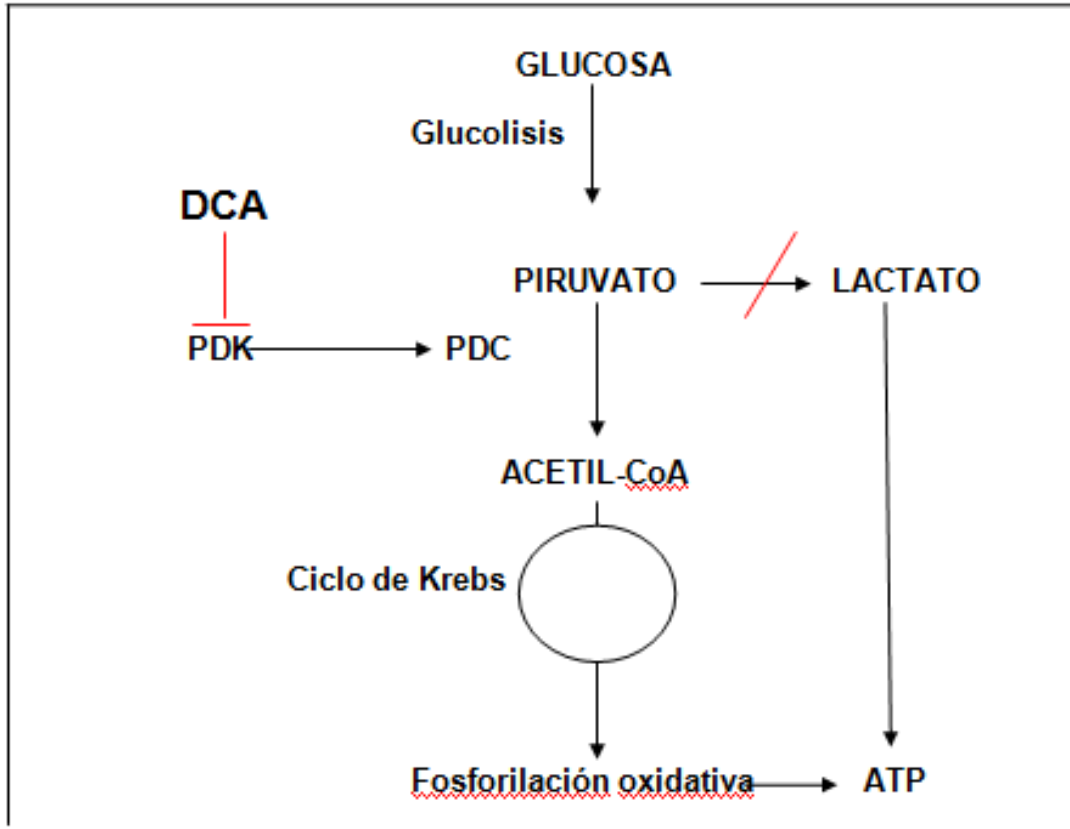
piruvato a acetil CoA. De este modelo, el DCA potenciaría la producción de acetil CoA, su entrada a la mitocondria y por tanto, potenciaría la fosforilación oxidativa. Este modulador metabólico ha sido utilizado previamente en seres humanos como tratamiento de ciertas acidosis lácticas y en enfermedades mitocondriales hereditarias, dado que mantiene activo el complejo piruvato deshidrogenasa y disminuyendo la liberación de lactato.

Investigadores de la Universidad de Alberta propusieron en 2007 que el DCA podría tener beneficios terapéuticos contra muchos tipos de cáncer (26). El ensayo de laboratorio que realizaron en ratones mostró que una sal de este ácido, el dicloroacetato de sodio (DCA-Na), induce apoptosis, reduce la proliferación e inhibe el crecimiento tumoral sin toxicidad aparente. El DCA-Na puede ser administrado por vía oral. Se caracteriza por restaurar la función mitocondrial de las células cancerosas sin afectar a las sanas, principalmente por la capacidad de regulación del potencial de membrana mitocondrial, que en las células tumorales es especialmente alto. Existen diferentes ensayos que sugieren que el DCA-Na induce apoptosis y produce una reducción de la angiogénesis en pacientes con glioblastoma, un tipo agresivo de cáncer de cerebro (27) (28).

Además de los ensayos realizados en pacientes con glioblastoma, también se han realizado ensayos en otros tipos de cáncer. Se ha presentado el caso de una paciente con cáncer colorrectal metastásico que obtuvo una estabilización de la enfermedad usando la terapia del DCA-Na, sin toxicidad grave, según criterios clínicos, bioquímicos y radiológicos (29). Este caso desvela un posible uso de este fármaco como agente citostático, capaz de mantener la estabilidad a largo plazo del cáncer avanzado. Para confirmar el caso anterior, existe un ensayo en el que un tipo de células de CRC humano mostraron una reducción de la proliferación sin causar apoptosis, cuando fueron tratadas con DCA in vitro

Como limitación, el efecto secundario más común que puede ocasionar este fármaco es la aparición de neuropatía periférica relacionada con la dosis, pudiendo restringir el uso de este tratamiento en los pacientes más sensibilizado (30). Sin embargo, se ha desarrollado un protocolo de tratamiento que limita la aparición de estos efectos secundarios sin perder eficacia.

Para comprender mejor los mecanismos de DCA decidimos investigar los efectos de este fármaco en el potencial mitocondrial en células de colon humano normales y células de cáncer de colon humano.



**Figura 8.** Mecanismo de acción del DCA. En el fenotipo glucolítico la PDK inhibe la acción del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC). El DCA inhibe la acción de la PDK restableciendo el metabolismo celular normal. Fuente: adaptada de Rev. Farmacol. Chile (2014).

## **2. OBJETIVOS**

- Comparar el potencial mitocondrial de las mitocondrias de las células de carcinoma de colon con las células normales de colon.
- Estudiar el efecto de DCA sobre el potencial mitocondrial de las células de carcinoma de colon y de las células normales de colon.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

- Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 1g/l glucosa y suplementado con: suero fetal bovino 10% (FBS), L-glutamina 1%, penicilina/estreptomicina
- Tripsina-EDTA (Tripsina 0,05 % y EDTA) 0,01 % en PBS).
- Poli-L-lisina (0,01 mg/ml)
- Tampón fosfato salino (PBS) (en Mm): NaCl 136; KCl 2,7; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5; (Ph=7,4).
- Medio Externo Completo (MEC) (en Mm): NaCl 145; KCl 5; CaCl<sub>2</sub> 1; MgCl<sub>2</sub> 1; Glucosa 10; Hepes/NaOH 10; (Ph=7,4).
- Ácido dicloroacético (DCA)
- Ester metílico de tetrametilrodamina (TMRM)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

#### 3.2 MÉTODOS

##### *3.2.1 Cultivos celulares*

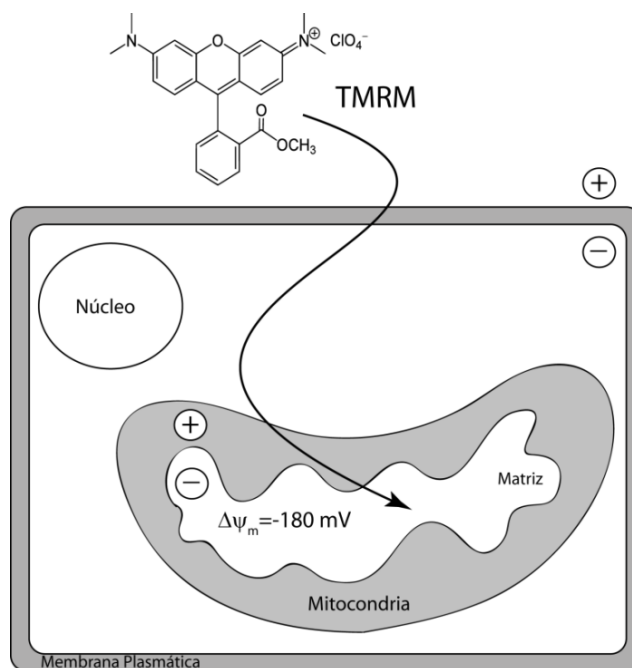
**NCM460:** Es una línea celular normal derivada de epitelio de mucosa de colon humano. Proceden de un varón hispano de 68 años y fue seleccionada para crecimiento *in vitro* sin ser infectada o transfectada con ningún ácido nucleico exógeno. Estas células expresan características que confirman su condición de célula normal o no tumorigénica (31).

**HT29:** Es una línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano. Deriva de un tumor primario de colon en estadio C de Dukes y procedente de una mujer caucásica de 44 años (32). Presenta características de célula tumoral (33).

Las células NCM460 y HT29 fueron cultivadas en medio DMEM con glucosa 1 g/l suplementado con 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM y 1% de penicilina /estreptomicina y fueron incubadas a 37°C en una atmosfera con 90 % de aire y 10 % de CO<sub>2</sub>. Para su subcultivo, las células fueron lavadas con PBS y levantadas tras una incubación con tripsina a 37°C durante 3 min. Finalmente las células fueron centrifugadas a 200 g durante 4 min y el sedimento celular se resuspendió en medio de cultivo y sembró en frascos de cultivo.

### 3.2.2 Estudio del potencial mitocondrial

Las diferencias en el potencial mitocondrial entre células normales y tumorales se estimaron en células vivas cargadas con el colorante fluorescente TMRM. El TMRM es un fluoróforo lipofílico capaz de permear a través de las membranas y de acumularse en la mitocondria debido a su carga neta positiva en función del potencial mitocondrial (figura 9). A mayor acumulación, mayor intensidad de fluorescencia. Por tanto, la imagen de fluorescencia de células tratadas con TMRM permite estimar diferencias o cambios en el potencial mitocondrial de una célula, ya que cuanto mayor es su acumulación en la mitocondria más negativo es el potencial mitocondrial (34).



**Figura 9.** Entrada del TMRM a la mitocondria. La estructura catiónica y lipofílica de este tipo de colorantes permite que atraviesen la membrana plasmática y se acumulen en las mitocondrias de acuerdo al potencial negativo que presentan estos orgánulos con respecto al citosol. La despolarización mitocondrial permite la salida de colorante y, por tanto, la disminución de la fluorescencia de las sondas acumuladas en la mitocondria.



De manera que la fluorescencia capturada será mayor cuando las células estén hiperpolarizadas y si la fluorescencia capturada es menor será porque las células se han despolarizado (el potencial mitocondrial se ha hecho más positivo). La determinación de su acumulación en este orgánulo subcelular es llevado a cabo mediante microscopía de fluorescencia.

Para realizar el experimento de medida de potencial mitocondrial, las células NCM460 y HT29 fueron sembradas en cubreobjetos de cristal de 12 mm de diámetro previamente tratados con poli-L-lisina (0,01 mg/ml) a una densidad de 15.000 células/ml y depositadas en placas de 4 pocillos e incubadas a 37°C en una atmosfera con 90 % de aire y 10 % de CO<sub>2</sub>. En los experimentos con tratamiento con DCA, se trataron las células con DCA 0.50 mM durante 48 horas en medio de cultivo. Como controles se trataron células con el solvente DMSO a la misma concentración.

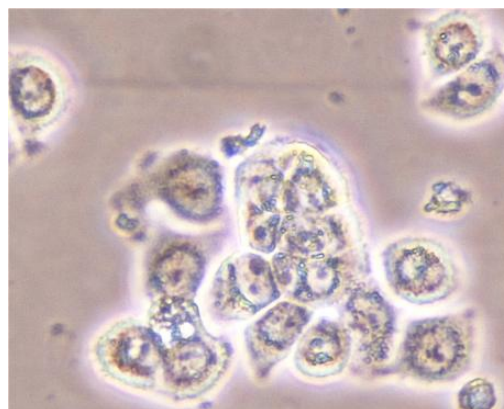
Para las medidas del potencial mitocondrial, las células (después de su tratamiento con DCA o con el solvente) se sacaron del incubador y se lavaron con medio externo a temperatura ambiente. Inmediatamente se incubaron durante 15 minutos con el colorante TMRM a una concentración de 50 nM a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el medio con TMRM y se añadió medio externo completo fresco. Seguidamente se colocó en el microscopio el cubreobjetos y se procedió a la captura de imágenes de fluorescencia. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas en un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100TV (Zeiss, Jena, Alemania) equipado con una cámara digital Hamamatsu OrcaER (Hamamatsu photonics, Hamamatsu, Japón) con el objetivo 40 x y utilizando un set de filtros para rodamina. Se tomaron de 6 a 4 imágenes por campo al azar. A continuación, fueron analizadas y cuantificadas con el software Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu photonics, Hamamatsu, Japón). El fondo fue abstraído de todas las imágenes.

## 4. RESULTADOS

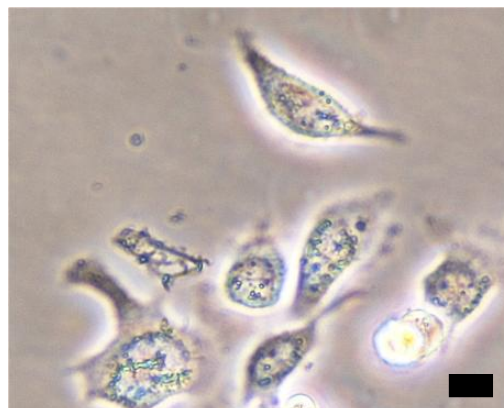
### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES

En este trabajo se han utilizado dos líneas celulares de colon humano. Como modelo de adenocarcinoma de colon usamos células HT29, mientras que como modelo de colonocitos normales utilizamos células NCM460 (figura 10). Estas células se mantienen en cultivo en continua división pero el grado de proliferación de cada una de ellas es muy diferente. Si comparamos la proliferación de las líneas celulares estudiadas, la proliferación de la línea celular de adenocarcinoma de colon es más de 3 veces superior a las células normales NCM460 (35).

**HT29**



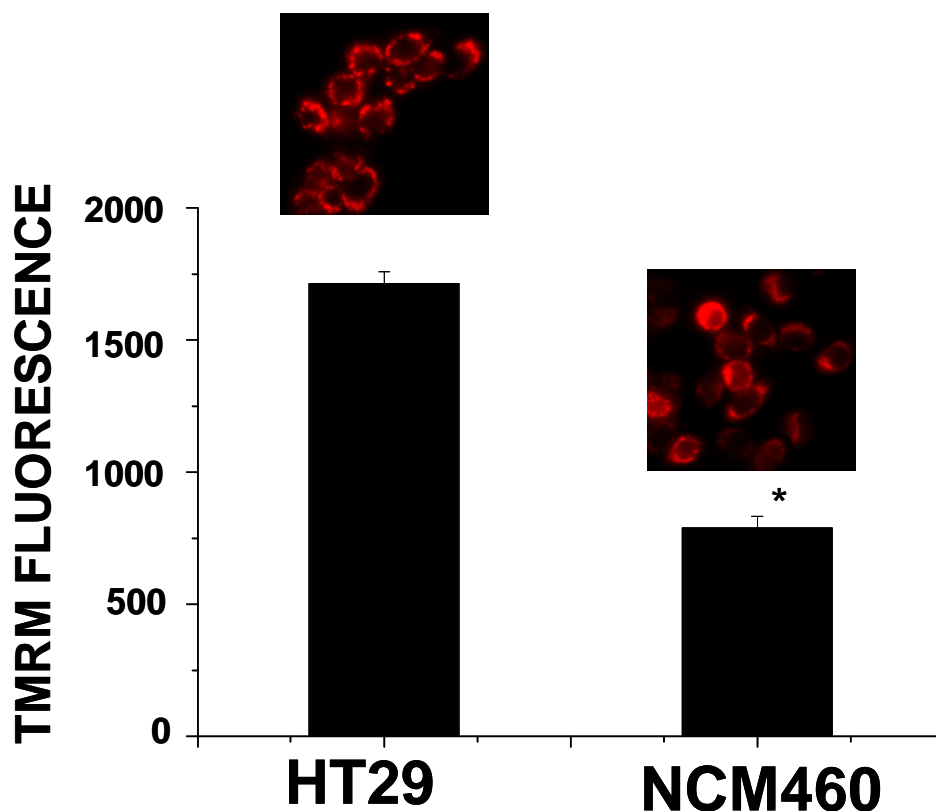
**NCM460**



**Figura 10.** Cultivo de células de Colon. Fotos representativas de células de adenocarcinoma de colon HT29 y de colonocitos normales NCM460. La barra representa 10  $\mu$ m.

## 4.2. LAS MITOCONDRIAS DE LAS CÉLULAS TUMORALES ESTÁN HIPERPOLARIZADAS

Como se ha comentado en la introducción, se ha descrito que en la mayoría de los tumores el metabolismo está dirigido hacia la glucólisis de manera que las mitocondrias de las células tumorales no consumen su gradiente eléctrico mitocondrial en la síntesis de ATP por lo cual sus mitocondrias tienen un potencial mitocondrial mucho más negativo que las células normales. Para comprobar este efecto en las líneas celulares que estamos estudiando se determinó el potencial mitocondrial. Para ello, se incuban las células HT29 y NCM460 con el colorante TMRM y se midió la fluorescencia emitida en ambas líneas celulares. En la figura 11 podemos observar que la fluorescencia fruto de la acumulación del TMRM es significativamente superior en las células tumorales lo que indica que las mitocondrias en estas células están hiperpolarizadas con respecto a las de las células normales.



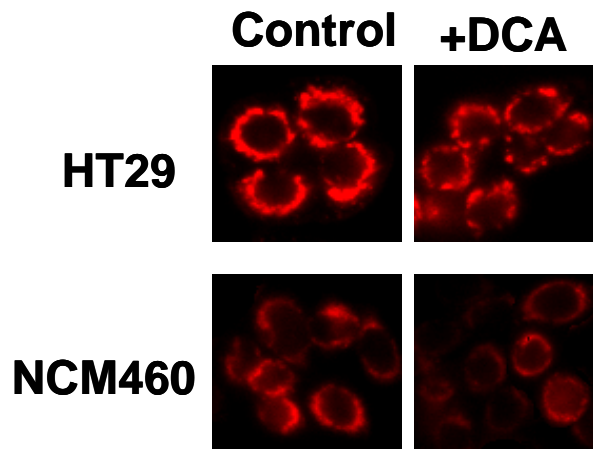
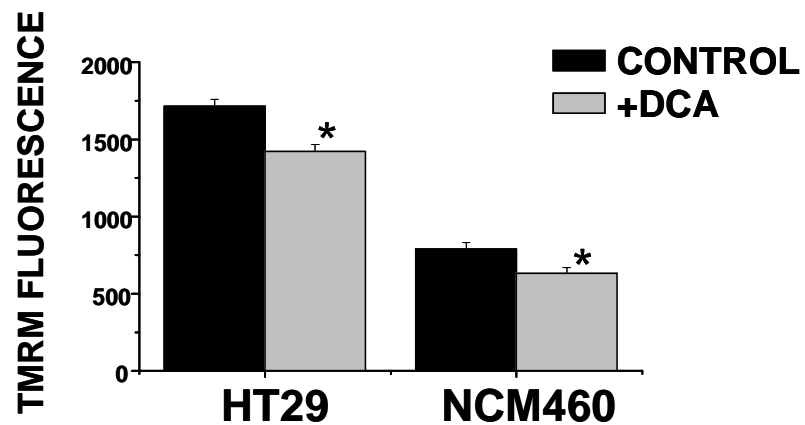
**Figura 11.** Comparación del potencial mitocondrial determinado con TMRM en células de adenocarcinoma de colon (HT29) y células normales NCM260. Las células se cargan con TMRM 50 nM durante 15 min y se capturan imágenes mediante microscopía de fluorescencia. Las imágenes muestran la fluorescencia de las células HT29 y NCM460 cargadas con TMRM. Las barras muestran la media  $\pm$  ErrorS de la fluorescencia de 130-150 células por cada tipo celular (\* $p < 0,05$ )

### 4.3. EL DCA DESPOLARIZA LAS MITOCONDRIAS

Esta hiperpolarización mitocondrial que ocurre en las células tumorales y su consiguiente “desregulación metabólica” está siendo recientemente objeto de diana terapéutica. Uno de los fármacos que se han propuesto para poder revertir esta “desregulación metabólica” es el DCA. Como se ha comentado en la introducción el DCA es un inhibidor de la mitocondrial que bloquea el paso del piruvato a acetil CoA.

De modo que el DCA potenciaría la producción de Acetil CoA y con ello su entrada en la mitocondria y la fosforilación oxidativa. Como consecuencia de ello, las mitocondrias dejarían de estar tan hiperpolarizadas ya que consumirían su potencial al formar ATP. Para comprobar esta hipótesis, se trataron las células con DCA 0,5 mM durante 48 h y luego se midió su potencial mitocondrial con el colorante TMRM.

La figura 12 muestra el efecto del DCA sobre el potencial mitocondrial en las células HT29 y NCM260.

**A****B**

**Figura 12.** Efecto del DCA sobre el potencial mitocondrial. Las células HT29 y NCM460 se trataron con DCA (0.5 mM) durante 48 h. Tras ello, las células fueron cargadas con TMRM 50 nM durante 15 min y se capturaron imágenes mediante microscopía de fluorescencia. A. Imágenes de fluorescencia de las células HT29 y NCM460 cargadas con TMRM. B. Las barras muestran la media  $\pm$  Error de la fluorescencia de 100-150 células, \* $p < 0,05$  respecto control en cada línea celular.

## **5. CONCLUSIONES**

A pesar de que el riesgo por mortalidad de cáncer ha disminuido en las dos últimas décadas, es una enfermedad con una incidencia elevada, siendo el cáncer colorrectal uno de los más frecuentemente diagnosticados hoy en día en España.

Cada vez son mayores las evidencias que sugieren que el cáncer es una enfermedad metabólica, producida por un daño en la estructura y función de las mitocondrias. Este metabolismo alterado podría ser modulado por terapias convencionales junto con terapias nutricionales como es el uso de una DC con restricción dietética. Otra estrategia terapéutica es el uso de inhibidores de la glucólisis, como es el DCA, capaces de inducir apoptosis además de inhibir el crecimiento tumoral.

Para comprender mejor los mecanismos de DCA decidimos investigar los efectos de este fármaco en el potencial mitocondrial en células de colon humano normales y células de cáncer de colon humano. Las células tumorales de carcinoma de colon utilizadas en este trabajo, presentan un mayor potencial mitocondrial que las células de colonocitos normales humanos, lo que es consistente con el efecto Warburg. Esta hiperpolarización se podría explicar por el déficit en la síntesis aerobia de ATP probablemente debida a defectos en la ATP sintasa o la inducción de su inhibidor AIF. El DCA, potencia la actividad mitocondrial y favorece la síntesis de ATP y, por tanto, el consumo del gradiente de protones, lo que despolariza la mitocondria. Este efecto es observado tanto en células normales como tumorales. Sin embargo, el efecto es relativamente mayor en las células tumorales. La activación mitocondrial podría contribuir a la inhibición del crecimiento tumoral de muchas maneras incluyendo la disminución de la liberación de lactato y el aumento de la susceptibilidad a la muerte celular.

## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. 2011;144(5):646-74
2. Martín de Civetta MT, Civetta JD. Carcinogénesis. *Salud Pública Mex.* 2011;53:405-14
3. Rebellón DE, Parra TJ, Moreno JS, Castro JS, Bernal BM. *Rev Cient Cienc Méd.* 2014;17(2):44-52
4. Salk JJ, Fox EJ, Loeb LA. Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:51-75
5. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118
6. Seyfried TN. Cancer as a metabolic disease. *Nut Metab (Lond).* 2010;27:7
7. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956; 123(3191):309-14
8. López-Serra P, Marcilla M, Villanueva A, Ramos-Fernández A, Palau A, Leal L, et al. A *DERL3*-associated defect in the degradation of SLC2A1 mediates the Warburg effect. *Nat Commun.* 2014;5:3608
9. Seyfried TN. *Cancer as a Metabolic Disease: On the Origin, Management, and Prevention of Cancer.* Nueva Jersey: Wiley; 2012
10. Alonso A, Perez M, Vidal Z, Vidal A. Papel de la reprogramación metabólica en la carcinogénesis. *Correo Científico Médico de Holguín.* 2016;20(2)
11. Huang W, Choi W, Chen Y, Zhang Q, Deng H, He W, et al. A proposed role for glutamine in cancer cell growth through acid resistance. *Cell Res.* 2013;23(5):724-7
12. Felton EA, Cervenka MC. Dietary therapy is the best option for refractory nonsurgical epilepsy. 2015;56(9):1325-9
13. Vergati M, Krasniqi E, Del Monte G, Riondino S, Vallone D, Guadagni F, et al. Ketogenic diet and other dietary intervention strategies in the treatment of cancer. *Curr Med Chem.* 2017;24
14. Ho VW, Leung K, Hsu A, Luk B, Lai J, Shen SY, et al. A low carbohydrate, high protein diet slows tumor growth and prevents cancer initiation. *Cancer Res.* 2011;71(13):4484-93
15. Woolf EC, Scheck AC. The ketogenic diet for the treatment of malignant glioma. *J Lipid Res.* 2015;56(1):5-10
16. Abdelwahab MG, Fenton KE, Preul MC, Rho JM, Lynch A, Stafford P, et al. The ketogenic diet is an effective adjuvant to radiation therapy for the treatment of malignant glioma. *PLoS One.* 2012;7(5)

17. Winter SF, Loebel F, Dietrich J. Role of ketogenic metabolic therapy in malignant glioma: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;112:41-58
18. Lee C, Longo VD. Fasting vs dietary restriction in cellular protection and cancer treatment: from model organism to patients. *Oncogene*. 2011;30(30):3305-16
19. Mukherjee P, Abate LE, Seyfried TN. Antiangiogenic and proapoptotic effects of dietary restriction on experimental mouse and human brain tumors. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5622-9
20. Shelton LM, Huysentruyt LC, Seyfried TN. Glutamine targeting inhibits systemic metastasis in the VM-M3 murine tumor model. *Int J Cancer*. 2010;127(10):2478-85
21. Stępień K, Ostrowski RP, Matyja E. Hyperbaric oxygen as an adjunctive therapy in treatment of malignancies, including brain tumours. *Med Oncol*. 2016;33:101
22. Seyfried TN, Yu G, Maroon JC, D'Agostino DP. Press-pulse: a novel therapeutic strategy for the metabolic management of cancer. *Nut Metab (Lond)*. 2017;14:19
23. Oliveira CL, Mattingly S, Schirrmacher R, Sawyer MB, Fine EJ, Prado CM. A Nutritional Perspective of Ketogenic Diet in Cancer: A Narrative Review. *J Acad Nutr Diet*. 2017
24. Erickson N, Boscheri A, Linke B, Huebner J. Systematic review: isocaloric ketogenic dietary for cancer patients. *Med Oncol*. 2017;34(5):72
25. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 2006;25(34):4633-46
26. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Bearlieu C, Thompson R, et al. A mitochondria-K<sup>+</sup> channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007;11(1):37-51.
27. Sutendra G, Michelakys ED. Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol*. 2013;3:38
28. Michelakys ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, et al. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med*. 2010;2(31):31
29. Khan A, Douglas Andrews D, Blackburn AC. Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy. *World J Clin Cases*. 2016;4(10):336-43



30. Khan A, Marier D, Marsden E, Andrews D, Eliaz I. A novel form of dichloroacetate therapy for patients with advanced cancer: a report of 3 cases. *Altern Ther Health MED*. 2014;20 Suppl 2:21-8
31. Moyer MP, Manzano LA, Merriman RL, Stauffer JS, Tancer LR. NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1996;32(6):315-7
32. Fogh J. *Human Tumor Cells in Vitro*. Nueva York: Plenum Publishing Corp;1975
33. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2:e71
34. Scaduto RC, Grotyohann LW. Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*. 1999;76:469-77
35. Sobradillo D, Hernández-Morales M, Ubierna D, Moyer MP, Nuñez L, Villalobos C. A reciprocal shift in transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and stromal interaction molecule 2 (STIM2) contributes to Ca<sup>2+</sup> remodeling and cancer hallmarks in colorectal carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2014;289(42):28765-82