



INFLUENCIA DEL METABOLISMO LIPÍDICO SOBRE LA RESISTENCIA A DOXORRUBICINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO

POR KARIN IGNACIA TOLEDO OÑATE

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología

Profesor guía y patrocinante: Dr. Felipe Zúñiga Arbalti
Profesora Co-guía: Dra. Valeska Ormazábal Valladares
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Marzo, 2024
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a mi familia por el amor, el apoyo y la compañía que han brindado a lo largo de mi vida. Su presencia ha sido un pilar fundamental en mi camino. Quiero destacar especialmente el apoyo inquebrantable de mi madre y mi tía, Angélica y Verónica, quienes me han guiado con su sabiduría, consolándome en los momentos difíciles y compartiendo cada logro y alegría a mi lado. Su dedicación y sacrificio han sido un ejemplo para mí, inspirándome a ser la mejor versión de mí misma cada día. Mamá y tía, les agradezco de corazón por estar ahí, incluso cuando dudaba de mí misma, por creer en mí cuando más lo necesitaba y por enseñarme el verdadero significado del amor incondicional.

A Lana, quien ha sido un pilar fundamental en los últimos 4 años, acompañándome tanto en el proceso de pregrado como ahora en el postgrado. Su compañía ha traído amor y alegría a mi vida.

A mis amigos, por todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de los años, pues han sido un refugio en los momentos más difíciles. Gracias amigos por escucharme cuando necesitaba desahogarme y por estar a mi lado en los buenos y malos momentos. Estaré eternamente agradecida por tenerlos en mi vida.

Expreso mi sincero agradecimiento al Dr. Felipe Zúñiga, mi profesor tutor, quien me recibió en su laboratorio en 2019 y ha confiado en mis capacidades. Le agradezco no solo por su apoyo académico, sino también por su apoyo en el ámbito personal. Sus enseñanzas han sido fundamentales en mi desarrollo científico y como persona. Gracias por inspirarme, motivarme y brindarme las herramientas necesarias para alcanzar mis metas. También quiero reconocer a la Dra. Valeska Ormazábal, quien ha respaldado mi tesis tanto en pregrado como en postgrado, brindándome valiosos consejos y contribuyendo a mi desarrollo personal.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud a mi equipo de laboratorio, quienes me ayudaron y apoyaron en los momentos críticos. Gracias por hacer grata mi estadía durante estos dos años.

INDICE

INDICE DE ILUSTRACIONES.....	6
INDICE DE TABLAS	8
ABSTRACT.....	9
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Generalidades del cáncer.....	13
1.2. Cáncer de ovario	14
1.3. Drogas antineoplásicas utilizadas como tratamiento en pacientes con cáncer de ovario.....	17
1.4. Líneas celulares de cáncer de ovario.....	19
1.5. Alteraciones del metabolismo celular	21
1.6. Metabolismo de los lípidos y cáncer.....	27
1.7. Inhibidores del metabolismo lipídico.....	32
2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	34
3. HIPOTESIS	35
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo general	35
4.2. Objetivos generales.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1.1. Cultivo de líneas celulares.	36
5.1.2. Análisis de lipidómica por LC-MS.....	36
5.1.2.1. Extracción de las muestras	36
5.1.3. Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.....	39
5.2.1. Determinación del efecto citotóxico de orlistat y etomoxir sobre las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.....	40
5.2.2. Determinación del efecto de orlistat y etomoxir sobre la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.....	41
5.2.3. Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica y glicolítica por RT- qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.....	43
5.3.1. Evaluación de la sensibilidad de DOX en líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3.	44

5.3.2.	Evaluación de la sensibilidad de DOX en líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.	45
5.4.	Análisis estadístico	46
6.1.1.	Análisis de lipidómica por LC-MS.....	47
6.1.2.	Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.....	53
6.2.1.	Análisis del efecto citotóxico de orlistat y etomoxir en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3, y su impacto en la proliferación celular.	54
6.2.2.	Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica y glicolítica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.....	62
7.	DISCUSIÓN	83
8.	CONCLUSION Y PROYECCIONES	100
9.	BIBLIOGRAFÍA	104
10.	ANEXO	115

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1. Gráfico de estimación de los cánceres con mayor tasa de incidencia y mortalidad que afectan a mujeres de todas las edades a nivel mundial	14
Figura 1-2. Gráfico dosis-respuesta de DOX sobre OVCAR-3 y SK-OV-3.....	20
Figura 1-3. Esquema del Efecto Warburg en células cancerosas.	22
Figura 1-4. Curva de proliferación celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 bajo el tratamiento de 2-DG	24
Figura 1-5. Gráfico GR para DOX en OVCAR-3 tratadas con 2-DG	25
Figura 1-6. Gráfico GR para DOX en SK-OV-3 tratadas con 2-DG	26
Figura 1-7. Metabolitos identificados en OVCAR-3 y SK-OV-3	27
Figura 1-8. Esquema del metabolismo de los lípidos	29
Figura 2-1. Curva de densidad celular OVCAR-3.....	42
Figura 2-2. Curva de densidad celular de SK-OV-3.....	43
Figura 6-1. Análisis estadístico del conjunto de datos LC-MS adquiridos en los modos de adquisición ESI+ y ESI- para la comparación del lipidomas entre las células OVCAR-3 y SK-OV-3.....	48
Figura 6-2. Diferencias de lípidos por comparación de grupos entre células OVCAR-3 y SK-OV-3 obtenidas mediante el análisis de <i>fold change</i>	50
Figura 6-3. Niveles de expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en OVCAR-3 y SK-OV-3	53
Figura 6-4. Viabilidad celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 frente al tratamiento con orlistat	55
Figura 6-5. Curva de proliferación celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 bajo el tratamiento de orlistat	57
Figura 6-6. Viabilidad celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 frente al tratamiento con etomoxir	59
Figura 6-7. Curva de proliferación celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 bajo el tratamiento de etomoxir	61

Figura 6-8. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat.....	63
Figura 6-9. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir.....	65
Figura 6-10. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat.....	67
Figura 6-11. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir.....	69
Figura 6-12. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat.....	71
Figura 6-13. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir	73
Figura 6-14. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat.....	75
Figura 6-15. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir	77
Figura 6-16. Gráfico dosis-respuesta a doxorrubicina en células OVCAR-3.....	79
Figura 6-17. Gráfico dosis-respuesta a doxorrubicina en células SK-OV-3.....	81

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de los lípidos significativos categorizados por la ontología de subclases de lípidos en SK-OV-3 obtenida mediante el análisis lipidómico.	51
Tabla 2. Valores de IC ₅₀ obtenidos para doxorubicina en células OVCAR-3 sin tratar y tratadas con orlistat y etomoxir.	80
Tabla 3. Valores de IC ₅₀ obtenidos para doxorubicina en células SK-OV-3 sin tratar y tratadas con orlistat y etomoxir.	82

ABSTRACT

Ovarian cancer represents a critical challenge in gynecological oncology, ranking as the fifth leading cause of cancer death in women and the second among gynecological cancers. Its high mortality rate is primarily attributed to late diagnosis, frequent recurrence, and resistance to antineoplastic drugs used in chemotherapy. In recent years, the fundamental role of metabolic reprogramming in cancer initiation and progression has been acknowledged. Although aerobic glycolysis (the Warburg effect) has been extensively studied as the predominant metabolic disturbance in cancer cells, previous research has revealed that inhibiting this pathway does not significantly impact resistance to antineoplastic agents in ovarian cancer. Instead, metabolomic analyses have suggested that changes in lipid metabolism may be crucial in this phenomenon. Lipid metabolism has emerged as an area of interest due to its contribution to cancer cell growth and proliferation. Studies have demonstrated that cancer cells, including those in ovarian cancer, exhibit a heightened dependence on lipid synthesis and utilization to meet their bioenergetic needs. In this thesis, we investigated the dependence of fatty acid synthesis and β -oxidation in two ovarian cancer cell lines, one sensitive and one drug-resistant, using specific inhibitors against doxorubicin resistance. Through lipidomic analyses, we identified an increase in the expression of glycerophospholipids, such as phosphatidylcholine, exclusively in resistant cells. For the study of fatty acid synthesis and β -oxidation inhibition in cancer cells, two drugs were used: orlistat, an inhibitor of fatty acid synthase, and etomoxir, an inhibitor of carnitine palmitoyltransferase 1. We evaluated the inhibitors' effects on cell proliferation and quantified the mRNA expression of lipid and glycolytic enzymes over a 48-hour period. We observed that both inhibitors halted cell proliferation in a dose-dependent manner. We then assessed doxorubicin sensitivity through dose-response curves in both cell lines treated with orlistat and etomoxir. We found that inhibiting fatty acid synthesis in resistant cells reduced doxorubicin pharmacological potency, while β -oxidation inhibition did not induce changes. These findings suggest that, although resistant cells exhibit a predominance of lipid metabolism, fatty acid synthesis is not

the metabolic pathway associated with antineoplastic drug resistance, as its blockade made these cells even more resistant, while also enhancing other metabolic pathways such as β -oxidation and glycolysis, indicating their ability to adapt and reprogram metabolically. Moreover, we found that β -oxidation plays a crucial role in cell survival, as prolonged blockade prevented these cells from adapting metabolically, ultimately inducing cell death. However, some cells survived both conditions, highlighting cellular heterogeneity. It is essential to continue investigating metabolism in cancer cells that survived fatty acid synthesis and β -oxidation inhibition, as this would help us answer the question of which metabolic pathway is rendering cancer cells resistant, while also providing crucial information about tumor evolution in ovarian cancer patients, whose cancer cells have managed to reprogram their metabolism due to nutritional changes and chemotherapy. Achieving this understanding would allow us to improve therapeutic strategies in ovarian cancer.

RESUMEN

El cáncer de ovario representa un desafío crítico en la oncología ginecológica, siendo la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres y la segunda entre los cánceres ginecológicos. La alta tasa de mortalidad se atribuye principalmente al diagnóstico tardío, así como a la recidiva frecuente y la resistencia a las drogas antineoplásicas utilizadas en la quimioterapia. En los últimos años, se ha reconocido que la reprogramación metabólica juega un papel fundamental en la iniciación y progresión del cáncer. Aunque la glicólisis aeróbica (efecto Warburg) ha sido ampliamente estudiada como la perturbación metabólica predominante en las células cancerosas, investigaciones previas han revelado que la inhibición de esta vía no impacta significativamente en la resistencia a los agentes antineoplásicos en el cáncer de ovario. En cambio, análisis metabolómicos han sugerido que los cambios en el metabolismo lipídico pueden ser cruciales en este fenómeno. El metabolismo de los lípidos ha emergido como un área de interés debido a su contribución al crecimiento y proliferación de las células cancerosas. Estudios han demostrado que las células cancerosas, incluidas las de cáncer de ovario, exhiben una dependencia elevada de la síntesis y utilización de lípidos para satisfacer sus necesidades bioenergéticas. En esta tesis, investigamos la dependencia de la síntesis de ácidos grasos y β -oxidación en dos líneas celulares de cáncer de ovarios, una sensible y otra resistente a drogas, mediante el uso de inhibidores específicos sobre la resistencia a doxorrubicina. A través de análisis lipidómicos, identificamos un aumento en la expresión de glicerofosfolípidos, como fosfatidilcolina, exclusivamente en las células resistentes. Para el estudio de la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de la β -oxidación en las células cancerosas, se utilizaron dos drogas: orlistat, inhibidor de la ácido graso sintasa, y etomoxir, inhibidor de la carnitina palmitoiltransferasa 1. Evaluamos el efecto de los inhibidores sobre la proliferación celular y cuantificamos la expresión de ARNm de enzimas lipídicas y glicolíticas durante un período de 48 horas. Observamos que ambas inhibidores detuvieron la proliferación celular de manera dependiente de la dosis. Luego, evaluamos la sensibilidad a doxorrubicina mediante curva de dosis-respuestas en ambas líneas celulares tratadas con orlistat y etomoxir. Descubrimos

que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos en las células resistentes disminuyó la potencia farmacológica de doxorubicina, mientras que la inhibición de la β -oxidación no indujo cambios. Estos hallazgos sugieren que, aunque las células resistentes presentan una predominancia por el metabolismo lipídico, la síntesis de ácidos grasos no es la vía metabólica asociada con los mecanismos de resistencia a drogas antineoplásicas ya que su bloqueo volvió aún más resistentes a este tipo celular, además de potenciar otras vías metabólicas como la β -oxidación y la glicólisis, indicándonos que logran adaptarse y reprogramarse metabólicamente. Por otro lado, encontramos que la β -oxidación tiene un papel crucial en la supervivencia celular ya que su bloqueo prolongado provocó que estas células no lograran adaptarse metabólicamente, induciendo finalmente su muerte celular. Sin embargo, algunas células sobrevivieron ambas condiciones, destacando la heterogeneidad celular. Es fundamental continuar con la investigación del metabolismo en las células cancerosas que sobrevivieron a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de la β -oxidación, ya que nos ayudaría a responder la incógnita sobre qué vía metabólica está volviendo resistente a las células cancerosas, además de proporcionar información crucial sobre la evolución del tumor en una paciente con cáncer de ovario, cuyas células cancerosas han logrado reprogramar su metabolismo celular debido a los cambios nutricionales y a la quimioterapia. Lograr concretar este conocimiento nos permitiría mejorar las estrategias terapéuticas en el cáncer de ovario.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cáncer

El cáncer es una enfermedad no transmisible que exhibe tasas de mortalidad significativas a nivel mundial, situándose como la primera causa de muerte en Chile (Sung et al., 2021). En las últimas décadas, la incidencia del cáncer ha experimentado un aumento alarmante, probablemente vinculado al estilo de vida, cambios en los hábitos y el aumento de la esperanza de vida (Roy & Saikia, 2016).

Esta enfermedad se distingue por una desregulación en el proceso de división celular normal, lo cual conduce a una proliferación descontrolada de células malignas que exhiben diferencias morfológicas y funcionales. Este fenómeno se acompaña de una acumulación secuencial de mutaciones, donde cada una promueve la pérdida de características específicas del tejido. Este proceso conduce finalmente a la desdiferenciación celular y la regresión a un fenotipo más primitivo (Aguilar-Gallardo & Simon, 2013).

A nivel mundial, en el año 2020 se registraron 19,2 millones de casos incidentes de cáncer. El cáncer de mama ocupó el primer lugar registrando el 11,7% de los casos, seguido por cáncer de pulmón (11,4%), cáncer colorrectal (10%), cáncer de próstata (7,3%) y cáncer de estómago (5,6%). Sin embargo, según las tasas de incidencia ajustadas, el tipo de cáncer con mayor incidencia el año 2020 fue el cáncer de mama (47,8 casos por 100.000 habitantes), seguido del cáncer de próstata, pulmón y colorrectal (Ministerio de Salud [MINSAL], 2022).

En el análisis específico del sexo femenino, según se evidencia en la Figura 1-1, el cáncer de mama y pulmón mantienen su posición como el de mayor y tercer incidencia, respectivamente. No obstante, a pesar de que el cáncer de mama ostenta el rol preeminente como la principal neoplasia que afecta a las mujeres, se caracteriza por una tasa de mortalidad relativamente baja, alcanzando los 13,6 por 100.000, en marcado contraste con su alta tasa de incidencia, situada en 47,8 por 100.000.

Al comparar los otros tipos de cáncer que afectan a las mujeres, según la Figura 1-1, el cáncer de ovario se presenta con una incidencia más reducida, registrando 6,6 por 100.000, pero con una alta tasa de mortalidad, situada en 4,2 por 100.000, destacando la importancia de considerar tanto la incidencia como la mortalidad al evaluar la carga de la enfermedad asociada a estos trastornos.

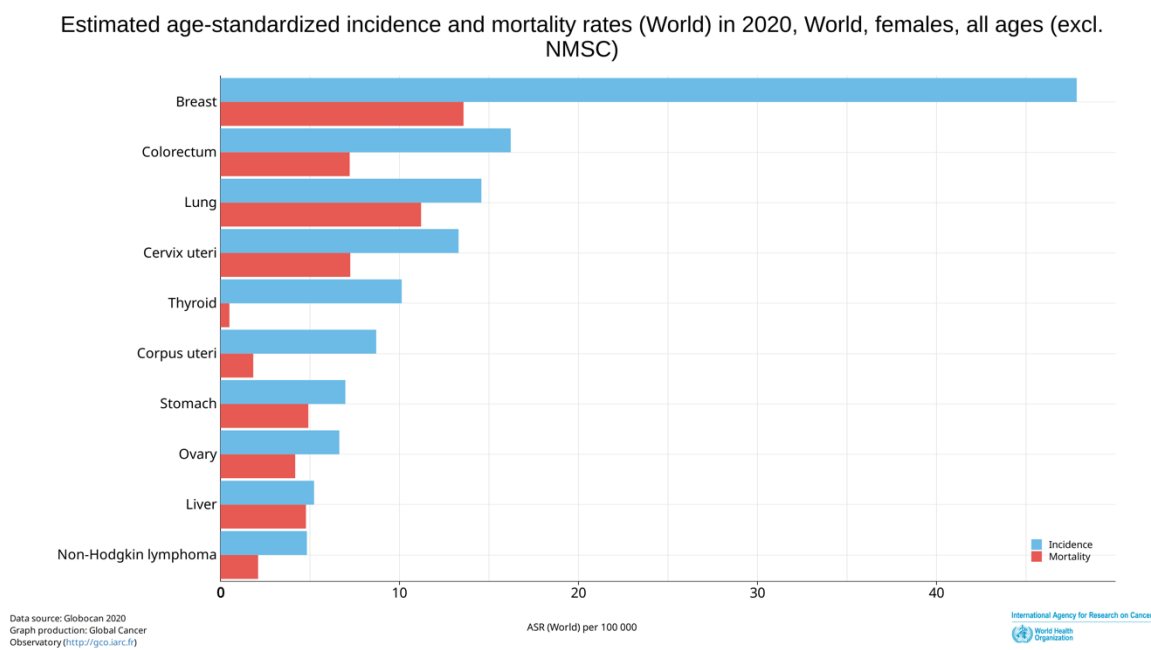


Figura 1-1. Gráfico de estimación de los cánceres con mayor tasa de incidencia y mortalidad que afectan a mujeres de todas las edades a nivel mundial. Fuente: GLOBOCAN 2020 (<https://gco.iarc.fr/en>)

1.2. Cáncer de ovario

El cáncer de ovario constituye una de las neoplasias ginecológicas malignas preeminentes que afectan principalmente a los ovarios, emergiendo como la segunda causa de mortalidad en mujeres diagnosticadas con patologías oncológicas ginecológicas (Bray et al., 2018; Sambasivan, 2022). Además, se posiciona como la quinta causa más frecuente de decesos en mujeres en general (Arora et al., 2024). La denominación “cáncer de ovario” engloba varios histotipos que exhiben diversas bases celulares, anomalías moleculares y trayectorias de progresión de la enfermedad en pacientes (Hasan et al., 2015). Aunque pueda

afectar a mujeres de todas las edades, su diagnóstico se manifiesta con mayor frecuencia después de la menopausia (Doubeni et al., 2016).

En el transcurso del año 2020, se confirmaron 21.750 nuevos casos de cáncer de ovario, representado el 1.2% de la totalidad de casos de cáncer a nivel mundial (Sung et al., 2021). En el contexto específico de Chile, se estima que las cinco regiones con la mayor incidencia se ubican en Magallanes (12,2 por cada 100.000 mujeres), Biobío (8.1 por cada 100.000 mujeres), Tarapacá (7,4 por cada 100.000 mujeres), Los Lagos (7,3 por cada 100.000 mujeres) y Los Ríos (7.2 por cada 100.000 mujeres) (Ministerio de Salud [MINSAL], 2019).

Dependiendo del tejido de origen, el cáncer de ovario se clasifica en tres categorías principales: carcinoma epitelial, carcinomas de células germinales y carcinoma de células estromales. El carcinoma epitelial (EOC) constituye la variante más prevalente, representando aproximadamente el 90% de todos los casos en mujeres. El EOC se subdivide en dos tipos histológicos distintos: los tumores de tipo 1, caracterizados por su homogeneidad genética, lento desarrollo y frecuentemente localizado dentro del ovario al momento del diagnóstico, lo que facilita la detección temprana. Los tumores de tipo 2, por otro lado, se distinguen por su alta invasividad y rápido crecimiento, siendo identificados en etapas más avanzadas (Kroeger & Drapkin, 2017). En esta última categoría se encuentra el carcinoma seroso de alto grado (HGSOC).

El HGSOC representa el histotipo más prevalente y, simultáneamente, uno de los más agresivos, constituyendo aproximadamente el 70% de los casos diagnosticados (Natanzon et al., 2018). Se distingue por su inestabilidad genética, atribuible a mutaciones en genes específicos. La mutación más frecuente recae en el gen TP53, el cual codifica la proteína p53. Esta proteína supresora de tumores desempeña funciones cruciales, incluyendo la activación de enzimas de reparación del ADN y la inducción de apoptosis en situaciones donde el daño en el ADN es irreparable, evitando así la proliferación de las células con anomalías genéticas; las mutaciones de TP53 generan proteínas p53 no funcionales. Además, se ha

identificado mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, las cuales resultan en defectos en los mecanismos de reparación del ADN (Matulonis et al., 2016).

Con respecto a su etiopatogenia, a excepción de los casos derivados predisposición hereditaria, se postula que las dos principales hipótesis que podrían explicar la carcinogénesis en el ovario son las siguientes: sucesivas ovulaciones, que terminan ocasionando traumas repetidos y reparación del epitelio del ovárico, lo cual termina induciendo mutaciones genéticas que finalmente desencadenan la formación de una neoplasia; y exceso de secreción de gonadotropinas, que termina en elevadas concentraciones de estrógenos y, consecuentemente, a una proliferación epitelial y posible transformación maligna (Ministerio de Salud [MINSAL], 2019).

Las principales causas de la elevada tasa de mortalidad en el cáncer de ovario son el diagnóstico tardío y la recidiva del cáncer primario, acompañados por la resistencia a la quimioterapia. Un 75% de los casos se diagnostican en etapas avanzadas, en parte debido a la falta de especificidad en los síntomas del cáncer de ovario, lo que facilita que pase desapercibido en etapas tempranas, al poder atribuirse a otras posibles enfermedades (Arora et al., 2022). Frecuentemente, los síntomas y signos clínicos se manifiestan cuando el cáncer ya ha progresado a una etapa avanzada. Estos incluyen dolor abdominal, hinchazón persistente, saciedad temprana, fatiga, síntomas urinarios, dolor de espalda, pérdida de peso, sangrado y secreciones vaginales anormales (Lheureux et al., 2019).

En contraste, alrededor del 80% de las pacientes experimentan una recidiva de la enfermedad en los primeros 5 años después del diagnóstico, donde solo el 15% de los casos responden a la quimioterapia subsiguiente (van Zyl et al., 2018). El reducido índice de respuesta a la quimioterapia se atribuye al desarrollo de quimiorresistencia a las drogas antineoplásicas en las pacientes.

En etapas tempranas, el cáncer de ovario muestra una tasa de supervivencia a los 5 años del 92%. Sin embargo, esta cifra disminuye significativamente, oscilando entre el 17% y el 28%, en el caso de pacientes con la enfermedad en etapas avanzadas (Kroeger & Drapkin, 2017). Además, debido a la naturaleza

avanzada de la enfermedad, se requiere la implementación de tratamientos antineoplásicos agresivos. Aunque estos tratamientos buscan un efecto terapéutico, suelen conllevar efectos colaterales que pueden comprometer la salud de la paciente, perjudicando aún más la supervivencia.

1.3. Drogas antineoplásicas utilizadas como tratamiento en pacientes con cáncer de ovario.

El tratamiento inicial para el cáncer de ovario se centra en llevar a cabo una cirugía con el objetivo de lograr una citorreducción máxima, seguida de una quimioterapia adyuvante intravenosa que combina platino y paclitaxel (Kuroki & Guntupalli, 2020). Es importante destacar que esta estrategia se aplica de manera independiente al subtipo histológico del cáncer de ovario (Arora et al., 2022).

En los compuestos derivados del platino, se incluye el carboplatino y cisplatino. Ambos compuestos comparten un mecanismo de acción que implica la formación de un enlace covalente con los átomos de nitrógeno de dos guaninas adyacentes en la misma cadena de ADN o con una cadena diferente. Este enlace funciona como un aducto del ADN, generando la inhibición de la replicación del material genético al obstaculizar la separación de las hebras de ADN. En consecuencia, la capacidad de la célula para dividirse se ve comprometida, y se inhibe la transcripción del ADN, llevando finalmente a la supresión de la división celular e induciendo la apoptosis (Damia & Brogini, 2019; Kuroki & Guntupalli, 2020).

El agente antineoplásico paclitaxel promueve la polimerización de los dímeros de tubulina que forman los microtúbulos y los estabiliza evitando la despolimerización. Este mecanismo conduce a que los cromosomas no logren alcanzar la configuración requerida para la metafase, resultando en la detención de la mitosis y, finalmente, induciendo la apoptosis (Ezrahi et al., 2019).

Aunque un porcentaje notable de pacientes presentan una respuesta inicial positiva al tratamiento con base en platino, la mayoría de ellas experimentan

recidivas en los siguientes 18 meses, con una tasa de supervivencia a 5 años de aproximadamente el 30% (Munoz-Galvan et al., 2020). Solo un 15% de los casos responden favorablemente a la quimioterapia posterior, debido al desarrollo de resistencia a los fármacos antineoplásicos utilizados en la terapia de primera línea, especialmente aquellos derivados de platino (Damia & Brogini, 2019).

Por esta razón, resulta crucial considerar otros agentes para la quimioterapia de segunda línea en pacientes que han desarrollado resistencia a los compuestos de platino. En la década de los 90, se inició el desarrollo de nuevas drogas con actividad en la segunda línea de tratamiento para abordar el cáncer de ovario que ha recidivado tras la terapia inicial. Después de diversos estudios que compararon estos fármacos en monoterapia, los resultados respaldaron la aprobación de la doxorubicina (DOX) para el tratamiento de segunda línea en el cáncer de ovario (Gordon et al., 2004).

La doxorubicina (DOX) es un antibiótico antraciclina con propiedades antitumorales producido por *Streptococcus peucetius var. caesius* (Arcamone et al., 1969). Este agente citotóxico ejerce su acción a través de dos mecanismos duales: i) puede intercalarse con el ADN, afectando así diversas funciones y bloqueando la síntesis de ADN, generando roturas en las cadenas simples y dobles (Rodríguez Carranza, 2015), y perturbando el mecanismo de reparación del ADN mediado por la topoisomerasa; y ii) libera radicales libres. La DOX tiene la capacidad de oxidarse a semiquinona, un metabolito inestable que se convierte nuevamente en DOX mediante una vía que genera especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto provoca peroxidación lipídica, daño en la membrana, lesiones en el ADN, estrés oxidativo y muerte celular mediante la inducción de vías apoptóticas (Faraji et al., 2016).

A pesar de ser uno de los fármacos más efectivos para tratar diversos tipos de cáncer en adultos y niños, la DOX presenta un efecto secundario significativo que restringe su uso: la cardiotoxicidad dependiente de la dosis. Este efecto adverso puede ser potencialmente letal en sobrevivientes de cáncer muchos años después de suspender la quimioterapia (Kalyanaraman, 2020). Además, las quimioterapias citotóxicas convencionales de segunda línea, que incluyen la DOX, ofrecen un

beneficio clínico limitado, con tasas generales de respuesta que oscilan entre el 10% y el 25% (Chatterjee et al., 2010), destacando así la necesidad insatisfecha de desarrollar nuevas terapias.

1.4. Líneas celulares de cáncer de ovario

En las últimas décadas, se ha experimentado un avance significativo en las herramientas moleculares utilizadas para identificar los mecanismos involucrados en la progresión o la respuesta al tratamiento del cáncer. A pesar de estos avances, debido a la marcada heterogeneidad de las células cancerosas, aún no se ha logrado investigar en profundidad los eventos que ocurren al interior del tumor de un paciente. En este contexto, las líneas celulares han emergido como una herramienta esencial en la investigación del cáncer, permitiendo estudiar la biología del tumor y todos los aspectos relacionados.

Los distintos tipos de cáncer son enfermedades que presentan evoluciones y enfoques terapéuticos únicos. En este sentido, las líneas celulares son modelos útiles *in vitro* que permiten avanzar hacia la medicina personalizada del cáncer.

Para estudiar el cáncer de ovario, se dispone de diversas líneas celulares que se distinguen por sus características histológicas y genéticas. Estas líneas celulares provienen tanto de tumores serosos como no serosos de alto grado, y se clasifican en función de su perfil genómico (Domcke et al., 2013).

OVCAR-3 es una línea celular de cáncer de ovario humano, derivada de HGSOc, que presenta una morfología tipo epitelial. Fue descubierta en el año 1982 de la ascitis maligna de una mujer de 60 años con adenocarcinoma de ovario progresivo. Este tipo de línea celular se caracteriza por representar una etapa temprana del cáncer de ovario.

SK-OV-3 es una línea celular de cáncer de ovario humano, derivada de OC no seroso, que presenta una morfología tipo epitelial. Fue descubierta en el año 1973 proveniente de líquido ascítico de una mujer caucásica de 64 años con adenocarcinoma de ovario. Aunque la información sobre el origen de SK-OV-3 es limitada, se sabe que derivó del líquido ascítico en vez de un tumor primario y, dado

que la formación de ascitis está asociada con la enfermedad avanzada, presenta un comportamiento invasivo que también representa el comportamiento de la enfermedad en etapa avanzada (Ahmed & Stenvers, 2013).

Se ha evidenciado que la línea celular SK-OV-3 exhibe comportamientos diferentes en comparación con la línea celular OVCAR-3: muestra una capacidad de migración más rápida y una invasión significativamente mayor (Hallas-Potts et al., 2019). Ambas líneas celulares desarrollan resistencia a las drogas utilizadas en la quimioterapia de primera línea, como el cisplatino (Kim et al., 2012). Sin embargo, se ha observado que ambas líneas celulares responden de manera diferente ante la DOX (Alarcon-Zapata et al., 2023).

Al analizar las curvas de respuesta al crecimiento (GR), se observa que la DOX exhibe dos efectos distintos: en las células OVCAR-3, actúa como un agente citotóxico, mientras que en las células SK-OV-3, funciona como un agente citostático, es decir, tiene la capacidad de inhibir la proliferación celular sin inducir citotoxicidad, tal como se muestra en la Figura 1-2.

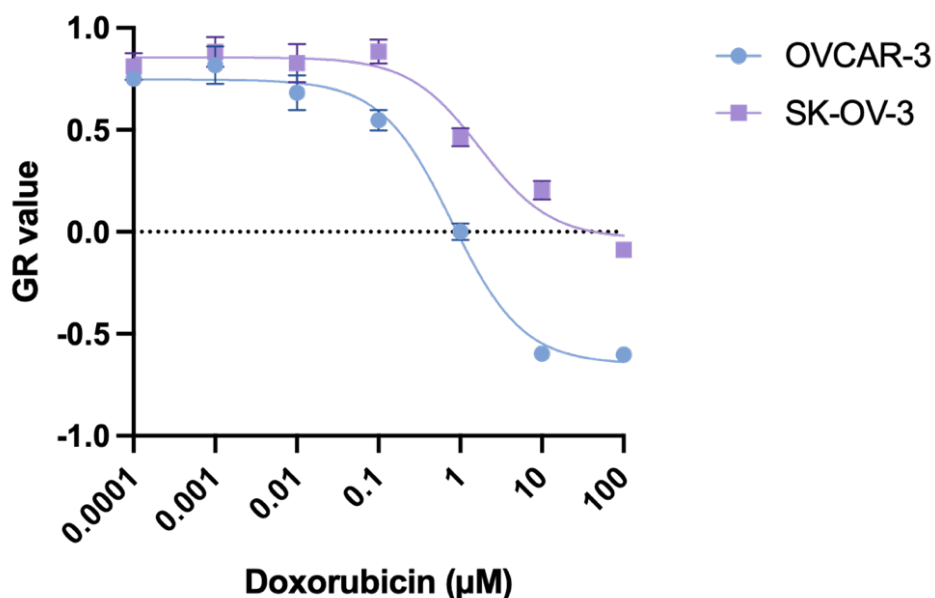


Figura 1-2. Gráfico dosis-respuesta de DOX sobre OVCAR-3 y SK-OV-3. Curva GR para evaluar DOX sobre las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 a las concentraciones de 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 y 100 μM por 24 horas. A) Células

OVCAR-3 tratadas con DOX por 24 horas. B) Células SK-OV-3 tratadas con DOX por 24 horas. Fuente: (Toledo-Oñate, 2023)

1.5. Alteraciones del metabolismo celular

La desregulación de la energía celular constituye a uno de los sellos distintivos del cáncer y ha demostrado respaldar diversos pasos durante el desarrollo de la enfermedad. Este fenómeno implica una reprogramación metabólica destinada a favorecer el crecimiento, la proliferación, la invasión y la metástasis de las células cancerosas, alterando el metabolismo que opera normalmente la mayoría de las células (Hanahan & Weinberg, 2011). Desde hace mucho tiempo se ha observado que las células cancerosas presentan una actividad metabólica anómala en comparación con las células de su tejido de origen.

La perturbación metabólica más reconocida en las células cancerosas es el efecto Warburg, también conocido como glicólisis aeróbica. Se trata de una alteración en la cual las células cancerosas consumen cantidades elevadas de glucosa y la metabolizan en lactato, utilizando la glicólisis como su principal fuente de ATP, mientras suprimen la fosforilación oxidativa, incluso en presencia de oxígeno (Kubicka et al., 2021) (Figura 1-3). No obstante, el metabolismo anómalo de la glicólisis no es la única perturbación metabólica presente en las células cancerosas. En los últimos años, se ha reconocido la existencia de otras vías metabólicas alteradas en el cáncer, siendo particularmente relevante el metabolismo de los lípidos (Zechner et al., 2012). Estas alteraciones metabólicas en las células cancerosas, caracterizadas por un incremento en la actividad glicolítica y lipídica, les permiten satisfacer su demandas de macromoléculas y energía, respaldando así el rápido crecimiento y proliferación celular (Zhao et al., 2017).

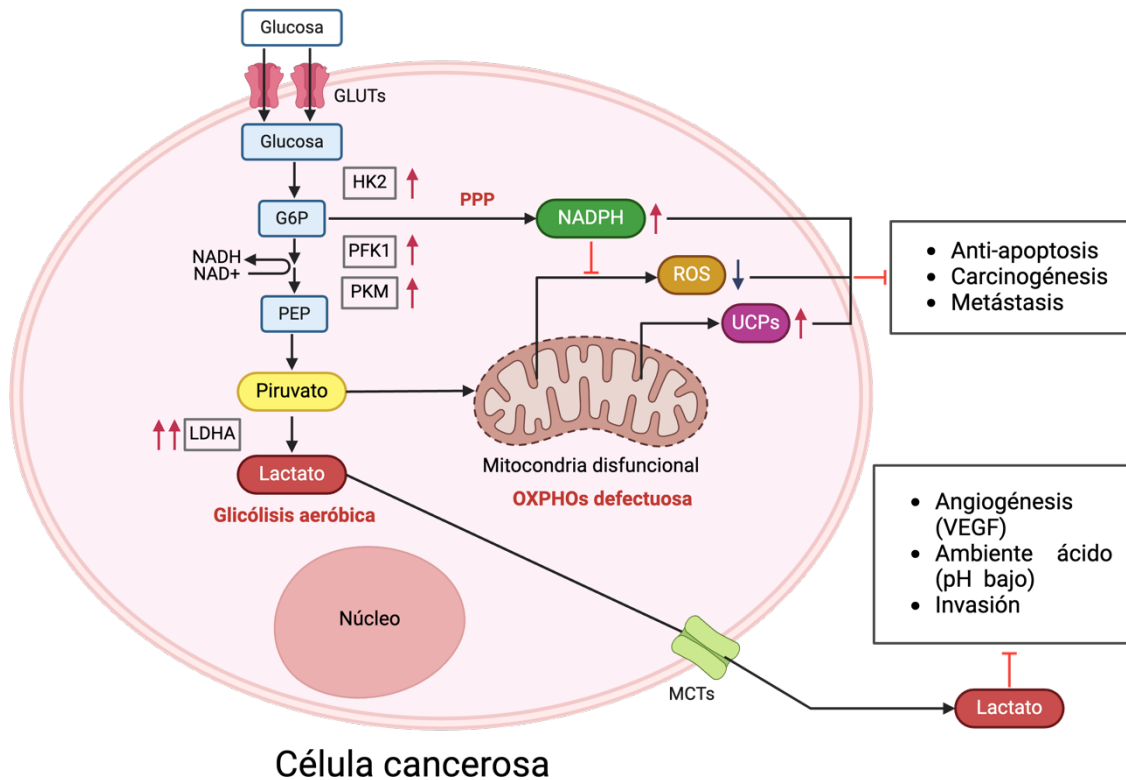


Figura 1-3. Esquema del Efecto Warburg en células cancerosas. NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; ROS: especies reactivas de oxígeno; UCP: proteínas desacopladoras; PEP: fosfoenolpiruvato; GLUT: transportadores de glucosa; HK: hexoquinasa; G6P: glucosa-6-fosfato; MCT: transportadores de monocarboxilatos; PPP: vía de las pentosas fosfato; PGFK1: fosfofructoquinasa-1; PKM: piruvato quinasa; LDHA: lactato deshidrogenasa A. Modificado de: (Fu et al., 2017).

Se ha constatado que los diversos tipos histológicos de cáncer de ovario exhiben distintos cambios metabólicos, los cuales están influenciados por las condiciones específicas del cáncer, incluyendo la quimiorresistencia frente a la quimiosensibilidad, así como la agresividad del tumor (Nantasupha et al., 2021). Esto se ha evidenciado en investigaciones que destacan la presencia de elevados niveles de actividad glicolítica en líneas celulares de cáncer de ovario humano en comparación con células ováricas humanas normales. Además, la evidencia clínica

respalda el aumento de la actividad glicolítica en los tejidos afectados por el cáncer de ovario, contrastando con los tejidos ováricos normales (Nantasupha et al., 2021). Estos hallazgos se han corroborado mediante el aumento de las enzimas GLUT1, PKM, HK2, LDHA y PFK (Xintaropoulou et al., 2018).

En nuestro laboratorio, se investigó el papel de la glicólisis en los mecanismos de resistencia a fármacos antineoplásicos en células de cáncer de ovario, particularmente DOX, mediante el empleo de un inhibidor de la glicólisis, la 2-desoxi-D-glucosa (2-DG). La 2-DG, un análogo estructural de la glucosa, se distingue por la sustitución de un grupo hidroxilo por hidrógeno en el segundo átomo de carbono (Aft et al., 2002). Al competir con la glucosa, la 2-DG es transportada por los transportadores de glucosa. Su mecanismo de acción radica en ser fosforilada por la enzima hexoquinasa, dando lugar a 2-DG-6-fosfato, lo que resulta en la acumulación intracelular de 2-DG-6-fosfato, llevando a la inhibición de la glicólisis (Pajak et al., 2019).

Se estudió la proliferación celular por 5 días de células OVCAR-3 y SK-OV-3 en presencia y ausencia de 2-DG (Figura 1-4). Los resultados obtenidos revelaron que la incubación con 2-DG generó una disminución en la proliferación celular para ambas líneas celulares. Además, a las 72 horas de incubación con 2-DG, solo se observó citotoxicidad en las células OVCAR-3 (Toledo-Oñate, 2023).

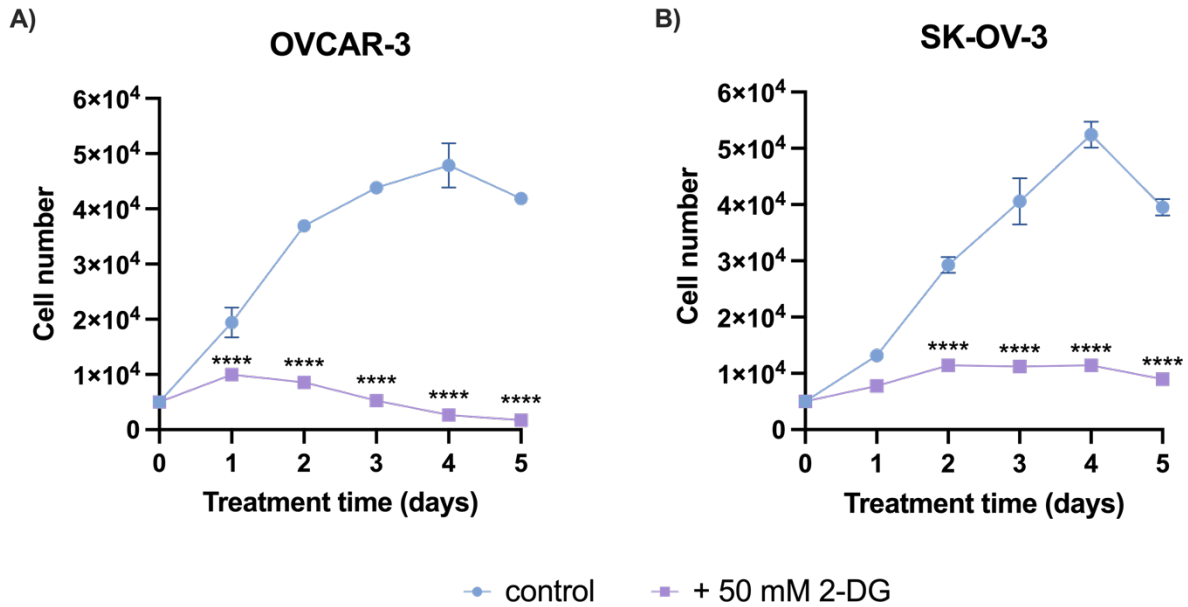


Figura 1-4. Curva de proliferación celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 bajo el tratamiento de 2-DG. Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron sometidas a 50 mM de 2-DG durante un periodo de incubación de 5 días. La línea celeste representa el control, correspondiente a células sin tratamiento, mientras que la línea violeta representa células tratadas con 2-DG. A) Células OVCAR-3 tratadas con 50 mM de 2-DG durante 5 días. B) Células SK-OV-3 tratadas con 50 mM de 2-DG durante 5 días. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; ***** <0.0001). Fuente: (Toledo-Oñate, 2023).

Las curvas de dosis-respuesta de DOX en presencia de 2-DG, revelaron que la inhibición de la glicólisis incrementó 2,2 veces la potencia farmacológica de DOX en la línea celular OVCAR-3. Esto se evidenció mediante la disminución del valor GR_{50} (concentración de DOX que logra el 50% del efecto citotóxico), pasando de $0,79 \mu\text{M}$ a $0,32 \mu\text{M}$ (Figura 1-5). Por otro lado, en la línea celular SK-OV-3, conocida por su resistencia a drogas antineoplásicas, la inhibición de la glicólisis resultó en una reducción de 2,4 veces la potencia farmacológica de DOX. Esto se reflejó en un aumento del valor GR_{50} , pasando de $1,75 \mu\text{M}$ a $4,24 \mu\text{M}$, manteniendo su fenotipo citostático. Este hallazgo indica que la glicólisis no es la vía preferente

utilizada en las células resistentes a drogas para mantener la quimioterapia (Figura 1-6).

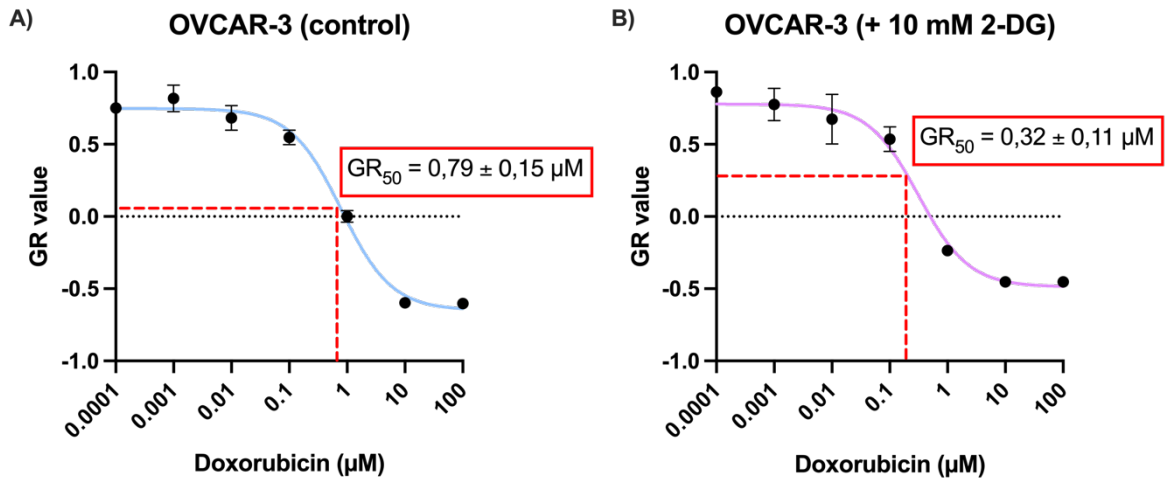


Figura 1-5. Gráfico GR para DOX en OVCAR-3 tratadas con 2-DG. Las células OVCAR-3 fueron sometidas a una concentración de 10 mM de 2-DG durante 48 horas, seguido de exposición a concentraciones crecientes de DOX durante 24 horas. La línea roja punteada representa la concentración de DOX en la cual la población celular experimenta una reducción del 50%. A) Células OVCAR-3 sin tratamiento con 2-DG. B) Células OVCAR-3 tratadas con 10 mM de 2-DG por 48 horas. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. Fuente: (Toledo-Oñate, 2023).

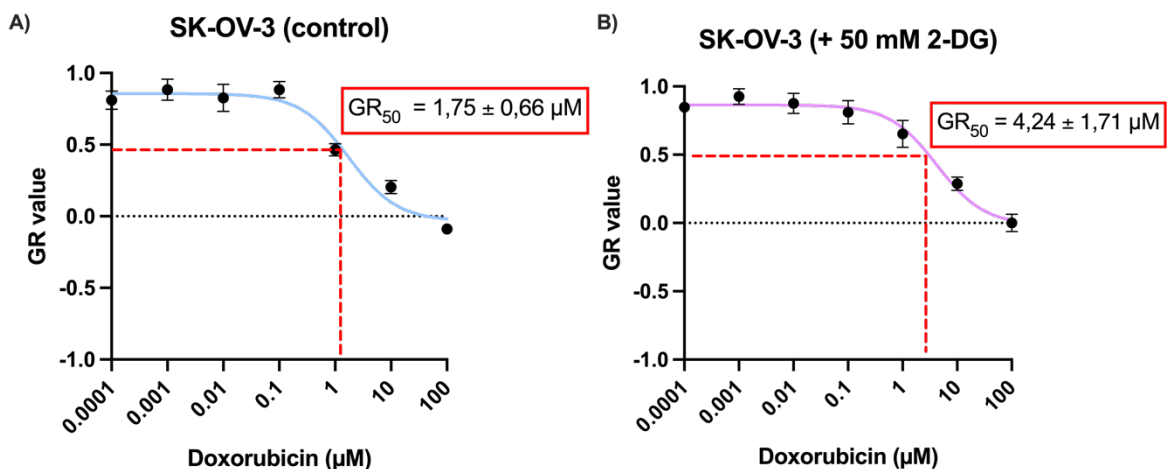


Figura 1-6. Gráfico GR para DOX en SK-OV-3 tratadas con 2-DG. Las células SK-OV-3 fueron sometidas a una concentración de 50 mM de 2-DG durante 72 horas, seguido de exposición a concentraciones crecientes de DOX durante 24 horas. La línea roja punteada representa la concentración de DOX en la cual la población celular experimenta una reducción del 50%. A) Células SK-OV-3 sin tratamiento con 2-DG. B) Células SK-OV-3 tratadas con 50 mM de 2-DG por 72 horas. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. Fuente: (Toledo-Oñate, 2023).

Un análisis metabolómico de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 nos ayudó a identificar los principales metabolitos y vías metabólicas presentes en ambas líneas. Los principales metabolitos presentes en la línea celular sensible a drogas (OVCAR-3) corresponden a metabolitos relacionados con el metabolismo del glutatión, como el ácido glutámico (glutamato), glutamina y glicólisis, mientras que en las células resistentes a drogas (SK-OV-3), presentan un enriquecimiento de metabolitos relacionados con el metabolismo de los lípidos, como la carnitina, la β -oxidación y síntesis de ácidos grasos, reforzando la importancia del metabolismo lipídico en las células cancerosas y asociándola con los mecanismos de resistencia a fármacos (Figura 1-7) (Alarcon-Zapata, 2023).

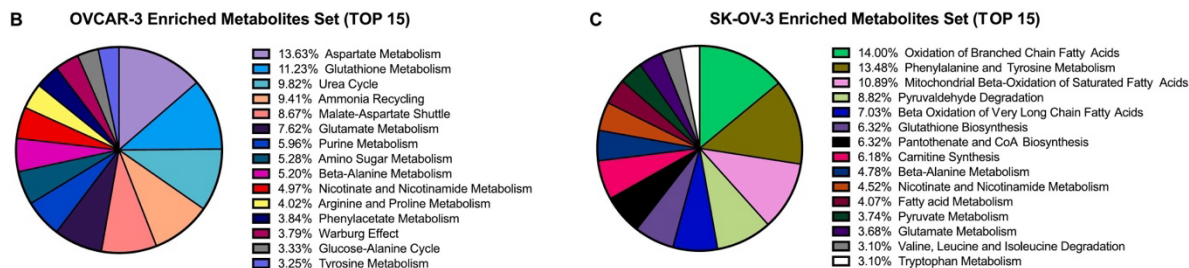


Figura 1-7. Metabolitos identificados en OVCAR-3 y SK-OV-3. Principales metabolitos identificados en células OVCAR-3 y SK-OV-3 basados en valor p. B) Enriquecimiento de la vía metabólica en OVCAR-3, basado en el valor $-\log(p)$. C) Enriquecimiento de la vía metabólica en SK-OV-3, basado el valor $-\log(p)$. Las vías metabólicas más importantes se expresan en porcentaje total. Fuente: (Alarcon-Zapata et al., 2023)

Por lo tanto, las prioridades metabólicas de estas dos líneas celulares son distintas: las células OVCAR-3 parecen centrarse en el metabolismo de aminoácidos y glicolítico, mientras que las células SK-OV-3 priorizan el metabolismo de los ácidos grasos (Alarcon-Zapata et al., 2023).

1.6. Metabolismo de los lípidos y cáncer

Los lípidos, junto con las proteínas y ácidos nucleicos, conforman componentes fundamentales de las membranas biológicas. En calidad de nutrientes esenciales, los lípidos desempeñan un papel crucial al proporcionar una gran cantidad de energía y actuar como moléculas biológicamente activas en diversas vías de señalización. Estas vías están involucradas en procesos biológicos clave, tales como la inflamación, la inmunidad, la proliferación celular y la diferenciación (Fahy et al., 2011; Swinnen et al., 2006). Cuatro rutas principales resaltan la dirección y utilización de los lípidos en la célula: 1) captación, 2) lipogénesis, 3) almacenamiento y 4) degradación (Ji et al., 2020). Estas rutas desempeñan funciones importantes en la regulación y el mantenimiento de los niveles adecuados de lípidos intracelulares, influyendo así en la homeostasis celular y participando activamente en los procesos fisiológicos mencionados anteriormente.

Las células cancerosas, situadas en los microambientes tumorales caracterizados por fluctuaciones continuas en la disponibilidad de nutrientes durante la progresión del cáncer, aprovechan el metabolismo lipídico para respaldar sus procesos de rápida proliferación, supervivencia, migración, invasión y metástasis (Bian et al., 2021). En este contexto, el carbono debe desviarse desde la generación de energía a partir de los ácidos grasos hacia la biosíntesis de membranas y moléculas de señalización.

En particular, los lípidos de membrana celular, predominantemente fosfolípidos como la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, junto con otros lípidos como esteroides y esfingolípidos, desempeñan un papel crucial en estas funciones biológicas. Estas moléculas no solo constituyen los bloques de construcción estructurales de las membranas celulares, sino que también actúan como mediadores clave en las vías de señalización intracelular. Es importante destacar que una proporción significativa de estos lípidos se deriva del acetil-CoA, y muchos de ellos contienen ácidos grasos (Currie et al., 2013).

La desregulación del metabolismo lipídico en el contexto del cáncer, que incluye un incremento tanto en la síntesis como en la degradación de ácidos grasos, ocurre en diversos tipos de neoplasias, proporcionando un sustento fuerte para la progresión tumoral. Múltiples estudios han identificado alteraciones significativas en la expresión y actividad de diversas enzimas vinculadas a las vías de síntesis y catabolismo de ácidos grasos, particularmente fosfolípidos y colesterol, en varios tipos de cáncer (Ji et al., 2020). Este fenómeno destaca la complejidad de las alteraciones metabólicas asociadas al cáncer y sugiere que la regulación disfuncional de estas vías metabólicas puede desempeñar un papel crucial en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Figura 1-8).

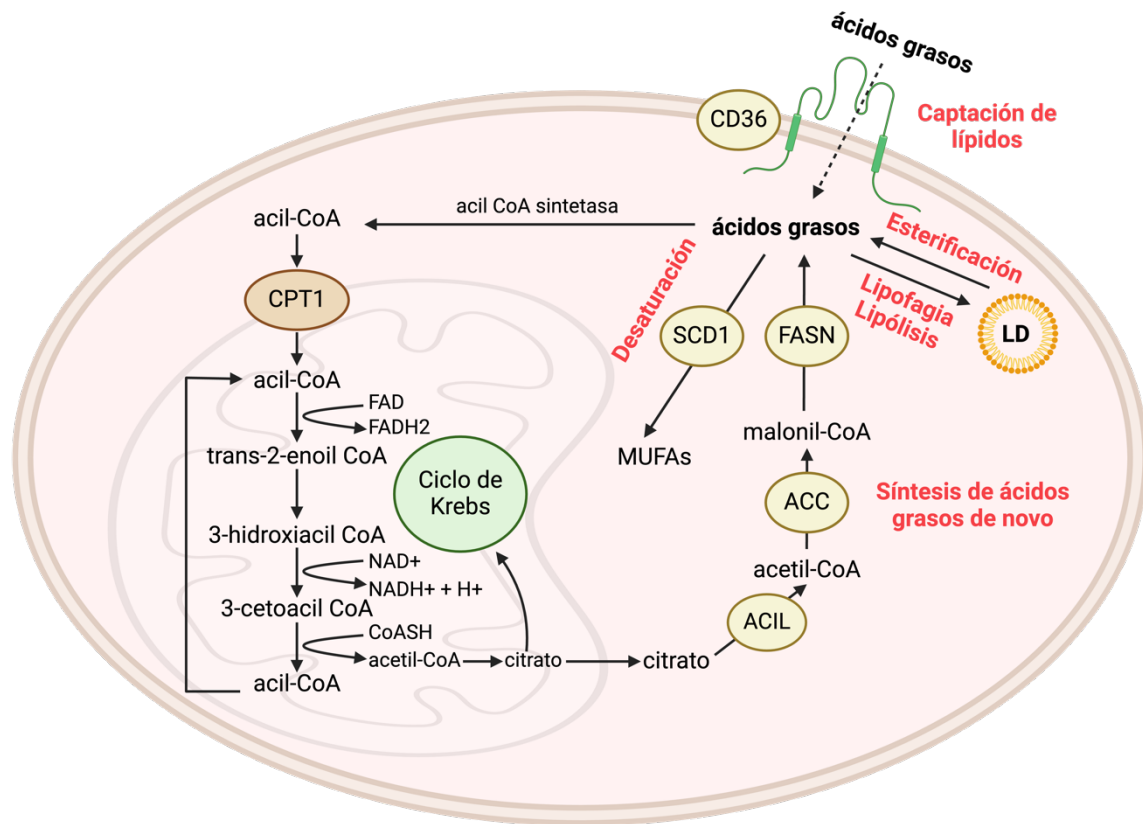


Figura 1-8. Esquema del metabolismo de los lípidos. Los ácidos grasos extracelulares se transportan al interior de las células a través de CD36 y luego se reutilizan mediante la β-oxidación en las mitocondrias para liberar acetil-CoA. El acetil-CoA se convierte en citrato mediante la citrato sintetasa e ingresa al ciclo de Krebs para su oxidación completa. Alternativamente, la síntesis de ácidos grasos de novo comienza con acetil-CoA y se acumula mediante la adición de dos unidades de carbonos. Además del catabolismo de los lípidos, los ácidos grasos se esterifican a glicerol y luego los triglicéridos se almacenan en gotitas de lípidos. La descomposición de las gotitas de lípidos mediante lipólisis o lipofagia permite la movilización de la energía almacenada hacia las mitocondrias. Además, los ácidos grasos saturados se desaturan en ácidos grasos monoinsaturados mediante SCD1. ACC: acetil-CoA carboxilasa; ACIL: ATP citrato liasa; FASN: ácido graso sintasa; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; SCD1: estearoil-CoA desaturasa 1; CPT1: carnitina palmitoiltransferasa 1; LD: gotita de lípidos. Modificado de: (Yi et al., 2018).

Entre las enzimas limitantes de la velocidad en la síntesis de ácidos grasos, destaca la ácido graso sintasa (FASN), una enzima de importancia clave para la síntesis endógena de ácidos grasos. Esta enzima cataliza la formación de ácido palmítico, ácido graso de 16 carbonos, mediante la condensación de malonil-CoA y acetil-CoA (Menendez & Lupu, 2007). La función fisiológica de FASN en condiciones normales radica en la conversión de excedentes de carbohidratos en ácidos grasos, los cuales posteriormente se esterifican en triacilgliceroles y, finalmente, se almacenan o se utilizan como fuente de energía a través del proceso de la β -oxidación (Ji et al., 2020).

La sobreexpresión de FASN se ha vinculado de manera consistente con un pronóstico desfavorable y una disminución en la supervivencia libre de enfermedad en diversos tipos de cáncer. En un estudio llevado a cabo por Liu y colaboradores, se observó que en una línea celular de cáncer de mama resistente a fármacos, la FASN estaba notablemente sobreexpresada, y se evidenció que esta sobreexpresión funcionalmente contribuía al aumento de la resistencia a agentes antineoplásicos (Liu et al., 2008).

Investigaciones más recientes han sugerido que las disfunciones en el metabolismo de los ácidos grasos desempeñan un papel crucial en la agresividad del cáncer de ovario. En particular, el incremento en la expresión de FASN en líneas celulares de cáncer de ovario se asocia con un aumento en la síntesis de ácidos grasos novo, potenciando el crecimiento celular, la viabilidad celular y la resistencia a cisplatino (Papaevangelou et al., 2018). Además, la elevada expresión de FASN en tejidos de cáncer de ovario se correlaciona con un pronóstico desfavorable y una supervivencia deficiente (Cai et al., 2015).

Las células cancerosas activan la degradación de los ácidos grasos como estrategia para satisfacer sus demandas metabólicas de energía, utilizando principalmente la vía de la β -oxidación (Ji et al., 2020). Una enzima de carácter clave y limitante en este proceso es la carnitina palmitoiltransferasa (CPT), encargada de catalizar la conversión de ácidos grasos de cadena larga a acilcarnitina. Se distinguen dos subtipos de CPT: CPT1, ubicada en la membrana externa de las

mitocondrias, facilita el transporte de ácidos grasos de cadena larga desde el citoplasma hacia las mitocondrias; mientras que CPT2, presente en la membrana interna de las mitocondrias, cumple con la función de catalizar la formación de acil-CoA para la β -oxidación y la generación de sustratos energéticos. La familia CPT1 se compone de tres isoformas distintas: CPT1A (tipo hepático), CPT1B (tipo muscular) y CPT1C (tipo cerebral) (Schreurs et al., 2010). En el contexto del cáncer de ovario, tanto la expresión elevada de la isoforma CPT1A como la sobreexpresión de esta enzima se correlacionó con una supervivencia deficiente de las pacientes (Shao et al., 2016).

Por otro lado, la absorción de lípidos desde el entorno exógeno es una vía esencial para la adquisición de ácidos grasos por parte de las células. La glicoproteína transmembrana CD36 desempeña un papel crucial en este proceso al facilitar el transporte de ácidos grasos libres (Glatz & Luiken, 2017) y colesterol hacia al interior de la célula. Además de su función en el transporte de lípidos, CD36 está implicada en la transmisión de señales intracelulares y ha sido relacionado con fenómenos como la presentación de antígenos, la inflamación y la angiogénesis, eventos asociados con la fisiopatología del cáncer (DeFilippis et al., 2012).

Esta glicoproteína también desempeña un papel destacado en la proliferación y metástasis de las células cancerosas (Zhao et al., 2017) y juega una función fundamental en la transición epitelial-mesenquimal (Nath et al., 2015). Investigaciones recientes han revelado una expresión elevada de CD36 en tejidos de cáncer de ovario, así como en tejidos metastásicos, evidenciando su participación en los procesos de metástasis y proliferación celular en el contexto del cáncer de ovario (Ji et al., 2020).

El metabolismo lipídico podría regularse mediante diversas estrategias, tales como la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, la potenciación de la β -oxidación para acelerar la degradación de ácidos grasos, la redirección de los ácidos grasos hacia el almacenamiento intracelular, la modulación de la liberación tardía de ácidos grasos almacenados, y la obstrucción de la ingesta de ácidos grasos (Pavlova & Thompson, 2016). Estas estrategias representan enfoques clave para la modulación

de las vías metabólicas relacionadas con los lípidos, ofreciendo potenciales puntos de intervención para el control terapéutico del metabolismo en el cáncer.

En el metabolismo lipídico de las células de cáncer de ovario, se observa una sobreexpresión de enzimas metabólicas, lo cual puede inducir alteraciones en el metabolismo de los lípidos al participar en procesos que afectan tanto la síntesis como la degradación de lípidos. Este fenómeno contribuye al suministro de materias primas y energía, favoreciendo así la continuación del desarrollo tumoral. Además, se ha documentado que, en las fases tempranas del cáncer de ovario, se registra un incremento en la absorción de lípidos, respaldando las elevadas demandas energéticas de las células cancerosas en crecimiento. Este aumento en la absorción lipídica se acompaña de alteraciones en los genes relacionados con el metabolismo lipídico, y se intensifica con la progresión de la enfermedad (Ji et al., 2020). Estos hallazgos subrayan la complejidad de las alteraciones metabólicas asociadas al cáncer de ovario, destacando la necesidad de comprender a fondo estas alteraciones para diseñar estrategias terapéuticas más efectivas en el abordaje de esta enfermedad.

Por lo tanto, se ha establecido una asociación entre las disfunciones del metabolismo lipídico y los mecanismos de resistencia presente en la mayoría de las células cancerosas frente al tratamiento. Estudios indican que al interrumpir el programa metabólico del cáncer, se podría lograr una mejora en los resultados clínicos de los pacientes (Pillai et al., 2019).

1.7. Inhibidores del metabolismo lipídico

En la actualidad, disponemos de diversas herramientas destinadas a investigar el metabolismo celular. Entre ellas, se incluyen inhibidores y activadores de distintas vías metabólicas, diseñados principalmente para reprimir la progresión del cáncer.

Etomoxir, un derivado del ácido orixano carboxílico, ejerce una inhibición irreversible sobre la enzima CPT1 (Abdel-aleem et al., 1994). Esta acción impide el

transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria y, consecuentemente, impide el catabolismo a través de la β -oxidación. Aunque se ha observado que el uso de etomoxir induce apoptosis, aún no se comprenden completamente los mecanismos subyacentes a la acción proapoptótica de esta droga. En este sentido, se ha propuesto que la inhibición de la β -oxidación ocasiona perturbaciones directas en las proteínas de la familia Bcl-2 (Samudio et al., 2010). Otros estudios indicaron que etomoxir conduce al agotamiento de ATP, al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o reducción del agotamiento del glutatión (Estan et al., 2014).

Orlistat, inicialmente desarrollado como un inhibidor de la lipasa pancreática para el tratamiento de la obesidad (Flavin et al., 2010), ha demostrado ser un inhibidor de la FASN con efectos antitumorales en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de ovario (Menendez & Lupu, 2007). Orlistat actúa como un inhibidor irreversible al formar un aducto covalente con la serina ubicada en el dominio tioesterasa de la enzima FASN (Flavin et al., 2010; Pemble et al., 2007). La inhibición de la actividad de FASN mediante orlistat ha demostrado reducir el crecimiento de tumores de próstata en xenoinjertos de ratón (Kridel et al., 2004), y a concentraciones altas, ha exhibido efectos de reducción de la proliferación y promoción de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de ovario (Yang et al., 2015).

2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El cáncer de ovario representa la neoplasia ginecológica maligna con la tasa de mortalidad más alta, dada a la detección en un estadio avanzado en el 75% de los casos, y la recidiva de la enfermedad en el 80% de los pacientes, a menudo asociada a una quimiorresistencia a las drogas antineoplásicas empleadas. Las células cancerosas reconfiguran sus rutas metabólicas para adaptarse a los desafíos ambientales, promoviendo así su supervivencia, proliferación y capacidad metastásica.

Esta reprogramación metabólica engloba una transición hacia la dependencia de la glucosa como principal fuente de energía, así como alteraciones en el metabolismo de los lípidos, incluyendo un incremento en la biosíntesis de ácidos grasos. Se ha establecido una relación entre esta reprogramación metabólica y el desarrollo de resistencia a fármacos antineoplásicos. Sin embargo, estudios preliminares han indicado que la inhibición de la glicólisis puede aumentar la resistencia a doxorrubicina, un potente agente citotóxico utilizado en pacientes con quimiorresistencia, que también puede verse afectado por los mecanismos de resistencia.

Por lo tanto, ¿Cuál es el efecto de la inhibición del metabolismo lipídico, específicamente de la β -oxidación y síntesis de ácidos grasos, en la sensibilidad a doxorrubicina en las células de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3?

3. HIPOTESIS

La inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de la β -oxidación aumentan la sensibilidad de doxorubicina en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la dependencia de la síntesis de ácidos grasos y β -oxidación mediante el uso de inhibidores específicos sobre la resistencia a doxorubicina en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

4.2. Objetivos generales

1. Analizar las características y diferencias del metabolismo lipídico entre las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante lipidómica y RT-qPCR.
2. Evaluar el efecto de los inhibidores orlistat y etomoxir sobre el metabolismo lipídico en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.
3. Evaluar la sensibilidad a doxorubicina en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Objetivo específico 1: Analizar las características y diferencias del metabolismo lipídico entre las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante lipidómica y RT-qPCR.

5.1.1. Cultivo de líneas celulares.

Se utilizaron las líneas celulares OVCAR-3 (ATCC HTB-161) y SK-OV-3 (ATCC HTB-77), ambas provenientes de adenocarcinoma de ovario humano. Las células fueron expandidas, cultivadas y mantenidas en medio RPMI-1640 (Corning) con glutamina suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 100 U/mL de la mezcla antibiótica de penicilina/estreptomicina en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y a 37°C.

5.1.2. Análisis de lipidómica por LC-MS.

5.1.2.1. Extracción de las muestras

Para la extracción de las muestras, se siguió un protocolo de extracción con solventes previamente establecido con modificaciones (Dettmer et al., 2011). Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 se sembraron en placas de 100 mm, considerando 5 réplicas biológicas, con una concentración de 8×10^6 células por cada réplica. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con agua estéril.

Para la extracción del lipidoma, se agregó a cada placa una mezcla de 2 mL de metilbutileter/metanol/agua (5:3:2) a cada placa, y las células fueron raspadas. El solvente con las células raspadas se guardaron en criovales. Las muestras se colocaron en nitrógeno líquido durante 1 minuto. A continuación, las células se lisaron utilizando el homogeneizador *Precellys Evolution* (Bertin Instrument) con dos ciclos de 90 segundos a 6000 rpm. Posteriormente, las células se centrifugaron a 13,000 x g a 4°C durante 15 minutos, y los sobrenadantes resultantes se transfirieron a nuevos tubos para la extracción líquido-líquido mediante la adición de

400 µL de agua y 400 µL de metilbutileter. Cada muestra se mezcló con el homogeneizador *Precellys Evolution* durante dos ciclos de 90 segundos a 4500 rpm. Tras la centrifugación a 13,000 x g a 4°C durante 15 minutos, las dos fases se separaron con una interfaz distintiva. Las fracciones hidrofílica (capa superior) e hidrofóbica (capa inferior) se transfirieron cuidadosamente a nuevos criovales y se dejaron secando en un centrífugo al vacío utilizando el Concentrador Centrífugo Refrigerado a 4°C. Los extractos secos se almacenaron a -80°C hasta la realización del análisis por LC-MS.

Antes del análisis, los extractos hidrofóbicos se homogeneizaron con 200 µL de metanol/IPA al 80% en frío utilizando *Precellys Evolution* y se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a insertos de 150 µL en viales ámbar de 1.5 mL y, con 50 µL de cada muestra, se prepararon los Controles de Calidad (QCs). Estos viales se colocaron en un auto-muestreador de cromatografía líquida mantenido a 4°C, siguiendo una secuencia aleatoria preestablecida que comenzó con tres muestras en blanco, incluyendo los QCs. Los QC se inyectaron entre las muestras para evaluar la robustez y repetibilidad del sistema instrumental.

5.1.2.2. Análisis por LC-MS

El análisis de la lipidómica se llevó a cabo utilizando un sistema UHPLC-DAD *Bruker Elute LC* acoplado a un espectrómetro Q-TOF *Compact* (Bruker, Bremen, Alemania). El sistema de control utilizado fue *Compass HyStar* (Bruker), y la adquisición de datos fue gestionada con el software *Bruker otofControl 4.1.402.322-7977-vc110 6.3.3.11*. El análisis de datos se realizó utilizando el software *Compass DataAnalysis 4.4.200* (Bruker) y *MetaboScape 3.0* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La columna cromatográfica utilizada fue una columna *Phenomenex Kintex® C18*, con dimensiones de 100 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 2.6 µm. La columna se mantuvo a una temperatura estable de 60°C durante todo el análisis.

La fase móvil utilizada estaba compuesta por dos solventes: el solvente A, correspondiente a una mezcla de acetonitrilo y agua en proporción de 60:40, que contenía un 0.1% de ácido fórmico y 10 mM de formiato de amonio; y el solvente B, una combinación de isopropanol y acetonitrilo en una proporción de 90:10, también con un 0.1% de ácido fórmico y 10 mM de formiato de amonio. La velocidad de flujo se fijó en 0.6 mL/min, y el volumen de inyección fue de 10 µL.

Para el análisis de espectrometría de masas (MS), el instrumento operó en modo de ionización positiva (ESI +4500 V) y en modo de ionización negativa (ESI -3500 V). La tasa de flujo de gas seco fue de 9 L/min, y la presión del nebulizador se mantuvo en 2 Bar. La temperatura se ajustó a 200°C, y la tensión capilar final se estableció en 500 V. Se empleó el modo Auto MS/MS con 2 iones precursores por ciclo. El rango de escaneo se configuró de 50 a 150 m/z, y el tiempo de escaneo fue de 0.2 segundos en modo centroide. Para la calibración interna, se utilizó formiato de sodio con un 10% de ácido fórmico y una concentración de 1 M, asegurando una precisión de masa inferior a 3 ppm.

5.1.2.3. Procesamiento de la información generada

La data se procesó utilizando MS-DIAL ver. 4.70. Este software transformó los datos crudos en una matriz de características (pares m/z-tiempo de retención (tR) e intensidad de pico normalizada) (archivo .txt). El flujo de trabajo incluyó la recalibración de masa, la alineación de tR, la extracción de características (pares m/z-tR), la administración de aductos, normalización de los controles de calidad (QCs), filtrado de blancos, importación de espectros MS/MS y generación del *Buckett Table*. La identificación de los metabolitos se logró comparando los espectros obtenidos con la base de datos *LipidBlast* (Dettmer et al., 2011), considerando únicamente la identificación mediante ms/ms en el análisis.

Los datos normalizados por QC se procesaron en el software *MetaboAnalyst* 5.0 y los datos se filtraron utilizando la desviación estándar (SD). Se realizó un segundo filtrado de datos utilizando Pareto. Luego, se utilizó el análisis de fold change para visualizar las diferencias por categorías de lípidos. Se empleó un

modelo no supervisado, aplicando el Análisis de Componentes Principales (PCA) para revelar los patrones de agrupación en los datos (Worley & Powers, 2013). Luego, se aplicó el Análisis Discriminante por Proyección Ortogonal a Estructuras Latentes (OPLS-DA) al conjunto de datos para seleccionar las características significativas de cada grupo mediante un gráfico S. El método de regresión utilizó datos de LC-MS como el X, y se formó un vector binario Y con 0 para la clase OVCAR-3 y 1 para la clase SK-OV-3.

5.1.3. Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron sembradas en placas de 12 pocillos en concentración de 2×10^5 células por pocillo durante 24 horas, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente en el apartado “Cultivo de líneas celulares”. Se eliminó el medio y se procedió a lisar las células con 500 μ L del reactivo TRIzol (Invitrogen) para la extracción del ARN total utilizando el kit *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de RT-qPCR se realizó en un solo paso, utilizando el reactivo TaqPart, CG de un paso (ThermoFisher) para sondas *TaqMan* y el equipo *Applied Biosystem 7500 FAST Real Time PCR System* con el protocolo de amplificación: 50°C por 15 minutos, 95°C por 2 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y alineamiento/extensión a 60°C por 30 segundos. Las sondas *TaqMan* prediseñadas para FASN (Hs01005622_m1), CD36 (Hs00169627_m1), CPT1A (Hs00912671_m1) y CPT1B (Hs00189258_m1) y *RNAseP* fueron adquiridas de *Applied Biosystems* (Thermo Fisher Scientific, Inc.). La cuantificación relativa se normalizó a la expresión de *RNAse P* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Cada muestra se analizará por triplicado.

5.2. Objetivo específico 2: Evaluar el efecto de los inhibidores orlistat y etomoxir sobre el metabolismo lipídico en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

5.2.1. Determinación del efecto citotóxico de orlistat y etomoxir sobre las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

Se sembraron 3×10^4 células por pocillo de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en una placa de 96 pocillos y se mantuvieron en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, las células fueron tratadas con concentraciones incrementales de orlistat (10, 20, 30, 40, 50, 80 y 100 µM) y de etomoxir (10, 20, 50, 80, 100, 150 y 200 µM), realizando cada concentración en triplicado. La placa fue incubada nuevamente a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante 24 horas.

Para evaluar la actividad citotóxica de orlistat y etomoxir en las células OVCAR-3 y SK-OV-3, se empleó el ensayo de Sulforodamina B. Esta técnica permite estimar indirectamente el número de células al teñir el contenido de proteínas celulares con Sulforodamina B (Vichai & Kirtikara, 2006). Para ello, se retiró el medio de cultivo de la placa y se añadieron 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v para fijar las células al pocillo, incubándolas a 4°C durante 1 hora. Concluida la incubación, se lavó la placa cinco veces con agua destilada y se permitió que se secase a temperatura ambiente.

Luego, se adicionó 100 µL de Sulforodamina B al 0.057% p/v, previamente preparada en ácido acético al 1% v/v, para teñir las células fijadas. Este proceso se llevó a cabo durante 30 minutos. Posteriormente, la placa fue lavada cinco veces con ácido acético al 1% v/v y se dejó secar a temperatura ambiente. Acto seguido, se agregaron 200 µL de Tris base 10 mM pH 10.5, manteniendo la placa en agitación durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia utilizando el lector de multi microplacas *Synergy 2 (BioTek Instruments)* a una longitud de onda de 510 nm.

5.2.2. Determinación del efecto de orlistat y etomoxir sobre la proliferación celular en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

Se sembraron 5×10^4 células por pocillo de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en 5 placas de 96 pocillos y se mantuvieron en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a trabajar bajo tres condiciones experimentales: células sin tratamiento (utilizadas como control); células tratadas con concentraciones de 30 y 80 μM de orlistat; y células tratadas con concentraciones de 100 y 200 μM de etomoxir. Cada condición experimental se replicó tres veces. Las placas se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante el tratamiento de Etomoxir y Orlistat. Después del primer día de tratamiento, se añadieron 100 μL de TCA al 10% a una de las 5 placas, con el fin de determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de Sulforodamina B. Este procedimiento se repitió cada 24 horas durante un total de 4 días.

Utilizando las absorbancias obtenidas como resultado, se procedió a interpolar el número de células por pocillo de cada línea celular utilizando las ecuaciones derivadas de la curva de densidad celular de las líneas celulares OVCAR-3 (Figura 2-1) y SK-OV-3 (Figura 2-2).

OVCAR-3

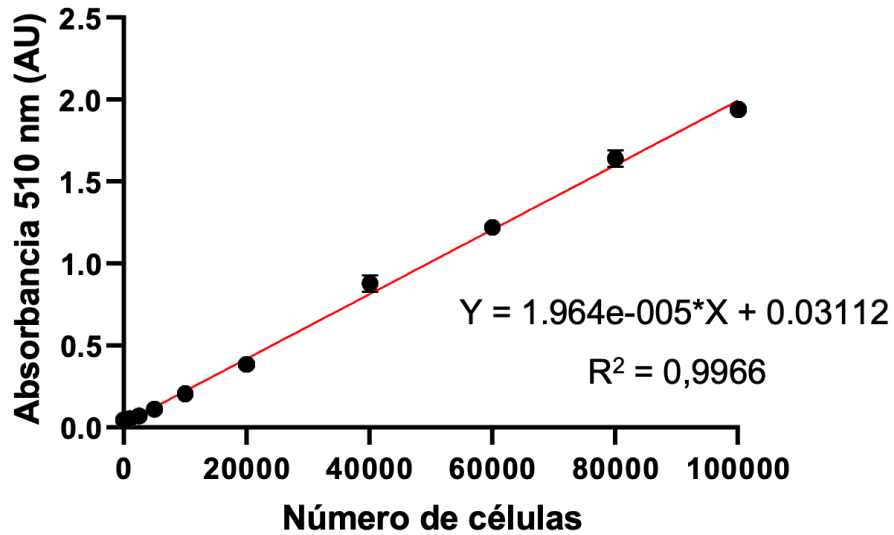


Figura 2-1. Curva de densidad celular OVCAR-3. Las células OVCAR-3 se sembraron en incrementos progresivos durante un período de 24 horas con el fin de establecer la curva de crecimiento celular. Se utilizó la técnica de Sulforofamina B, y los puntos negros en el gráfico representan cada valor en unidades de absorbancia (U.A.) a 510 nm. La línea roja traza la relación lineal entre el número de células y las unidades de absorbancia. La ecuación de la recta fue generada por el *Software Graph Prism 9.0* mediante regresión lineal con coeficiente de correlación. Las barras de error muestran la desviación estándar. Fuente: (Toledo-Oñate, 2023)

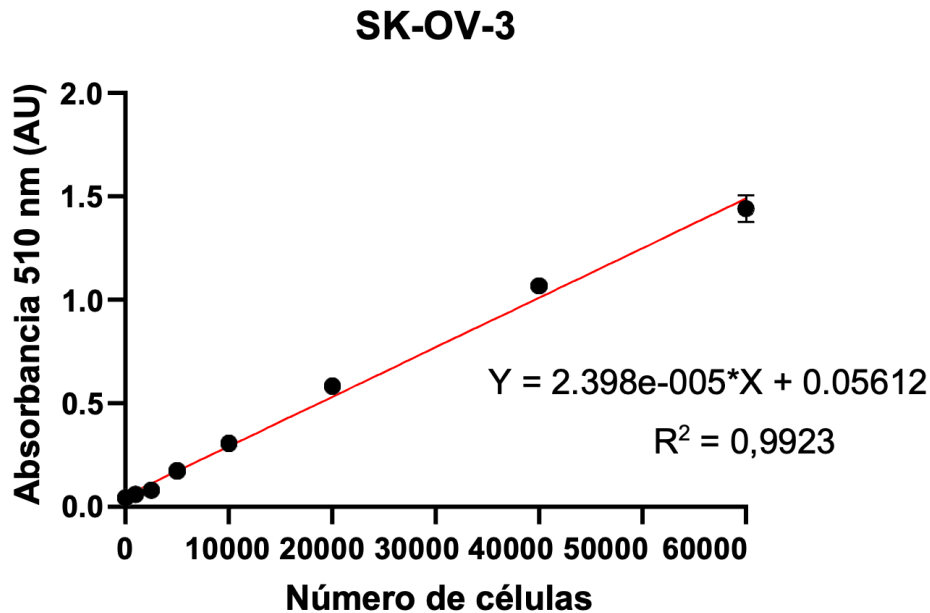


Figura 2-2. Curva de densidad celular de SK-OV-3. Las células SK-OV-3 se sembraron en incrementos progresivos durante un período de 24 horas con el fin de establecer la curva de crecimiento celular. Se utilizó la técnica de Sulforofamina B, y los puntos negros en el gráfico representan cada valor en unidades de absorbancia (U.A.) a 510 nm. La línea roja traza la relación lineal entre el número de células y las unidades de absorbancia. La ecuación de la recta fue generada por el *Software Graph Prism 9.0* mediante regresión lineal con coeficiente de correlación. Las barras de error muestran la desviación estándar. Fuente: (Toledo-Oñate, 2023)

5.2.3. Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica y glicolítica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.

Ambas líneas celulares se sembraron en placas de 12 pocillos con una concentración de 2×10^5 células por pocillo, y se incubaron por 24 horas bajo las mismas condiciones detalladas en el apartado “Cultivo de líneas celulares”. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo medio RPMI suplementado que contenía $30 \mu\text{M}$ de orlistat para las células OVCAR-3 y $80 \mu\text{M}$ de orlistat para las células SK-OV-3, y $200 \mu\text{M}$ de etomoxir para ambas líneas celulares,

administrándose cada droga por separado y permitiendo que actuara durante 24 y 48 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

Se extrajo el ARN total de las células tratadas con orlistat y etomoxir utilizando 500 µL del reactivo TRIzol (Invitrogen) y el kit *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción RT-qPCR se llevó a cabo según el mismo protocolo descrito en el apartado “Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3”, utilizando las mismas sondas TaqMan mencionadas en ese apartado. Para medir los genes asociados a la vía glicolítica, se utilizaron sondas TaqMan prediseñadas para GLUT1 (Hs00892681_m1), HK2 (Hs00606086_m1), LDHA (Hs01378790_g1), PKM (Hs00987255_m1), sondas que también fueron adquiridas de *Applied Biosystems* (Thermo Fisher Scientific, Inc.). La cuantificación relativa se normalizó a la expresión de *RNAse P* utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$; y cada muestra se replicó por triplicado.

5.3. Objetivo específico 3: Evaluar la sensibilidad a doxorrubicina en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.

5.3.1. Evaluación de la sensibilidad de DOX en líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3.

En una placa de 96 pocillos, se sembraron 1×10^4 células por pocillo de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3, y se incubaron en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de DOX durante 24 horas: 0.0001; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 y 100 µM; donde cada condición se replicó por triplicado. Para la manipulación de la DOX, se utilizaron elementos de protección personal según lo descrito en el ANEXO: “MEDIDAS BÁSICAS DE SEGURIDAD AL TRABAJAR CON SUSTANCIAS PELIGROSAS”.

Para la determinación de la viabilidad celular bajo los efectos de la DOX en ambas líneas celulares, se empleó el ensayo de Sulforodamina B. Posteriormente, los resultados obtenidos fueron tabulados y analizados mediante la herramienta *GR calculator*, una calculadora en línea (<http://www.grcalculator.org/grcalculator/>) que proporciona valores relacionados con los efectos de un tratamiento sobre el crecimiento de la población celular (Hafner et al., 2016). Finalmente, se generaron gráficos de las correspondientes curvas de tasa de crecimiento (GR, *Growth Rate*) con los valores obtenidos.

5.3.2. Evaluación de la sensibilidad de DOX en líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.

Para evaluar el efecto de DOX en combinación con el tratamiento de orlistat en las células OVCAR-3 y SK-OV-3, ambas líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por RPMI suplementado con una concentración de 30 μM de orlistat para células OVCAR-3 y 80 μM para células SK-OV-3, permitiendo que la droga actuara por 24 horas a 37°C con un 5% de CO_2 .

Luego, se prepararon diluciones seriadas de DOX en medio RPMI suplementado para obtener concentraciones crecientes: 0.0001; 0.001; 0.01; 0.1; 1; 10 y 100 μM ; todas ellas también contenían 30 y 80 μM de Etomoxir. Las células fueron expuestas a la combinación de DOX y Orlistat durante otras 24 horas bajo las mismas condiciones previamente descritas. Cada condición se replicó por triplicado.

Finalmente, se llevó a cabo el ensayo de Sulforodamina B y se obtuvieron los valores de GR utilizando *GR calculator* (<http://www.grcalculator.org/grcalculator/>) representando la curva GR correspondiente.

En cuanto a etomoxir, se siguió el mismo procedimiento mencionado previamente, utilizando 200 μM para las células OVCAR-3 y SK-OV-3.

5.4. Análisis estadístico

Los datos fueron procesados utilizando el *Software GraphPad Prism* versión 9.0 para Mac Os Sonoma. El análisis de las diferencias estadísticas entre dos muestras se llevó a cabo mediante la prueba de medias (*t de student*) para variables paramétricas y la prueba Mann-Whitney para variables no paramétricas, según correspondiera. Para los análisis que involucraban más de dos muestras, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una cola, según fuera lo apropiado. Los resultados se presentaron como el promedio de las mediciones y se consideró un valor de $p < 0.05$ como indicativo de significancia estadística.

6. RESULTADOS

6.1. Analizar las características y diferencias del metabolismo lipídico entre las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante lipidómica y RT-qPCR.

6.1.1. Análisis de lipidómica por LC-MS

Dada la estrecha relación entre el metabolismo lipídico y la resistencia a drogas antineoplásicas, y tomando en consideración la evidencia respaldada por el análisis metabolómico, la cual revela perfiles metabólicos diferentes en las células OVCAR-3 y SK-OV-3, con una notable regulación al alza de metabolitos relacionados al metabolismo de los ácidos grasos (Alarcon-Zapata et al., 2023), se decidió abordar el estudio del metabolismo lipídico mediante el análisis lipidómico por LC-MS.

Se utilizó el Análisis de Componentes Principales (PCA) (Figura 6-1), método de extracción de características no supervisado ampliamente usado, la cual permite procesar un extenso conjunto de datos y reducir su dimensionalidad con una pérdida mínima de información (Jolliffe, 1995). Los gráficos de puntuación que representan la distribución de las células a través de los tres primeros componentes principales (PCs), revelaron una clara separación entre las células OVCAR-3 y SK-OV-3 a lo largo de PC1. Esto representó el 92,0% de la varianza total de los valores en la ESI+ y el 88,6% en la ESI- (Figura 6-1A y B).

Además, se identificaron las características relevantes para discriminar entre las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante el modelo OPLS-DA. Como se predijo a partir del análisis PCA, las puntuaciones representadas en el modelo OPLS-DA presentaron una separación total entre ambas líneas celulares y modos de adquisición (Figura 6-1C y D). Los S-plots derivados de los modelos OPLS-DA destacaron los lípidos más relevantes que distinguen entre las células OVCAR-3 y las SK-OV-3. La Figura 6-1E y 6-1F presentan los S-plots correspondientes a los modelos OPLS-DA generados a partir de ambos modos de ionización. Las variables ubicadas en el lado derecho se correlacionan con las células SK-OV-3, mientras

que aquellas en el lado izquierdo se vinculan con las células OVCAR-3, indicando una regulación al alza de los lípidos que representan en estas células.

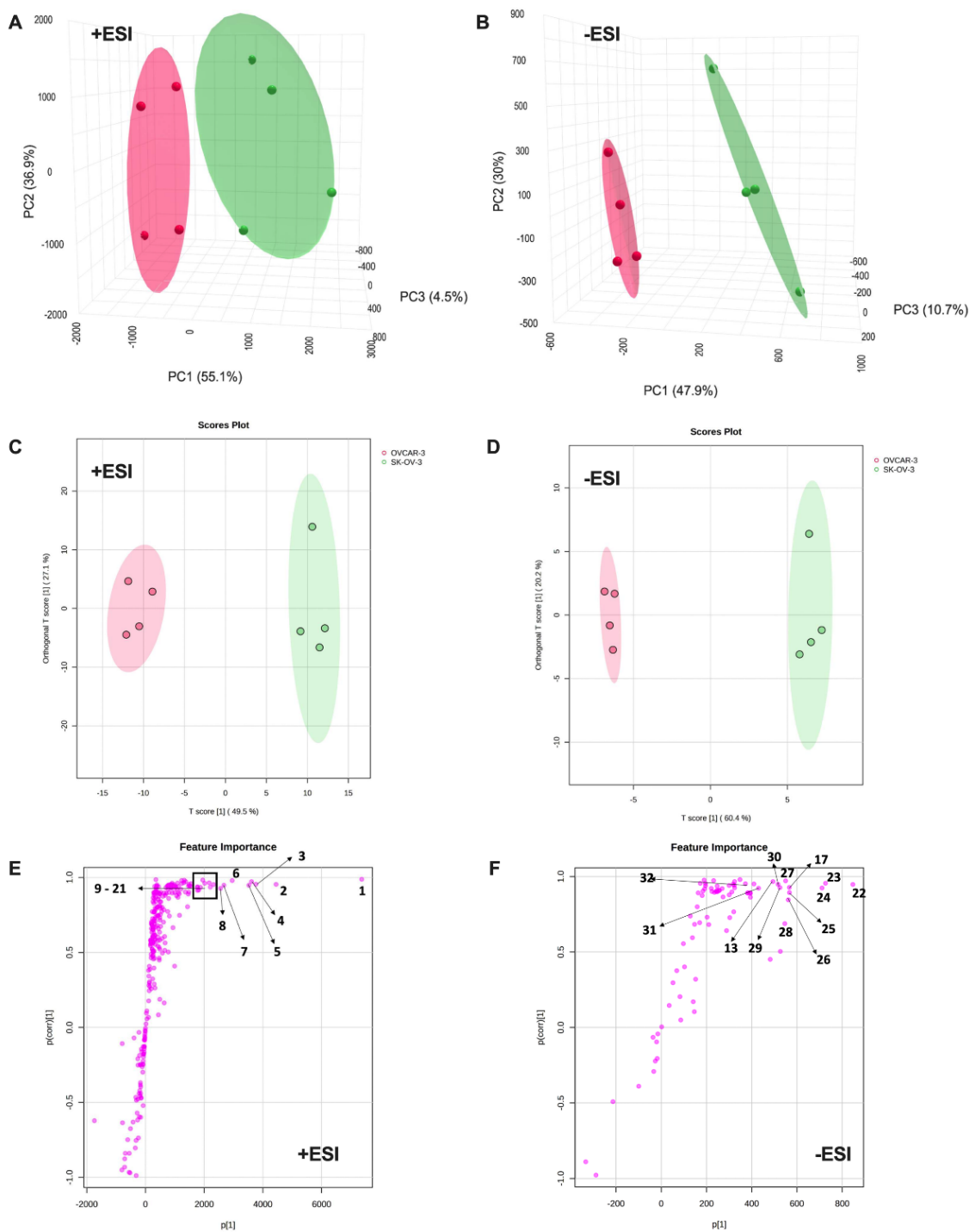


Figura 6-1. Análisis estadístico del conjunto de datos LC-MS adquiridos en los modos de adquisición ESI+ y ESI- para la comparación del lipidomas entre las

células OVCAR-3 y SK-OV-3. Los gráficos de puntuación PCA basados en el conjunto de datos LC-MS y muestran patrones de agrupamiento entre los primeros tres componentes principales (PC1 – PC3). Los círculos rojos representan las muestras de las células OVCAR-3 y los círculos verdes de las células SK-OV-3 con su intervalo de confianza del 95%. En los gráficos de puntuación de modelos OLPS-DA también muestra la separación de las células OVCAR-3 en círculos rojos y SK-OV-3 en círculos verdes con intervalos de confianza del 95%. El componente predictivo Y (T score [1]) mostrado en el eje X representa la variación en el conjunto de datos correlacionada con la separación de clases. El componente ortogonal mostrado en el eje Y se refiere a la variación no correlacionada para la distinción de clases. Los gráficos S visualizan la influencia de las características en el componente predictivo del modelo, combinando los perfiles de carga de covarianza ($p[1]$) y correlación ($p(\text{corr})[1]$). La covarianza representada en el eje X visualiza la contribución al componente predictivo, mientras que la correlación en el eje Y abarca entre ± 1 , pues la confiabilidad tiene un mínimo teórico de -1 y un máximo de +1 para predecir la clase 1 (SK-OV-3); de esta manera, las variables visualizadas hacia el lado derecho contribuyen a la separación de clases mediante una alta correlación con SK-OV-3 [$Y=1$] y lo opuesto con OVCAR-3. Los metabolitos significativos se seleccionaron en función de la alta varianza combinada ($> |1500|$ para ESI+ y $> |400|$ para ESI-) y alta correlación ($> |0.6|$). A) Gráfico PCA para modo de ionización ESI+. B) Gráfico PCA para modo de ionización ESI-. C) Gráfico OLPS-DA para modo de ionización ESI+. D) Gráfico OLPS-DA para modo de ionización ESI-. E) Gráfico S para modo de ionización ESI+. F) Gráfico S para modo de ionización ESI-.

También se llevó a cabo un análisis de *fold change* para evaluar las diferencias en los perfiles lipídicos entre ambas líneas celulares, utilizando exclusivamente el modo de ionización LC-MS con la identificación de lípidos a través de la plataforma *LipidBlast*. Los lípidos se agruparon según sus características, revelando que el 4.8% eran ácidos grasos, el 7.8% eran lípidos esteróicos, el 10.2% eran esfingolípidos, el 22.8% eran glicerolípidos y el 55.5% eran glicerofosfolípidos, siendo este último grupo más prominentemente representado en el análisis (Figura 6-2A). Además, en ambos modos de ionización, se observó una sobreexpresión en

todas las categorías de lípidos en las células SK-OV-3, destacando así el papel fundamental del metabolismo lipídico en estas células (Figura 6-2B y C).

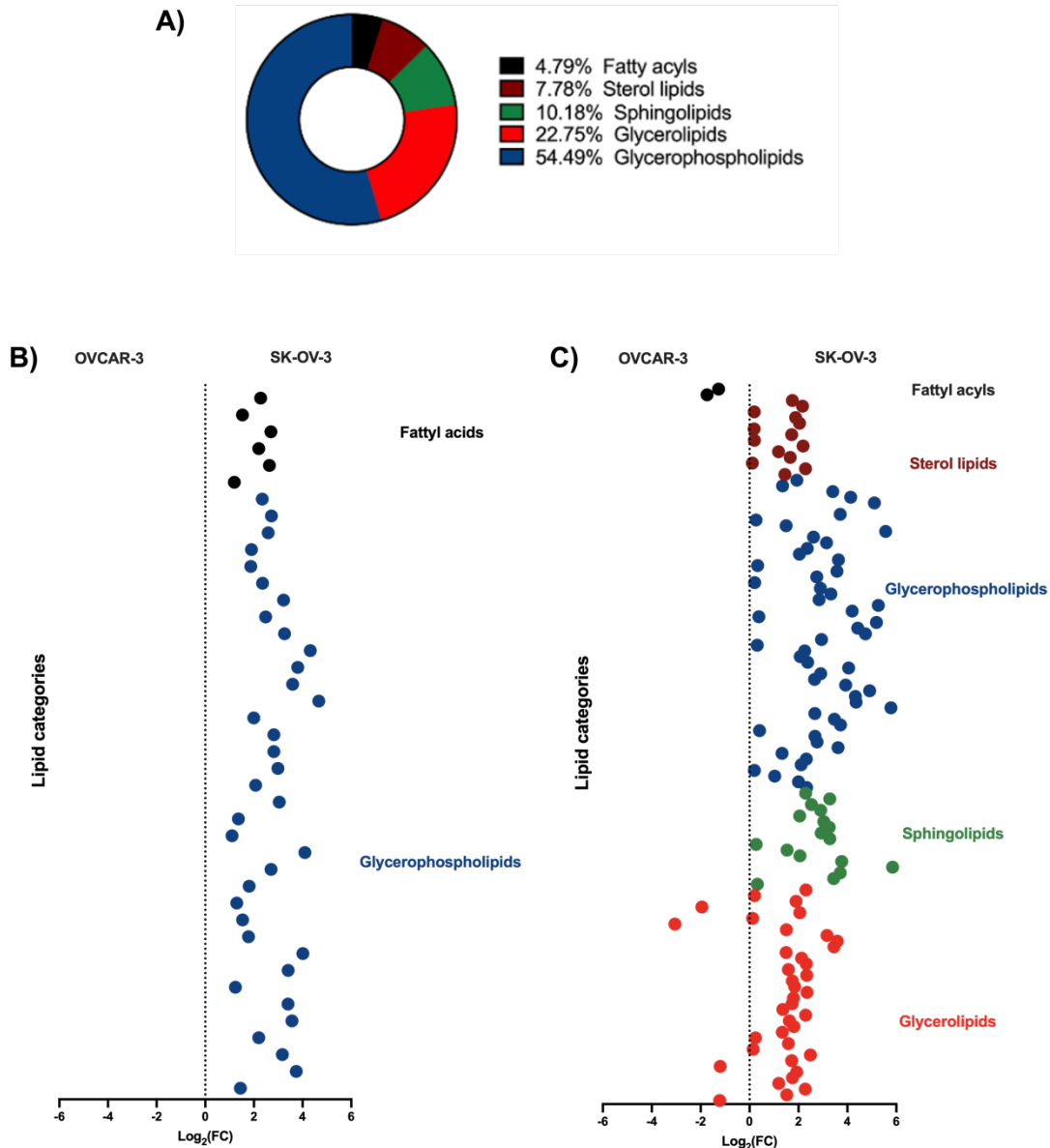


Figura 6-2. Diferencias de lípidos por comparación de grupos entre células OVCAR-3 y SK-OV-3 obtenidas mediante el análisis de *fold change*. Los grupos de lípidos están representados por colores: acilos grasos con negro, lípidos esteroleos con café, esfingolípidos con verde, glicerolípidos con rojo y glicerofosfolípidos con azul. A) Porcentaje de los grupos de lípidos identificados en

ambas líneas celulares. B) Análisis del *fold change* de los grupos de lípidos obtenidos por ESI+: en el lado izquierdo, los puntos representan los lípidos regulados positivamente en las células OVCAR-3 y en el lado derecho, los puntos representan los lípidos regulados positivamente en células SK-OV-3. C) Análisis del *fold change* de los grupos de lípidos obtenidos por ESI-: en el lado izquierdo, los puntos representan los lípidos regulados positivamente en las células OVCAR-3 y en el lado derecho, los puntos representan los lípidos regulados positivamente en células SK-OV-3.

Se identificaron un total de 21 lípidos de relevancia significativa en el modo de ionización ESI+ y 14 en el modo ESI-. Sin embargo, no se observaron lípidos con una regulación al alza en las células OVCAR-3. Como se evidencia en los análisis de *fold change*, este hallazgo indica un aumento completo en el metabolismo de los lípidos en las células SK-OV-3 y una supresión en las células OVCAR-3. Los detalles de los lípidos significativos se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Identificación de los lípidos significativos categorizados por la ontología de subclases de lípidos en SK-OV-3 obtenida mediante el análisis lipidómico.

n	Rt (min)	Identificación del lípido	Ontología	Fórmula molecular	Prom. m/z	Ref. m/z	Aducto	InChi-Key
1	9.49	PC 34:1 PC 16:0_18:1	PC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	760.578 2	760.585 1	[M+H] ⁺	WTJKGGKOPKCX LL-UHFFFAOYSA-N
2	8.85	PC 32:1 PC 16:0_16:1	PC	C ₄₀ H ₇₈ NO ₈ P	732,548 8	732,553 8	[M+H] ⁺	QIBZFHFLFHCUIO T-UHFFFAOYSA-N
3	9.86	PC 34:1	PC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	760,578 1	760,585 1	[M+H] ⁺	WTJKGGKOPKCX LL-UHFFFAOYSA-N
4	8.61	SM 34:2;O2 SM 18:2;O2/16:0	SM+O	C ₃₉ H ₇₉ N ₂ O ₆ P	703,567 3	703.574 9	[M+H] ⁺	RWKUXQNLWDTSL LO-UHFFFAOYSA-N
5	8.72	PC 30:0 PC 14:0_16:0	PC	C ₃₈ H ₇₆ NO ₈ P	706.532 4	706.538 1	[M+H] ⁺	RFVQFQWQKPSO ED-UHFFFAOYSA-N
6	9.44	PC 32:0 PC 16:0_16:0	PC	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	734.565 8	734.569 4	[M+H] ⁺	KILNVBDSWZSGL L-UHFFFAOYSA-N
7	8.99	PE P-36:4 PE P-16:0_20	EtherPE(P)	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	724.523 4	724.527 6	[M+H] ⁺	YITZQGLIICATLN UHFFFAOYSA-N
8	10.44	PC O-34:1 PC O-16:1_18	EtherPC	C ₄₂ H ₈₄ NO ₇ P	746.598 1	746.605 8	[M+H] ⁺	SVSLBZPEDBYFG G-UHFFFAOYSA-N
9	10.59	PC O-34:1 PC O-16:0_18:1	EtherPC	C ₄₂ H ₈₄ NO ₇ P	746.601 9	746.605 8	[M+H] ⁺	SIEDNCDNGMIKS T-UHFFFAOYSA-N
10	8.76	PE P-38:6 PE P-16:0_22:6	EtherPE(P)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	748.523 6	748.527 6	[M+H] ⁺	WVGALBKSWOUI EZ-UHFFFAOYSA-N
11	10.59	PC 36:1 PC 18:0_18:1	PC	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	788.609 3	788.616 4	[M+H] ⁺	ATHVAWF AEPLPP Q-UHFFFAOYSA-N

12	9.03	PE P-38:5 PE P-16:0_22:5	EtherPE(P)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	750.537 7	724.527 6	[M+H] ⁺	GZUZURLIXRQSD E-UHFFFAOYSA- N
13	9.31	PE 38:4 PE 18:0_20:4	PE	C ₄₃ H ₇₈ NO ₈ P	768.555 9	768.553 8	[M+H] ⁺ [M+H] ⁻	YEAZLUVAZKVR O-UHFFFAOYSA- N
14	8.74	PC 36:4 PC 16:0_20:4	PC	C ₄₄ H ₈₀ NO ₈ P	782.563 5	782.569 4	[M+H] ⁺	JAVWFBAZSHH AD- UHFFFAOYSA-N
15	9.74	PE P-34:1 PE P-16:0_18:1	EtherPE(P)	C ₃₉ H ₇₆ NO ₇ P	702.539 8	702.543 2	[M+H] ⁺	ZVYJAAMWXAT NY-UHFFFAOYSA- N
16	11.04	SM 42:2;O2 SM 18:1;O2/24:1	SM+O	C ₄₇ H ₉₃ N ₂ O ₆ P	813.677 3	813.684 4	[M+H] ⁺	WKZHECFHXLTO LJ-UHFFFAOYSA- N
17	10.25	PC O-34:2 PC O-16:1_18:1	EtherPC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₇ P	744.584 3	744.590 2	[M+H] ⁺ [M+H] ⁻	WDQJCKHLEYAE TE-UHFFFAOYSA- N
18	9.15	PC 36:3	PC	C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P	782.563 5	782.569 4	[M+H] ⁺	GDWULUGDXGHJ IJ-UHFFFAOYSA- N
19	8.65	PE 38:5 PE 18:1_20:4	PE	C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P	766.532 5	766.538 1	[M+H] ⁺	ZYMZKMQPPJPQ HY-UHFFFAOYSA- N
20	8.81	SM 34:0;O2	SM+O	C ₃₉ H ₈₁ N ₂ O ₆ P	705.584 9	705.590 5	[M+H] ⁺	JIOJUELCHJZSCJ -UHFFFAOYSA-N
21	9.72	PE P-38:4 PE P-18:0_20:4	EtherPE(P)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	752.554 1	752.558 9	[M+H] ⁺	ZTZQZGHJLWFLF Q-UHFFFAOYSA- N
22	9.52	RIKEN N-VS1 ID-6109 from Mouse_Plasma_ApoEKO_N_F1DHA	-	-	804.574 6	804.556 9	[M+H] ⁻	-
23	9.00	PE O-36:5 PE O-16:1_20:4	EtherPE	C ₄₁ H ₇₄ NO ₇ P	722.511 8	722.513 0	[M+H] ⁻	YITZQGLIICATLN- UHFFFAOYSA-N
24	1.50	Unknown	-	-	243.062 9	-	[M+H] ⁻	-
25	7.85	PI 38:4 PI 18:0_20:4	PI	C ₄₇ H ₈₃ O ₁₃ P	885.549 1	885.549 9	[M+H] ⁻	OJESNYFIPWSOP O-UHFFFAOYSA- N
26	5.28	FA 20:4	FA	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	303.250 2	303.233 0	[M+H] ⁻	HQPCSDADVLFH HO- UHFFFAOYSA-N
27	8.77	PE O-38:7 PE O-16:1_22:6	EtherPE	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	746.510 6	746.130	[M+H] ⁻	WVGALBKSWOUI EZ-UHFFFAOYSA- N
28	6.79	FA 18:0	FA	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283.261 7	283.264 3	[M+H] ⁻	QIQXTHQIDYTFR H-UHFFFAOYSA- N
29	1.48	Unknown	-	-	481.160 2	-	[M+H] ⁻	-
30	9.05	PE O-38:6 PE O-16:1_22:5	EtherPE	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	748.526 9	748.528 7	[M+H] ⁻	GZUZURLIXRQSD E-UHFFFAOYSA- N
31	1.49	Unknown	-	-	481.160 2	-	[M+H] ⁻	-
32	9.74	PE O-38:5 PE O-18:1_20:4	EtherPE	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	750.543 3	750.544 3	[M+H] ⁻	ZTZQZGHJLWFLF Q-UHFFFAOYSA- N

6.1.2. Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

Se realizó el análisis de la expresión basal de 4 enzimas vinculadas a las vías del metabolismo lipídico en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3: CD36, responsable de la captación de lípidos provenientes del entorno celular; FASN, proteína implicada en la síntesis de ácidos grasos; y CPT1A y CPT1B, ambas isoformas asociadas con la β -oxidación. Al comparar ambas líneas celulares, se evidenció que existe un aumento en la expresión de ARNm de FASN en las células OVCAR-3, mientras que CD36 se encuentra aumentado en las células SK-OV-3. Por otro lado, el nivel de ARNm de CPT1A y CPT1B permanecieron constante tanto en las células OVCAR-3 como en las células SK-OV-3 (Figura 6-3).

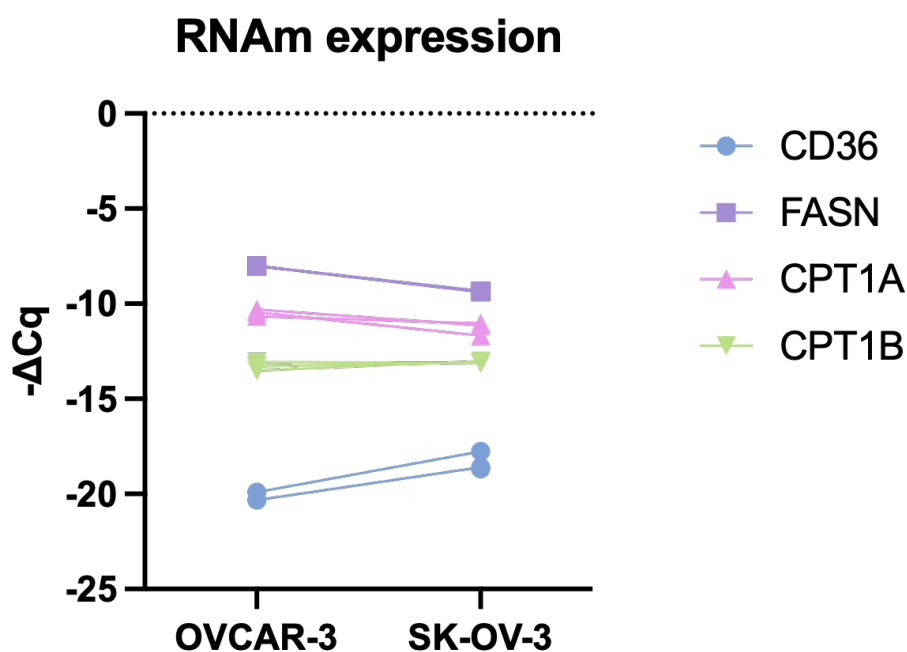


Figura 6-3. Niveles de expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en OVCAR-3 y SK-OV-3. La expresión de los genes fueron normalizados a RNase P y expresados como valores $-\Delta Cq$. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; ***** <0.0001)

6.2. Evaluar el efecto de los inhibidores orlistat y etomoxir sobre el metabolismo lipídico en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3.

6.2.1. Análisis del efecto citotóxico de orlistat y etomoxir en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3, y su impacto en la proliferación celular.

En primer lugar, se definieron las condiciones experimentales para el análisis de los cambios metabólicos inducidos por los inhibidores del metabolismo lipídico, orlistat y etomoxir, en las líneas celulares de cáncer de ovario, OVCAR-3 y SK-OV-3. Para ello, se investigó el efecto de orlistat y etomoxir a concentraciones crecientes durante un período de 24 horas.

En las células OVCAR-3, se observaron efectos citotóxicos de orlistat a partir de la concentración de 40 μM , la cual disminuyó la viabilidad celular al 85%. Sin embargo, se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas a las concentraciones de 50, 80 y 100 μM , donde la viabilidad celular experimentó reducciones al 80%, 83% y 56%, respectivamente (Figura 6-4A). En cambio, en las células SK-OV-3, orlistat generó un efecto citotóxico únicamente a la concentración de 100 μM , resultando en una disminución de la viabilidad celular al 70% (Figura 6-4B).

Por lo tanto, se consideró trabajar con la concentración de 30 μM para las células OVCAR-3, y para las células SK-OV-3, se consideraron dos concentraciones de trabajo: 30 y 80 μM .

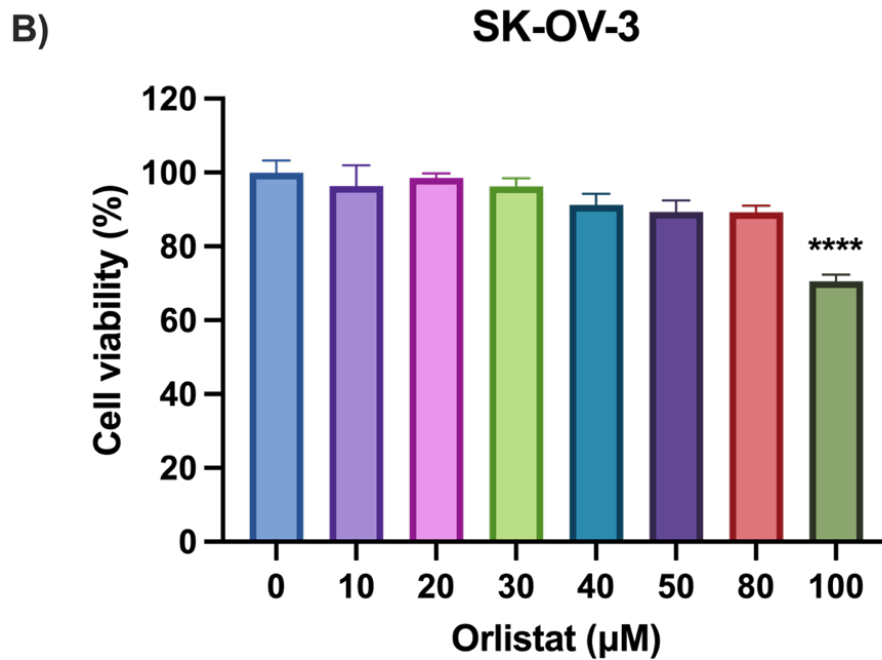
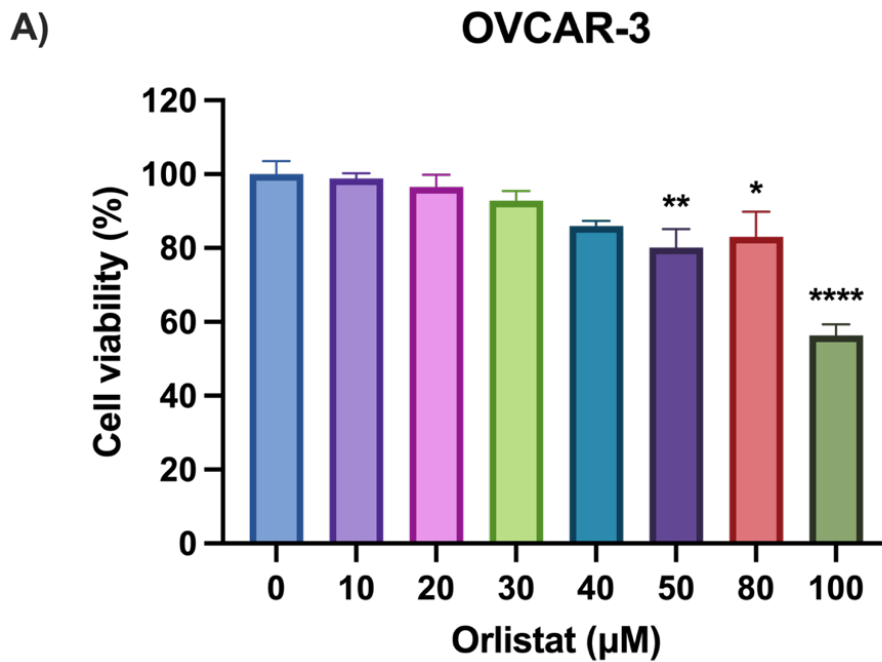


Figura 6-4. Viabilidad celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 frente al tratamiento con orlistat. Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron expuestas a diferentes concentraciones de orlistat. Las barras azules representan al control, células sin tratamiento, mientras que las barras de colores representan a las distintas

concentraciones de orlistat utilizadas. A) Células OVCAR-3 tratadas con orlistat por 24 horas. B) Células SK-OV-3 tratadas con Orlistat por 24 horas. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; ***** <0.0001)

En condiciones fisiológicas, las células obtienen una proporción significativa de su energía mediante la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria, junto con la síntesis de ácidos grasos, proceso que contribuye al suministro de lípidos esenciales para el crecimiento celular. La inhibición de estos procesos puede comprometer la capacidad de las células cancerosas para generar la energía necesaria para su proliferación celular acelerada. Es por esto que se decidió estudiar el impacto de Orlistat y Etomoxir en la proliferación celular de las líneas de cáncer de ovario a lo largo del tiempo.

Para evaluar la proliferación celular, el experimento se inició utilizando 5×10^3 células por pocillo para ambas líneas celulares. En el caso de las células OVCAR-3 sin tratamiento (grupo control), se evidenció un crecimiento con tendencia lineal desde el día 1 hasta el día 3. Al tercer día, se registró un máximo de confluencia de aproximadamente 4×10^4 células por pocillo ya que al cuarto y quinto día de incubación, hubo una disminución en el número de células (Figura 6-5A y B). En contraste, las células SK-OV-3 no tratadas (control) experimentaron un crecimiento lineal entre los días 1 y 4 de incubación, y se manifestó el mismo fenómeno en el cuarto día observado en las células OVCAR-3, alcanzando también la confluencia con 5×10^4 células por pocillo (Figura 6-5C y D). Para el estudio de la proliferación celular bajo el tratamiento de orlistat, las células OVCAR-3 fueron tratadas únicamente a una concentración de $30 \mu\text{M}$, mientras que para las células SK-OV-3 se emplearon dos concentraciones, 30 y $80 \mu\text{M}$. En el caso de las células OVCAR-3, se observó que la inhibición de la enzima FASN mediante el uso de Orlistat resultó en la detención de la proliferación celular desde el día 1, el cual se mantuvo durante los 5 días de tratamiento (Figura 6-5A). Por su parte, en las células SK-OV-3, el tratamiento con $30 \mu\text{M}$ de Orlistat indujo la inhibición de la proliferación celular a partir del segundo día de tratamiento (Figura 6-5B). El tratamiento con 80

μM en las células SK-OV-3 también condujo a la detención de la proliferación celular, iniciándose este efecto desde el primer día de tratamiento, demostrando que el efecto de orlistat es dependiente de la dosis (Figura 6-5C).

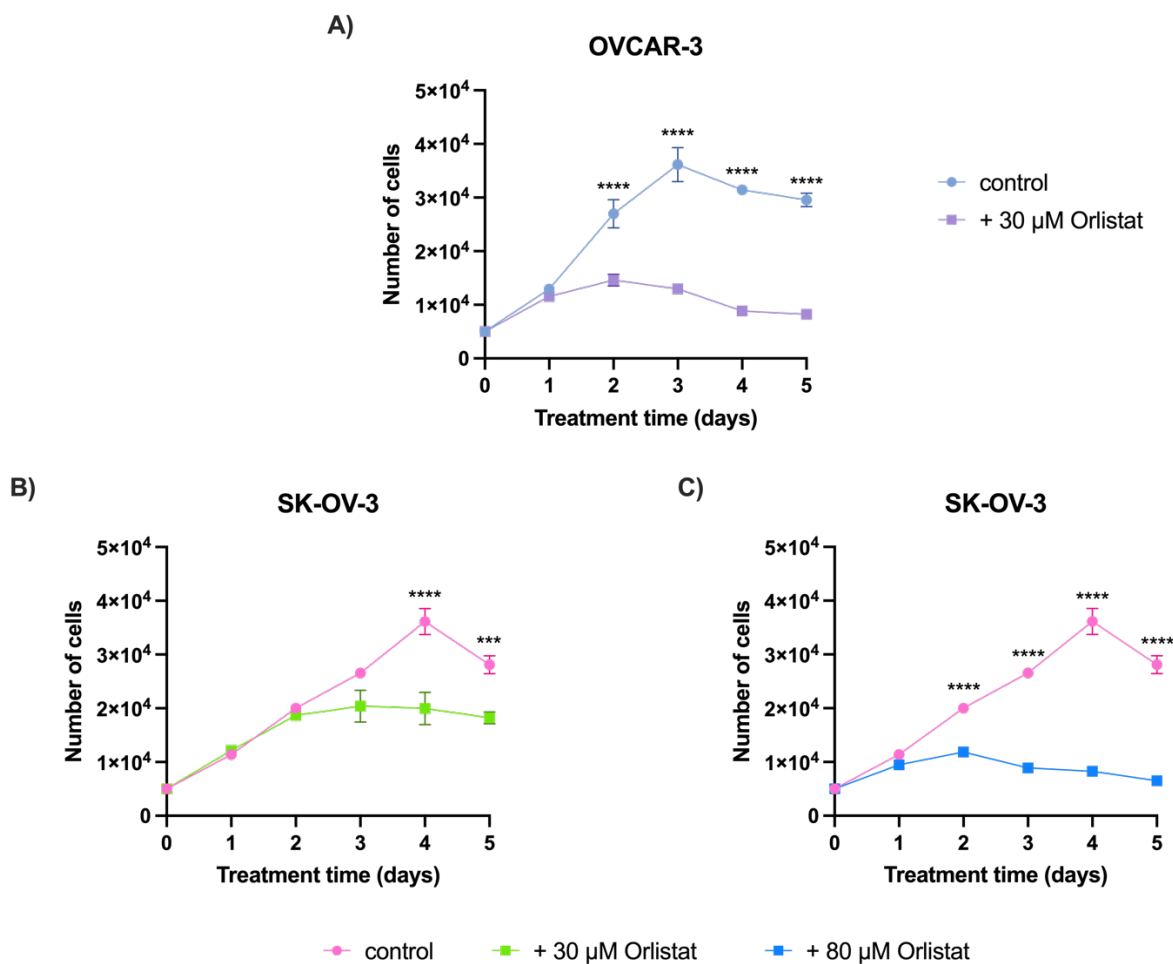


Figura 6-5. Curva de proliferación celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 bajo el tratamiento de orlistat. Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron expuestas a 30 y 80 μM de orlistat durante 5 días. La línea celeste corresponde a las células OVCAR-3 sin tratamiento, es decir, control; y la línea rosada corresponde a las células SK-OV-3 sin tratamiento. A) Células OVCAR-3 tratadas con 30 μM de orlistat durante 5 días. B) Células SK-OV-3 tratadas con 30 μM de orlistat durante 5 días. C) Células SK-OV-3 tratadas con 80 μM de Orlistat durante 5 días. Las barras de error indican

SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; **** <0.0001)

Con respecto al tratamiento con etomoxir, en las células OVCAR-3, se evidenció un efecto citotóxico a partir de la concentración de 100 μM , lo que resultó en una reducción de la viabilidad celular al 85%. No obstante, se observaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control a concentraciones de 150 y 200 μM , donde la viabilidad celular disminuyó al 75% y al 50%, respectivamente (Figura 6-6A). Paralelamente, etomoxir también tiene efectos citotóxicos en las células SK-OV-3, donde se observaron diferencias significativas a concentraciones de 150 y 200 μM , reduciendo la viabilidad celular al 88% y al 67%, respectivamente (Figura 6-6B).

Por lo tanto, para los estudios posteriores, se decidió trabajar con dos concentraciones de etomoxir: 100 y 200 μM .

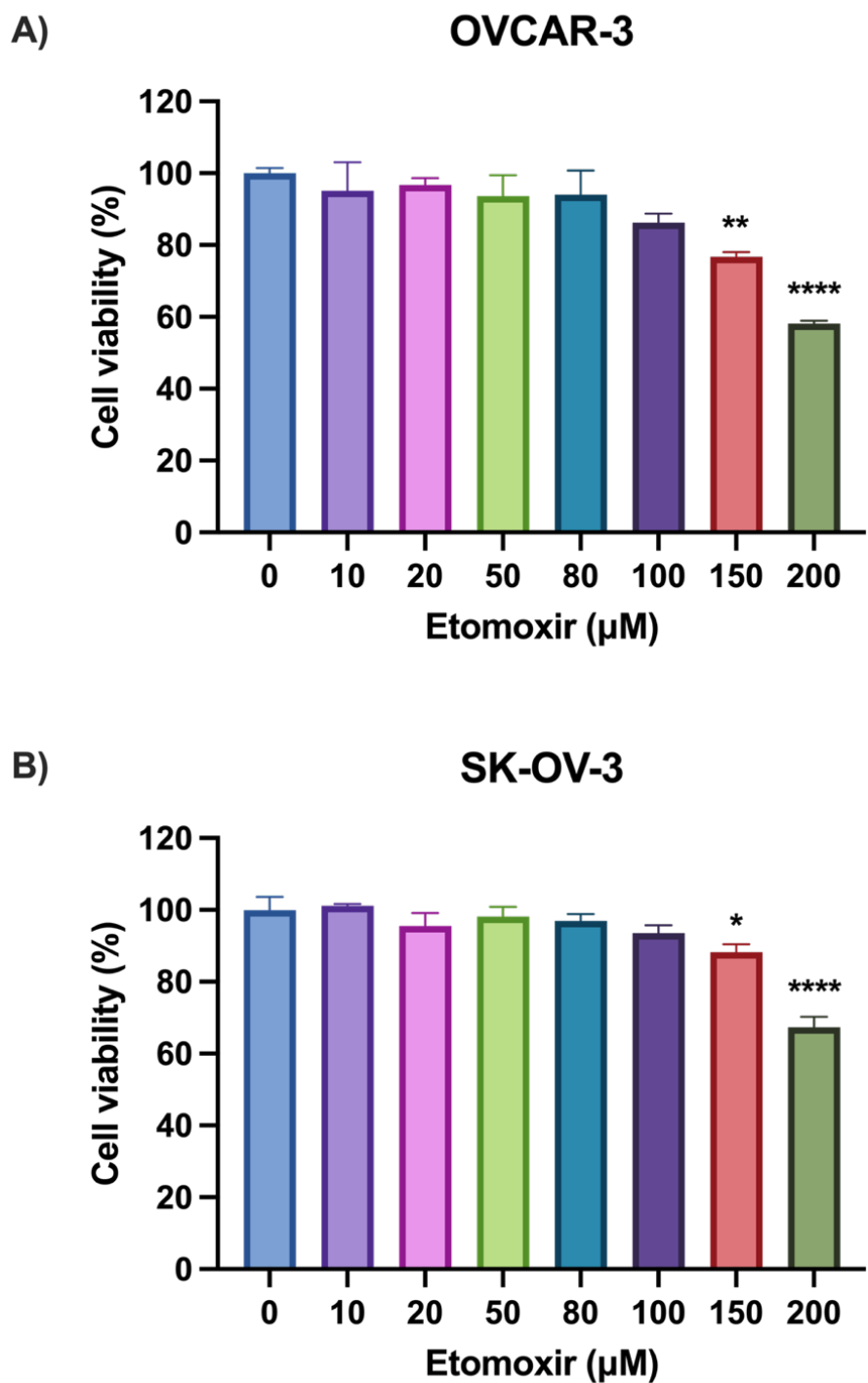


Figura 6-6. Viabilidad celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 frente al tratamiento con etomoxir. Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron expuestas a diferentes concentraciones de etomoxir. Las barras azules representan al control, células sin tratamiento, mientras que las barras de colores representan a las distintas

concentraciones de etomoxir utilizadas. A) Células OVCAR-3 tratadas con etomoxir por 24 horas. B) Células SK-OV-3 tratadas con etomoxir por 24 horas. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; **** <0.0001)

Con respecto al efecto de etomoxir sobre la proliferación celular, ambas líneas celulares fueron sometidas a dos concentraciones: 100 y 200 μM . El tratamiento con 100 μM de etomoxir en las células OVCAR-3 generó un efecto a partir del segundo día, aunque las diferencias significativas se hicieron evidentes desde el tercer día de tratamiento. Entre el segundo y tercer día, se observó una detención en la proliferación celular que culminó en una disminución del número de células a partir del tercer día de tratamiento. Esto indica que etomoxir posee un efecto citotóxico que conduce a la muerte celular a partir del tercer día de tratamiento (Figura 6-7A). Desde el primer día de tratamiento con 200 μM de etomoxir en las células OVCAR-3, se evidenciaron efectos, con una detención en la proliferación celular observada entre el primer y tercer día de tratamiento. Además, se visualizó un efecto citotóxico a partir del tercer día de tratamiento (Figura 6-7B).

En relación con las células SK-OV-3, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas al exponerlas a una concentración de 100 μM de etomoxir durante los primeros tres días de tratamiento. No obstante, en el cuarto día se evidenció una detención en la proliferación celular, acompañada de un grado de citotoxicidad discernible, como lo indica una ligera disminución en el recuento celular entre el cuarto y quinto día de tratamiento (Figura 6-7C). El tratamiento con la concentración 200 μM de etomoxir indujo la detención de la proliferación celular desde el segundo día de tratamiento hasta el cuarto día; en el quinto día, se observó una citotoxicidad pronunciada que culminó con muerte celular (Figura 6-7D).

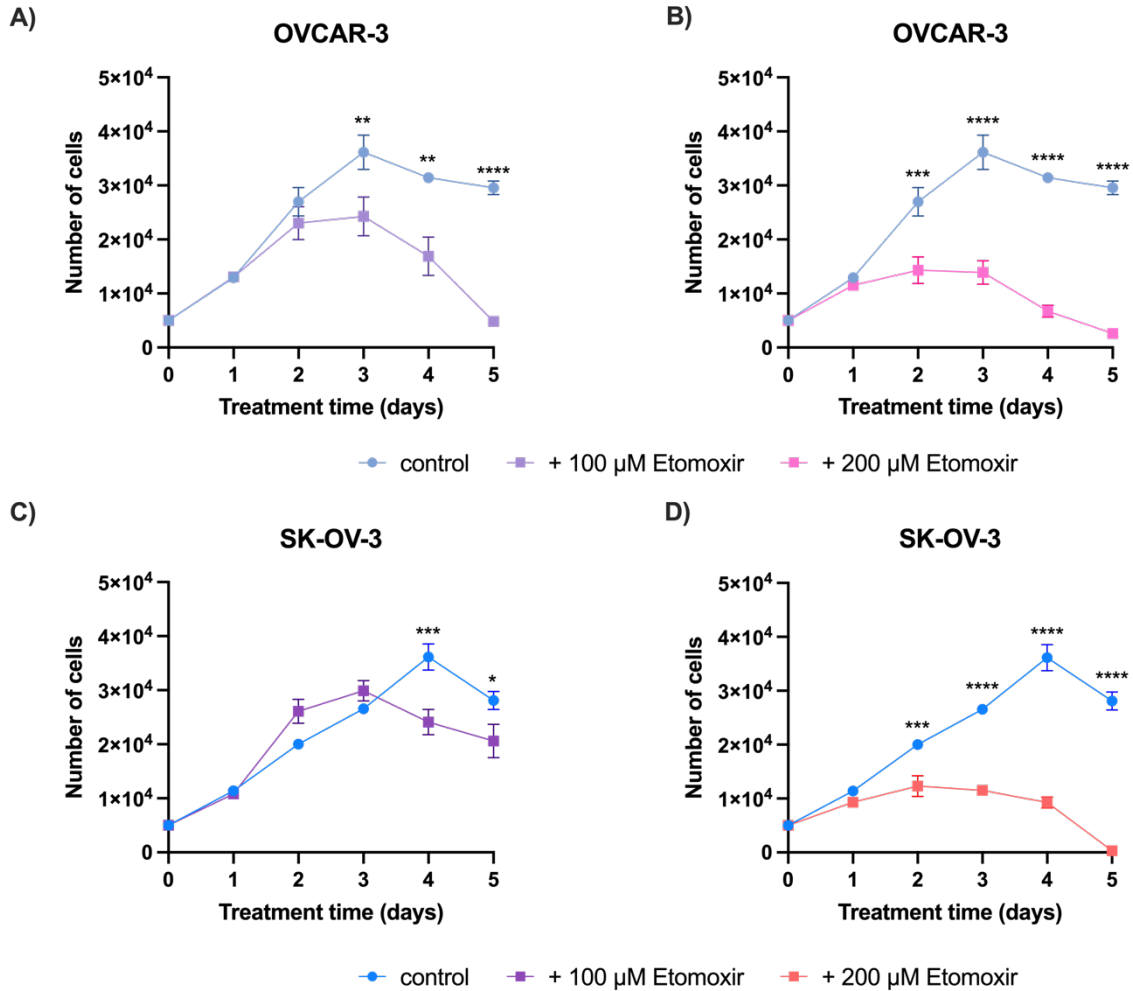


Figura 6-7. Curva de proliferación celular de OVCAR-3 y SK-OV-3 bajo el tratamiento de etomoxir. Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron expuestas a 100 y 200 μ M de etomoxir durante 5 días. La línea celeste corresponde a las células OVCAR-3 sin tratamiento, es decir, control; y la línea azul corresponde a las células SK-OV-3 sin tratamiento. A) Células OVCAR-3 tratadas con 100 μ M de etomoxir durante 5 días. B) Células OVCAR-3 tratadas con 200 μ M de etomoxir durante 5 días. C) Células SK-OV-3 tratadas con 100 μ M de etomoxir durante 5 días. D) Células SK-OV-3 tratadas con 200 μ M de etomoxir durante 5 días. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; ***** <0.0001)

6.2.2. Cuantificación de genes asociados a la vía lipídica y glicolítica por RT-qPCR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.

Tras el análisis de la proliferación celular de OVCAR-3 y SK-OV-3, se quiso evaluar la variación de la expresión de ARNm de las enzimas asociadas con el metabolismo lipídico frente al tratamiento con orlistat y etomoxir por 48 horas, ya que como se observó en las Figuras 6-5 y 6-7, ambas drogas comienzan a tener efectos estadísticamente significativos tras 48 horas de incubación.

Los resultados de RT-qPCR para las células OVCAR-3 sometidas a un tratamiento de 48 horas con orlistat revelaron un perfil de reducción en la expresión de ARNm de CD36 y FASN, mientras que la expresión de CPT1A y CPT1B no se vio afectado. En cambio, en las células SK-OV-3, la expresión del mensajero de FASN, CPT1A y CPT1B aumentaron significativamente tras el tratamiento con orlistat, siendo el gen de FASN el que presenta una mayor expresión en comparación a los otros 2 genes, mientras que la expresión del gen CD36 disminuyó significativamente (Figura 6-8).

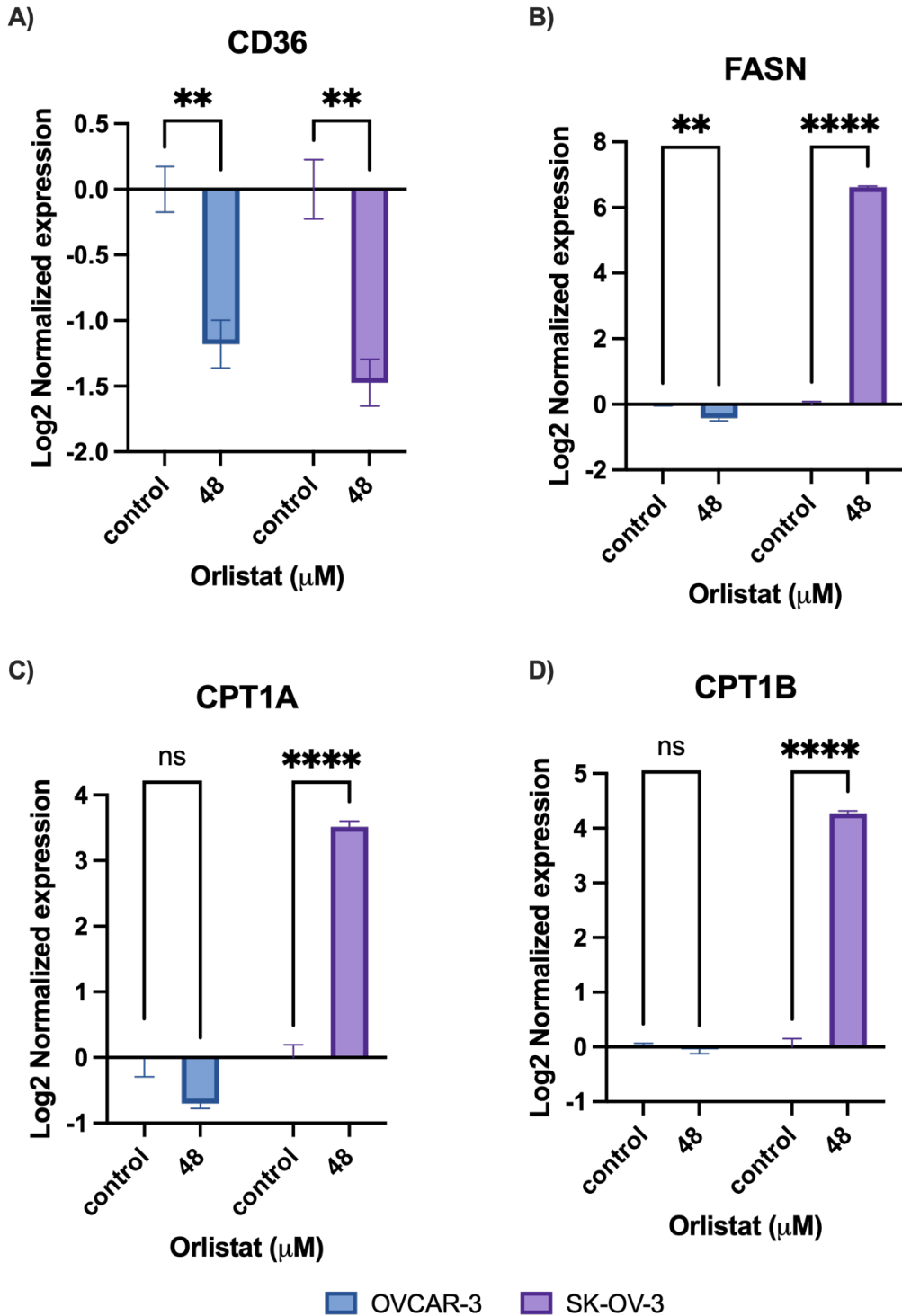


Figura 6-8. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat. Las células OVCAR-3 se expusieron a una concentración de 30 μM de orlistat, mientras que las células SK-OV-3 fueron tratadas con una concentración de 80 μM, durante 48 horas. Las barras de color

azul representan las células OVCAR-3, mientras que las barras de color morado corresponden a las células SK-OV-3. A) Expresión de ARNm de CD36. B) Expresión de ARNm de FASN. C) Expresión de ARNm de CPT1A. D) Expresión de ARNm de CPT1B. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; ***** <0.0001)

Por otro lado, las células OVCAR-3 sometidas a un tratamiento de 48 horas con etomoxir por 48 horas revelaron un perfil de reducción en la expresión de ARNm de FASN, CPT1A y CPT1B. La disminución observada en los ARNm de FASN y CPT1B fue notable y estadísticamente significativa, mientras que la expresión del gen CPT1A no presentó diferencias significativas, aunque exhibió una tendencia a la disminución. Asimismo, se notó una tendencia al aumento en la expresión del gen CD36, aunque sin alcanzar cambios estadísticamente significativos (Figura 6-9A y B). Por otro lado, las células SK-OV-3 también experimentaron una disminución estadísticamente significativa en la expresión del ARNm de CD36 y FASN, mientras que CPT1A mostró una tendencia al aumento en la expresión de su ARNm, pero sin alcanzar la significancia estadística. No obstante, las células SK-OV-3 mostraron un aumento marcado y estadísticamente significativo en la expresión de CPT1B durante el mismo período de tratamiento (Figura 6-9C y D).

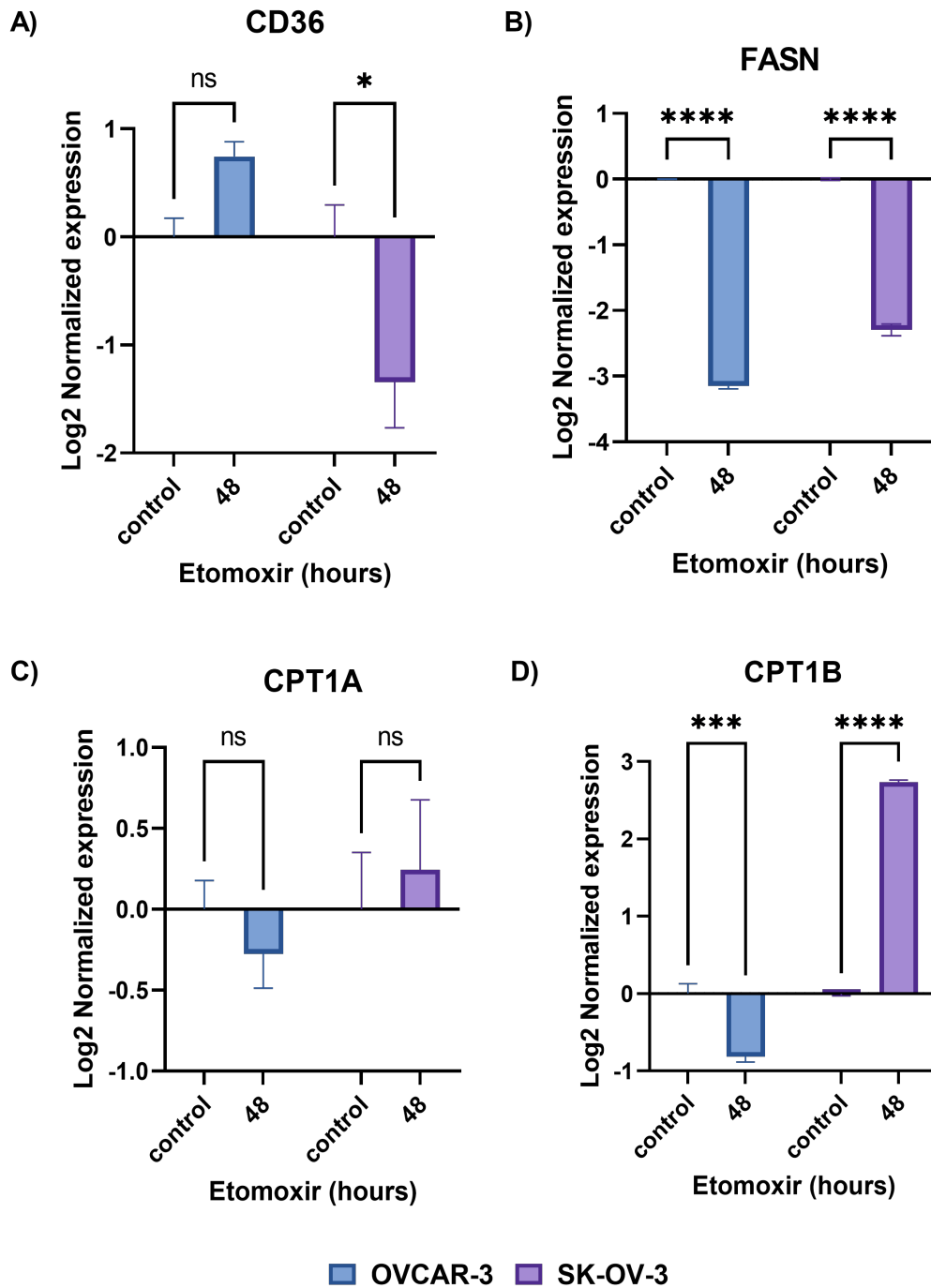


Figura 6-9. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir. Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron expuestas a una concentración de 200 μ M de etomoxir durante 48 horas. Las barras de color azul representan las células OVCAR-3, mientras que las barras de color morado corresponden a las células SK-OV-3. A) Expresión de

ARNm de CD36. B) Expresión de ARNm de FASN. C) Expresión de ARNm de CPT1A. D) Expresión de ARNm de CPT1B. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.001 ; **** <0.0001)

Dado a los resultados descritos anteriormente, sabemos que las células SK-OV-3 muestran un perfil lipídico, así que decidimos estudiar la expresión estos mismos genes en estas células, pero bajo la exposición de orlistat y etomoxir a las 24 y 48 horas.

Bajo el tratamiento con orlistat, se observó que a partir de las 24 horas de tratamiento, la expresión del ARNm de FASN, CPT1A y CPT1B aumentan significativamente, efecto que se incrementa aún más a las 48 horas de tratamiento. Por otro lado, la expresión del ARNm de CD36 a las 24 horas no se ve afectado (Figura 6-10).

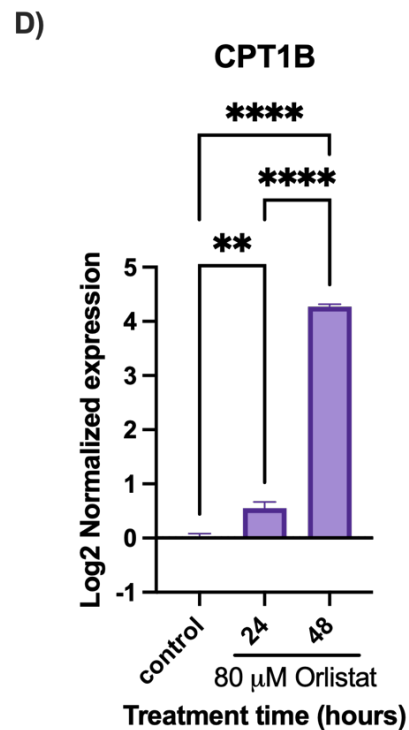
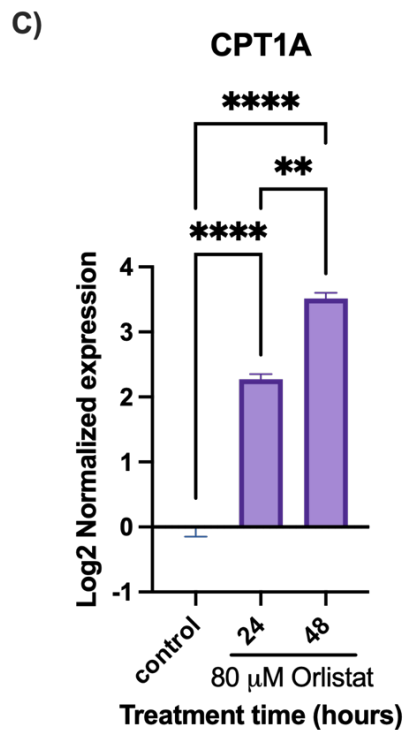
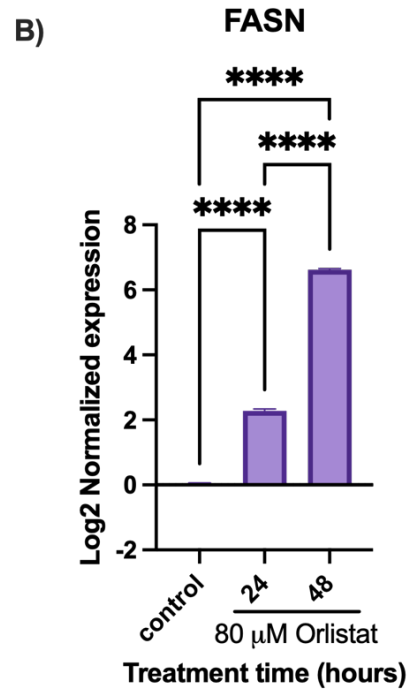
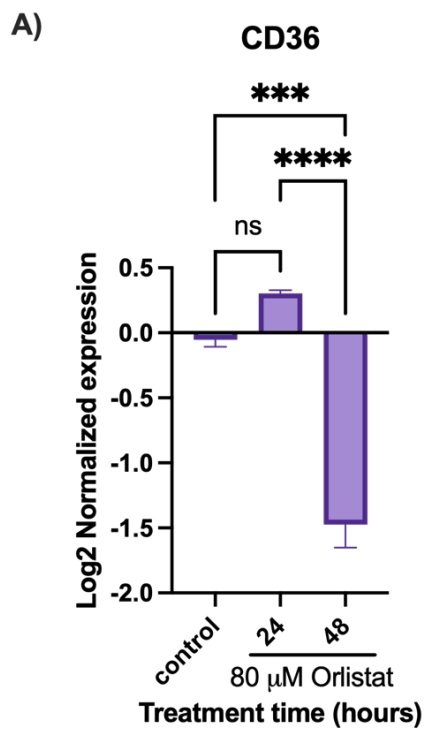


Figura 6-10. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat. Las células SK-OV-3 se expusieron a una concentración de 80 μ M de orlistat durante 24 y 48 horas. Las barras moradas

corresponden a las células SK-OV-3. A) Expresión de ARNm de CD36. B) Expresión de ARNm de FASN. C) Expresión de ARNm de CPT1A. D) Expresión de ARNm de CPT1B. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; **** <0.0001)

Bajo el tratamiento con etomoxir, la expresión del ARNm de CD36 a las 24 horas de tratamiento aumenta levemente que, termina por disminuir significativamente a las 48 horas de tratamiento. La expresión de FASN disminuyó significativamente a las 24 horas, la cual se mantuvo hasta las 48 horas de tratamiento. CPT1A tiene un aumento significativo a las 24 horas de tratamiento, el cual vuelve a su expresión basal luego de las 48 horas. Por último, a las 24 horas de tratamiento, CPT1B disminuye significativamente su expresión para, luego, aumentar significativamente a las 48 horas de tratamiento (Figura 6-11).

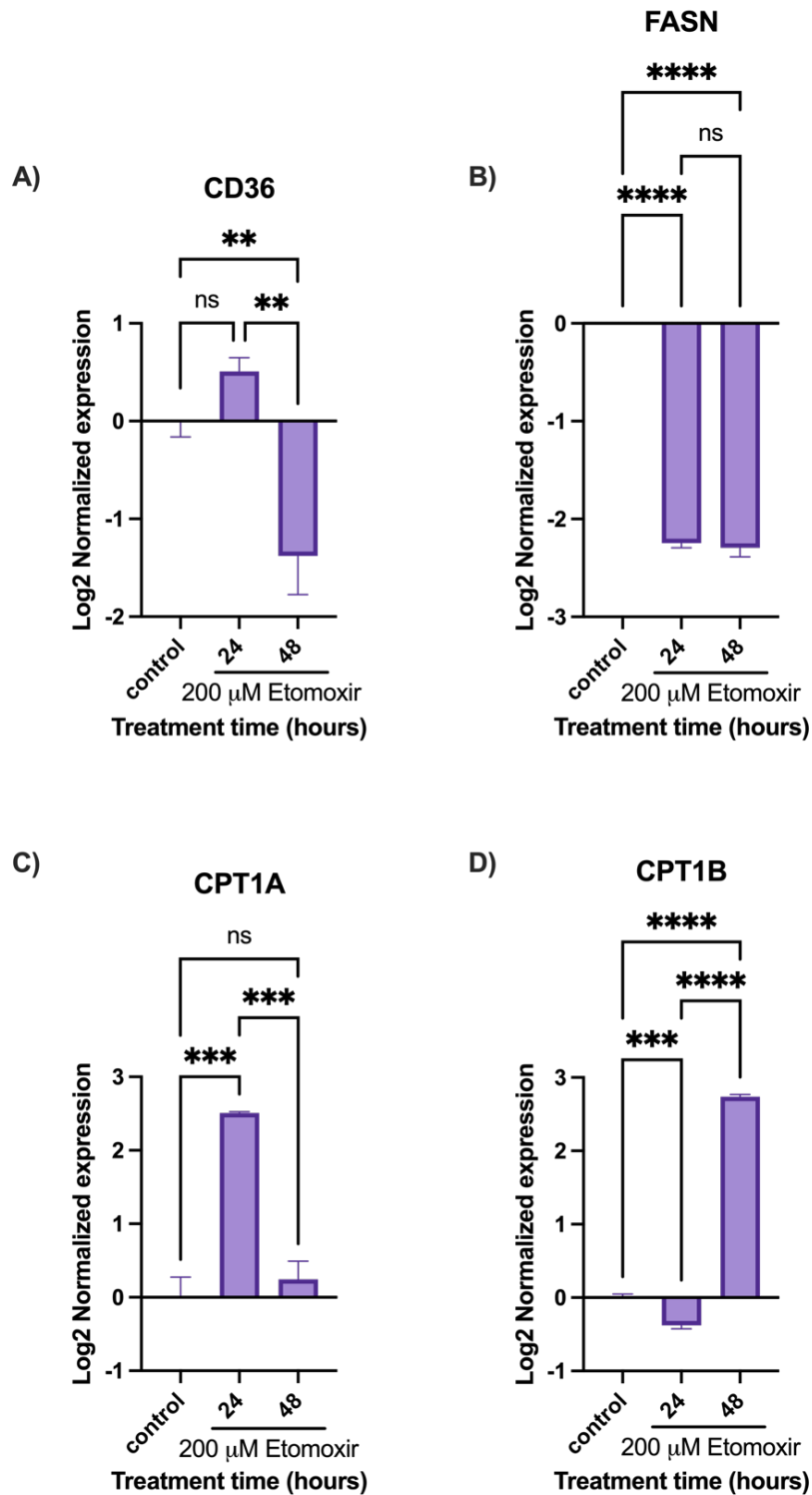


Figura 6-11. Expresión de ARNm de CD36, FASN, CPT1A y CPT1B en SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir. Las células SK-OV-3 se expusieron a una concentración de 200 μ M de etomoxir durante 24 y 48 horas. Las barras moradas

corresponden a las células SK-OV-3. A) Expresión de ARNm de CD36. B) Expresión de ARNm de FASN. C) Expresión de ARNm de CPT1A. D) Expresión de ARNm de CPT1B. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; **** <0.0001)

En las células cancerosas, se evidencia una alteración en la vía de la glicólisis, la cual constituye la principal ruta utilizada para la obtención de energía rápida para que éstas puedan seguir proliferando. A pesar de que nuestros estudios previos sugirieron de manera contundente que las células SK-OV-3 priorizan el metabolismo de los lípidos, se quiso estudiar la expresión de los genes de cuatro enzimas glicolíticas al inhibir la β -oxidación y la síntesis de ácidos grasos. Las enzimas objeto de estudio fueron GLUT1, Hexoquinasa 2 (HK2), Piruvato Quinasa (PKM) y Lactato Deshidrogenasa (LDHA).

Bajo el tratamiento con orlistat por 48 horas, se observó una reducción significativa en la expresión génica de GLUT1, PKM y LDHA en las células OVCAR-3, mientras que la expresión del gen HK2 experimentó un aumento marcado. En contraste, en las células SK-OV-3, se observó un significativo aumento en la expresión de los cuatro genes mencionados (Figura 6-12).

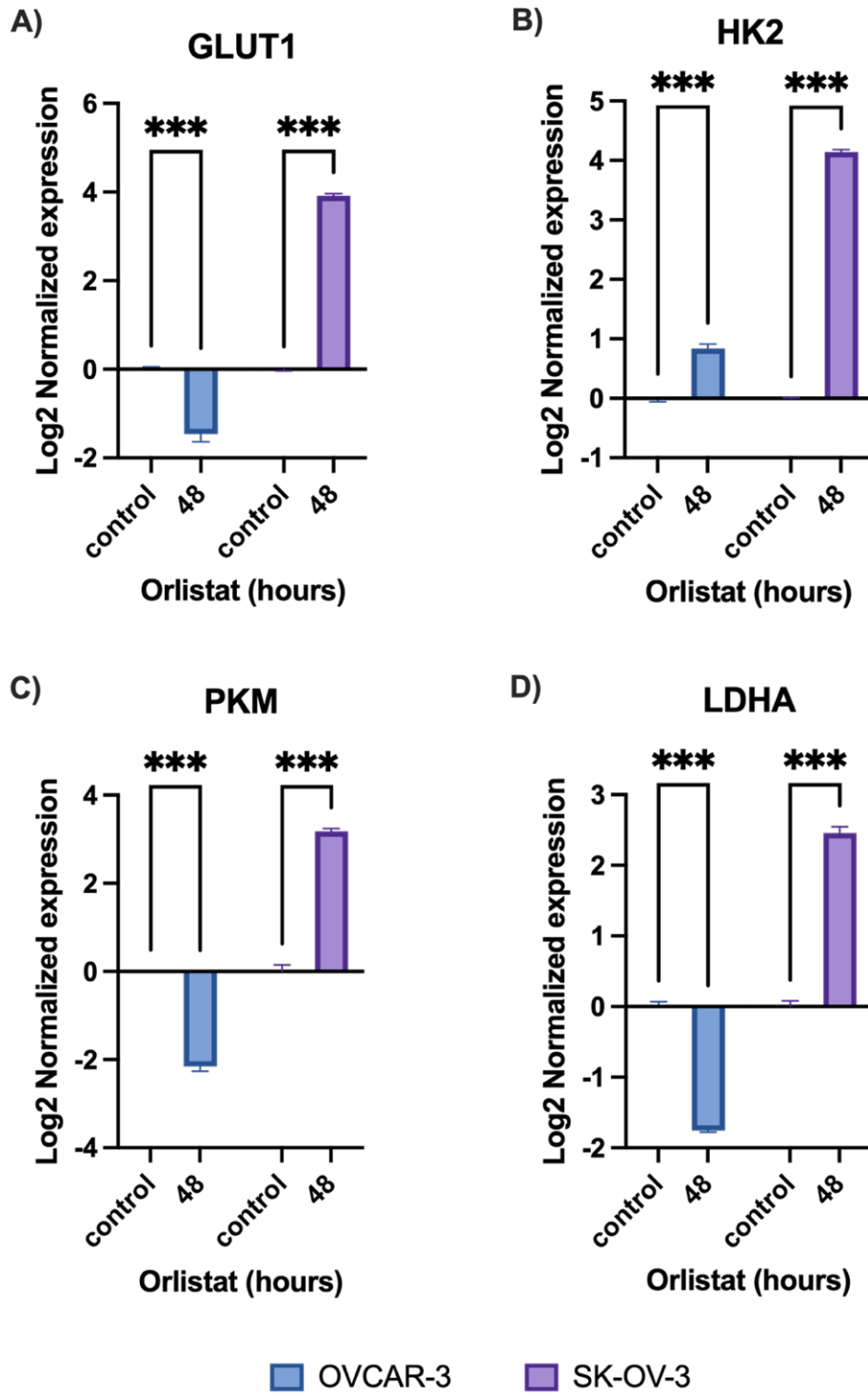


Figura 6-12. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat. Las células OVCAR-3 se expusieron a una concentración de 30 μ M de orlistat, mientras que las células SK-OV-3 fueron

tratadas con una concentración de 80 μ M, durante 48 horas. Las barras de color azul representan las células OVCAR-3, mientras que las barras de color morado corresponden a las células SK-OV-3. A) Expresión de ARNm de GLUT1. B) Expresión de ARNm de HK2. C) Expresión de ARNm de PKM. D) Expresión de ARNm de LDHA. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; **** <0.0001)

Con respecto al tratamiento de etomoxir por 48 horas, se observó una disminución significativa en la expresión de los genes de GLUT1, PKM y LDHA en las células OVCAR-3, mientras que la expresión de HK2 no experimentó cambios discernibles. En el caso de las células SK-OV-3, se observó un patrón similar al de las células OVCAR-3, con la distinción que la expresión del gen HK2 experimentó una significativa disminución a las 48 horas de tratamiento con etomoxir (Figura 6-13).

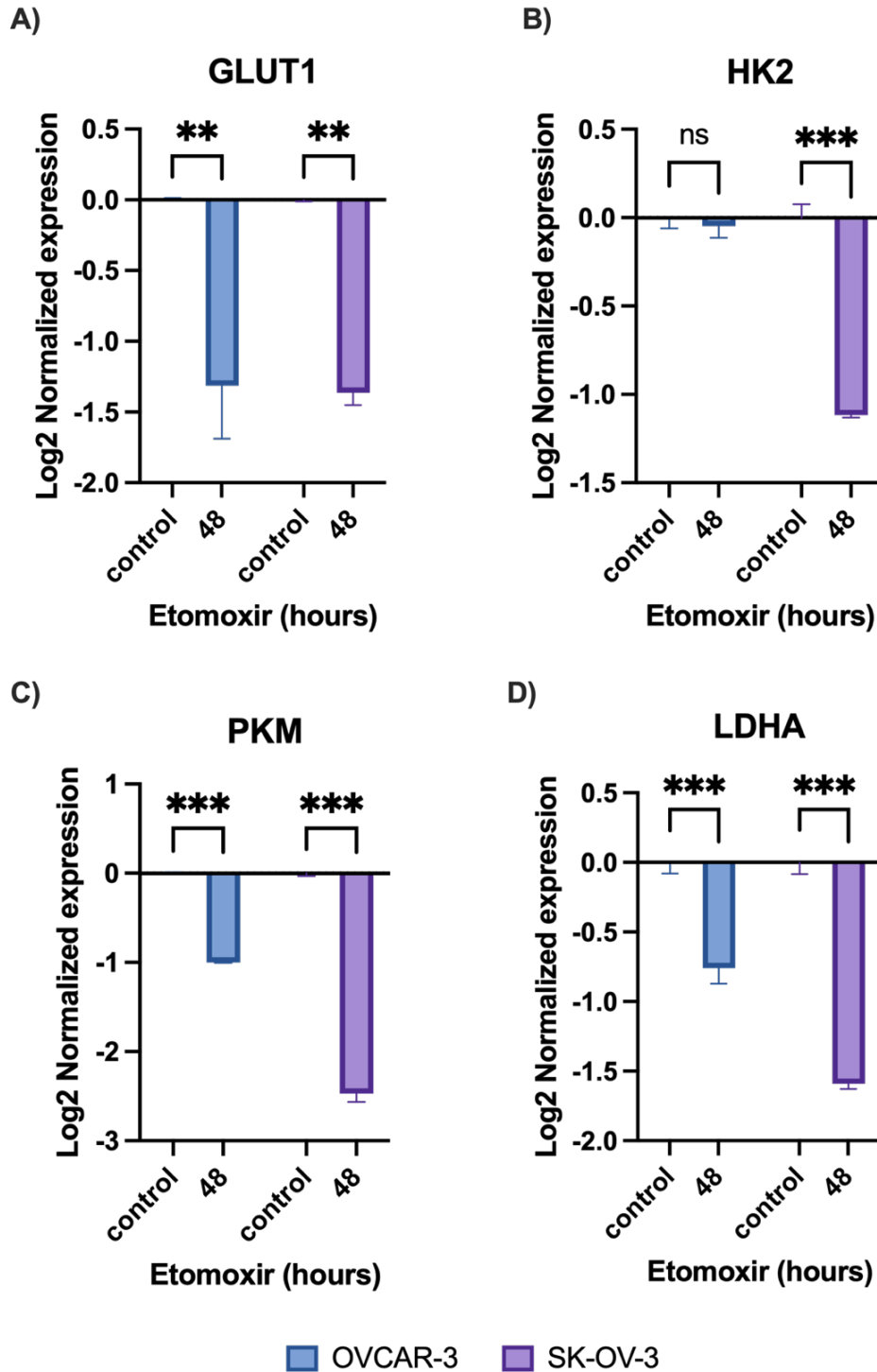


Figura 6-13. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en OVCAR-3 y SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir. Las células OVCAR-3 y SK-OV-3 fueron expuestas a una concentración de 200 μ M de etomoxir durante 48 horas. Las barras de color azul representan las células OVCAR-3, mientras que las barras de

color morado corresponden a las células SK-OV-3. A) Expresión de ARNm de GLUT1. B) Expresión de ARNm de HK2. C) Expresión de ARNm de PKM. D) Expresión de ARNm de LDHA. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; ***** <0.0001)

A pesar de conocer el predominio del metabolismo glicolítico en las células OVCAR-3 en comparación con las células SK-OV-3, se quiso investigar la actividad glicolítica y cualquier potencial reprogramación metabólica en respuesta al tratamiento con inhibidores del metabolismo lipídico durante períodos de 24 y 48 horas en las células SK-OV-3.

El tratamiento con orlistat mostró una disminución inicial en la expresión del ARNm de GLUT1 después de las 24 horas de tratamiento, seguido de un aumento significativo a las 48 horas de tratamiento. En cuanto a HK2, no se observaron cambios significativos en la expresión génica a las 24 horas de tratamiento, pero si se registró un incremento significativo de su expresión a las 48 horas. Respecto a PKM y LDHA, ambos genes exhibieron un perfil similar, con un aumento estadísticamente significativo en su expresión tras 24 horas de tratamiento, el cual se mantuvo aumentado hasta las 48 horas de tratamiento (Figura 6-14).

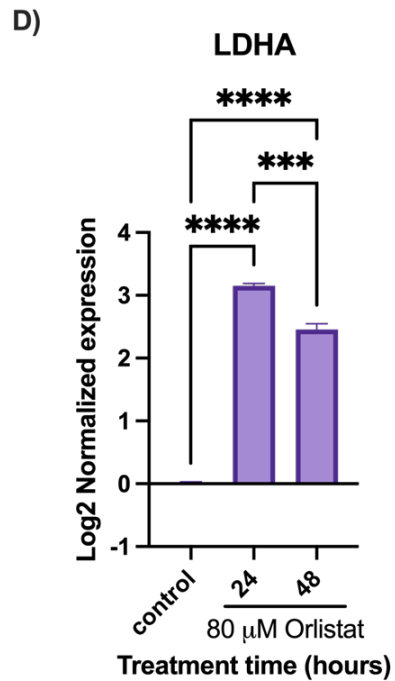
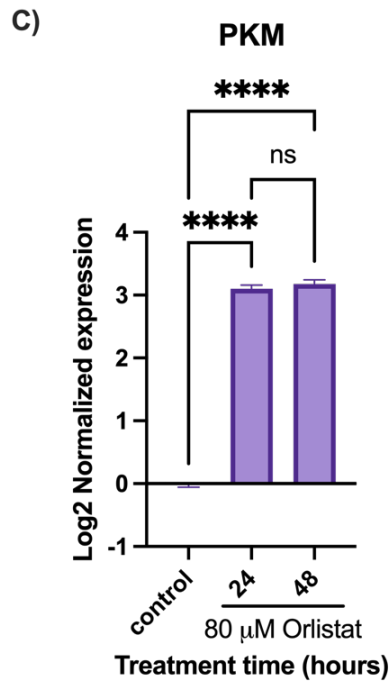
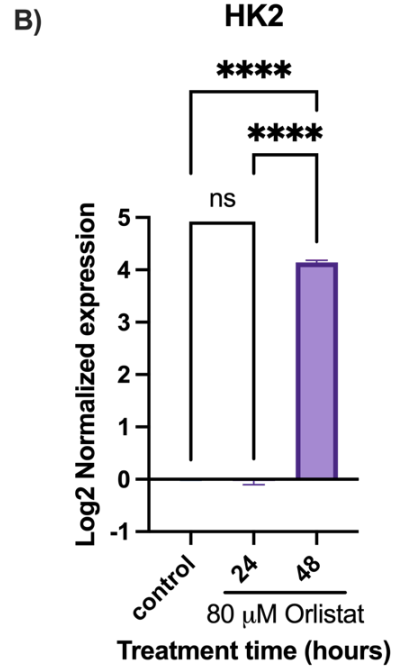
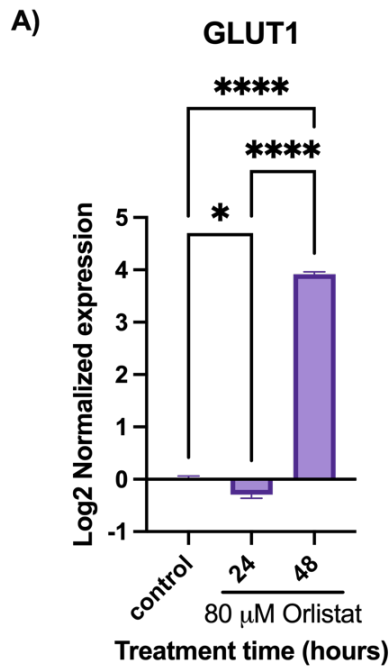


Figura 6-14. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en SK-OV-3 tras el tratamiento con orlistat. Las células SK-OV-3 se expusieron a una concentración de 80 μ M de orlistat durante 24 y 48 horas. Las barras moradas

corresponden a las células SK-OV-3. A). Expresión de ARNm de GLUT1. B) Expresión de ARNm de HK2. C) Expresión de ARNm de PKM. D) Expresión de ARNm de LDHA. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; **** <0.0001)

Tras el tratamiento con etomoxir, se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión génica de GLUT1, PKM y LDHA a las 24 horas de tratamiento, con una tendencia al aumento en la expresión del gen HK2. Sin embargo, a las 48 horas de tratamiento, se registró una disminución significativa en la expresión de los cuatro genes estudiados (Figura 6-15).

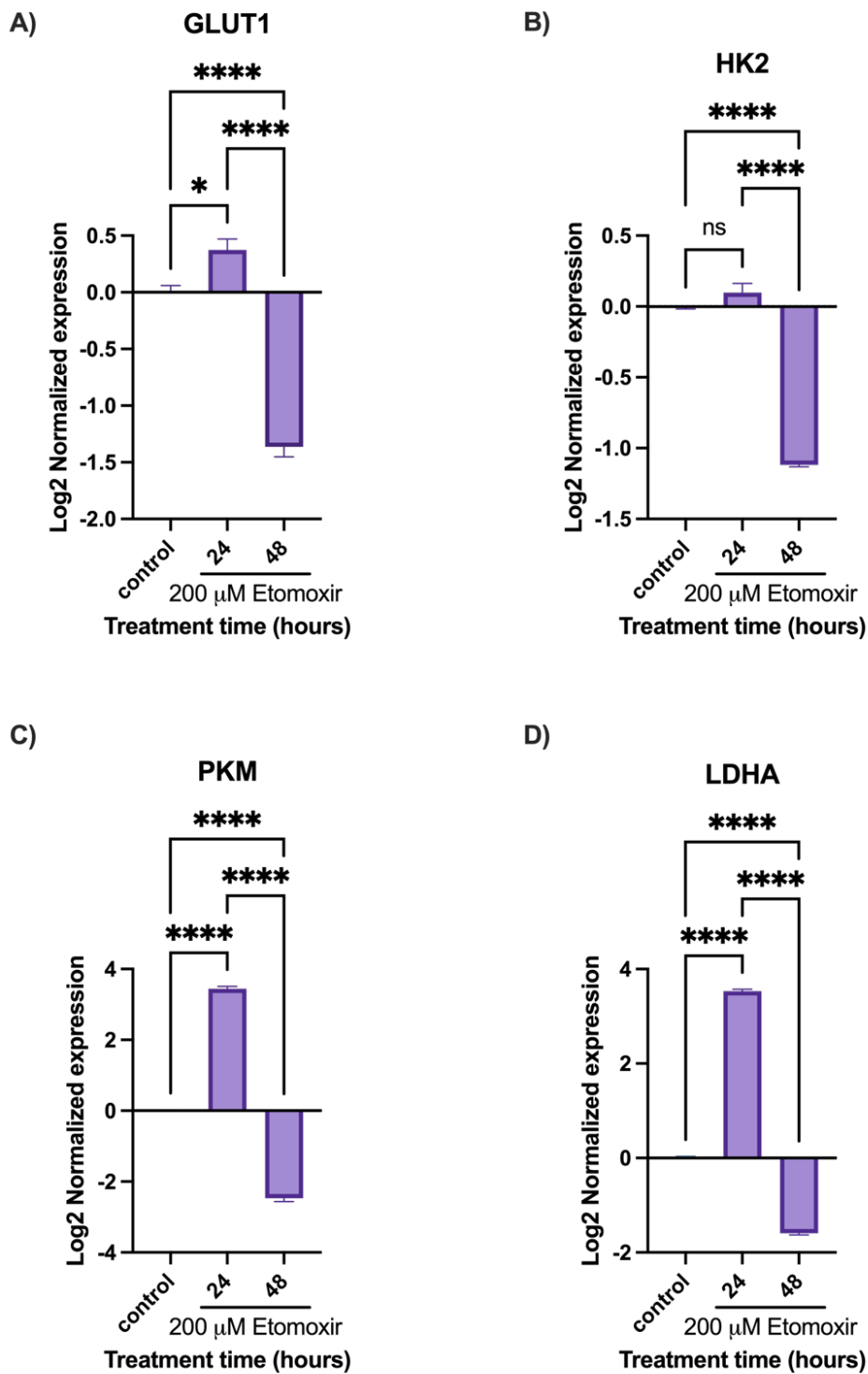


Figura 6-15. Expresión de ARNm de GLUT1, HK2, PKM y LDHA en SK-OV-3 tras el tratamiento con etomoxir. Las células SK-OV-3 se expusieron a una concentración de 200 μ M de etomoxir durante 24 y 48 horas. Las barras moradas

corresponden a las células SK-OV-3. A) Expresión de ARNm de GLUT1. B) Expresión de ARNm de HK2. C) Expresión de ARNm de PKM. D) Expresión de ARNm de LDHA. Las barras de error indican SEM. Experimento realizado por triplicado. (Test ANOVA, Valor p: * <0.05 ; ** <0.01 ; **** <0.001 ; ***** <0.0001)

6.3. Evaluar la sensibilidad a doxorrubicina en las líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con orlistat y etomoxir.

6.3.1. Sensibilidad a DOX en células OVCAR-3 bajo el efecto de orlistat y etomoxir.

Tal como se mencionó anteriormente, es pertinente señalar que DOX manifiesta diferentes efectos en ambas líneas celulares. Tal como se mostró en la Figura 1-3, DOX se comporta como agente citotóxico en OVCAR-3 y citostático en SK-OV-3. Además, la Figura 1-5 nos demostró que la inhibición de la glicólisis aumentaba la sensibilidad a DOX en las células OVCAR-3. Por lo tanto, junto con los resultados del análisis metabolómico, sabemos que el perfil metabólico de OVCAR-3 dependen principalmente de la glicólisis.

No obstante, se quiso estudiar si es que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de la β -oxidación aumentaba también la sensibilidad a DOX en este tipo celular. Para estudiar este efecto, las células OVCAR-3 fueron tratadas con orlistat y etomoxir por un período de 48 horas, evaluando el efecto de cada droga por separado y, además, se trataron con concentraciones crecientes de DOX por 24 horas.

Se observó que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de la β -oxidación por 48 horas reduce la población celular inicial a un 70% y 80%, respectivamente, en comparación con las células sin ningún tratamiento previo (Figura 6-16A). Además, se evidenció que el tratamiento con orlistat y etomoxir no modifica la sensibilidad a DOX en células OVCAR-3, dado a que no se observaron

cambios en el porcentaje de inhibición de OVCAR-3 y no hubo cambios significativos en el IC₅₀ tras el tratamiento (Figura 6-16B y Tabla 2).

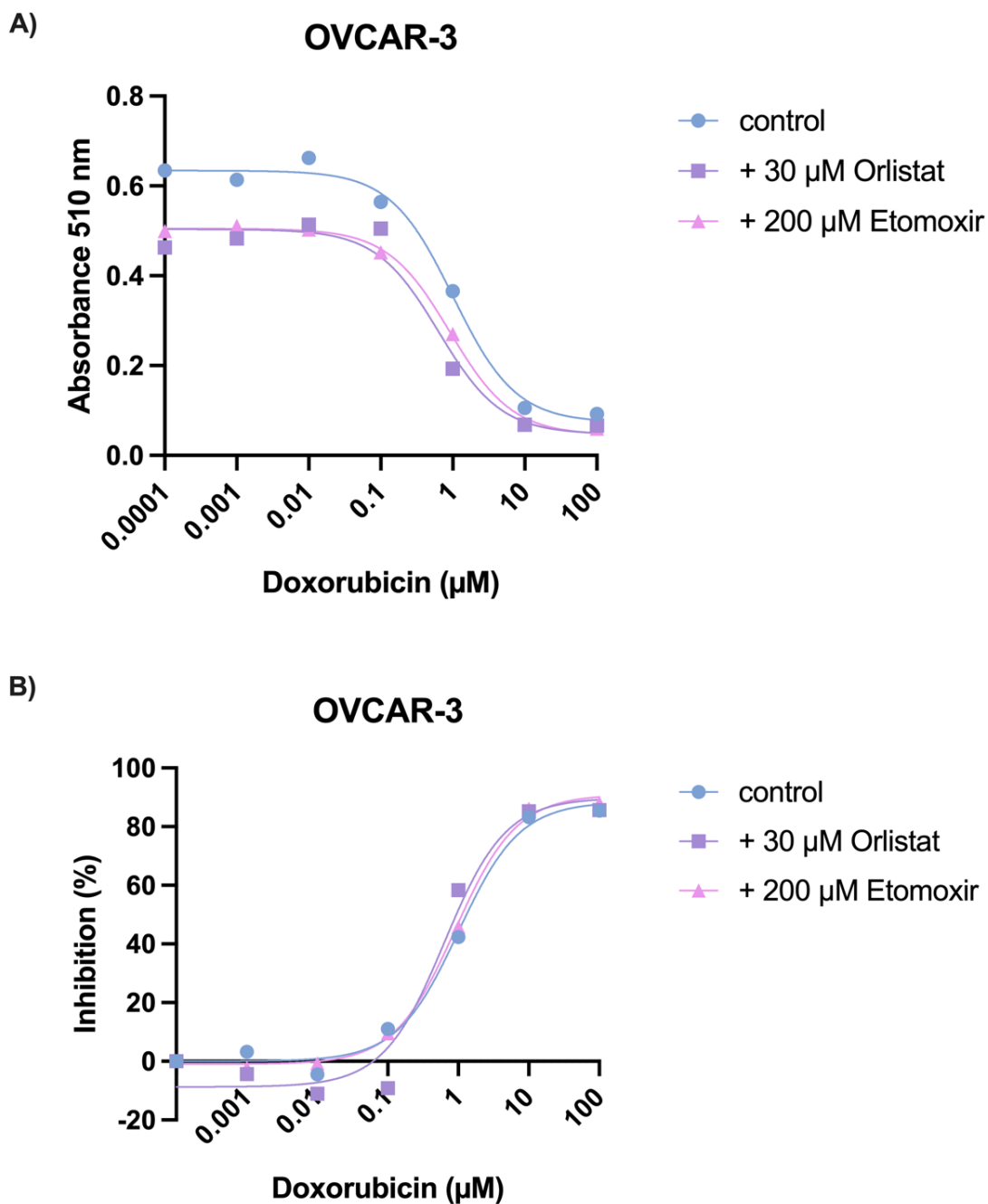


Figura 6-16. Gráfico dosis-respuesta a doxorubicina en células OVCAR-3. Células OVCAR-3 fueron tratadas con concentraciones crecientes de doxorubicina durante 24 horas. La línea celeste corresponde las células OVCAR-3 tratadas

únicamente con doxorubicina; la línea morada corresponde a células OVCAR-3 tratadas con 200 μM de etomoxir por 48 horas y 24 horas con doxorubicina; y la línea rosada corresponde a células OVCAR-3 tratadas con 30 μM de orlistat por 48 horas y 24 horas con doxorubicina. A) Gráfico dosis-respuesta a doxorubicina en células OVCAR-3 sin y con tratamiento a orlistat y etomoxir. B) Gráfico porcentaje de inhibición a doxorubicina en células OVCAR-3 sin y con tratamiento a orlistat y etomoxir. Las barras de error indican SEM. N=3. Experimento realizado por triplicado

Tabla 2. Valores de IC_{50} obtenidos para doxorubicina en células OVCAR-3 sin tratar y tratadas con orlistat y etomoxir.

Condición	IC_{50} (μM)
DOX (control)	1.008 ± 0.106
DOX + 30 μM orlistat	0.635 ± 0.140
DOX + 200 μM etomoxir	0.909 ± 0.077

6.3.2. Sensibilidad a DOX en células SK-OV-3 bajo el efecto de orlistat y etomoxir.

Por otro lado, se conoce que SK-OV-3 tiene un perfil más asociado al metabolismo lipídico. Así que se estudió si es que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de la β -oxidación aumentaba la sensibilidad a DOX en este tipo celular, tal como la inhibición de la glicólisis aumenta la sensibilidad a DOX en OVCAR-3. Para esto, se repitió el mismo procedimiento realizado para OVCAR-3.

Encontramos que el tratamiento con orlistat reduce la población inicial de SK-OV-3 a aproximadamente un 50%, indicándonos que existe una población susceptible a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, efecto observado en la proliferación de estas células bajo el efecto de orlistat. Sin embargo, la población remanente no se vio afectada tras el tratamiento con DOX, pues el efecto de DOX se mantuvo constante hasta la concentración 1 μM . Por otro lado, el tratamiento con etomoxir redujo la población inicial de SK-OV-3 a un 85% en comparación con las células sin tratamiento previo (Figura 6-17A). Interesantemente, encontramos que ni la inhibición de la síntesis de ácidos grasos ni la inhibición de la β -oxidación

aumentaba la sensibilidad a DOX en células SK-OV-3. Es más, el tratamiento con orlistat aumentó 21 veces la potencia farmacológica de DOX, pues como se observa en la Tabla 3, el valor de IC₅₀ aumentó de 0.895 a 18.780 μ M, efecto que se observa con el desplazamiento de la curva en la Figura 6-17B.

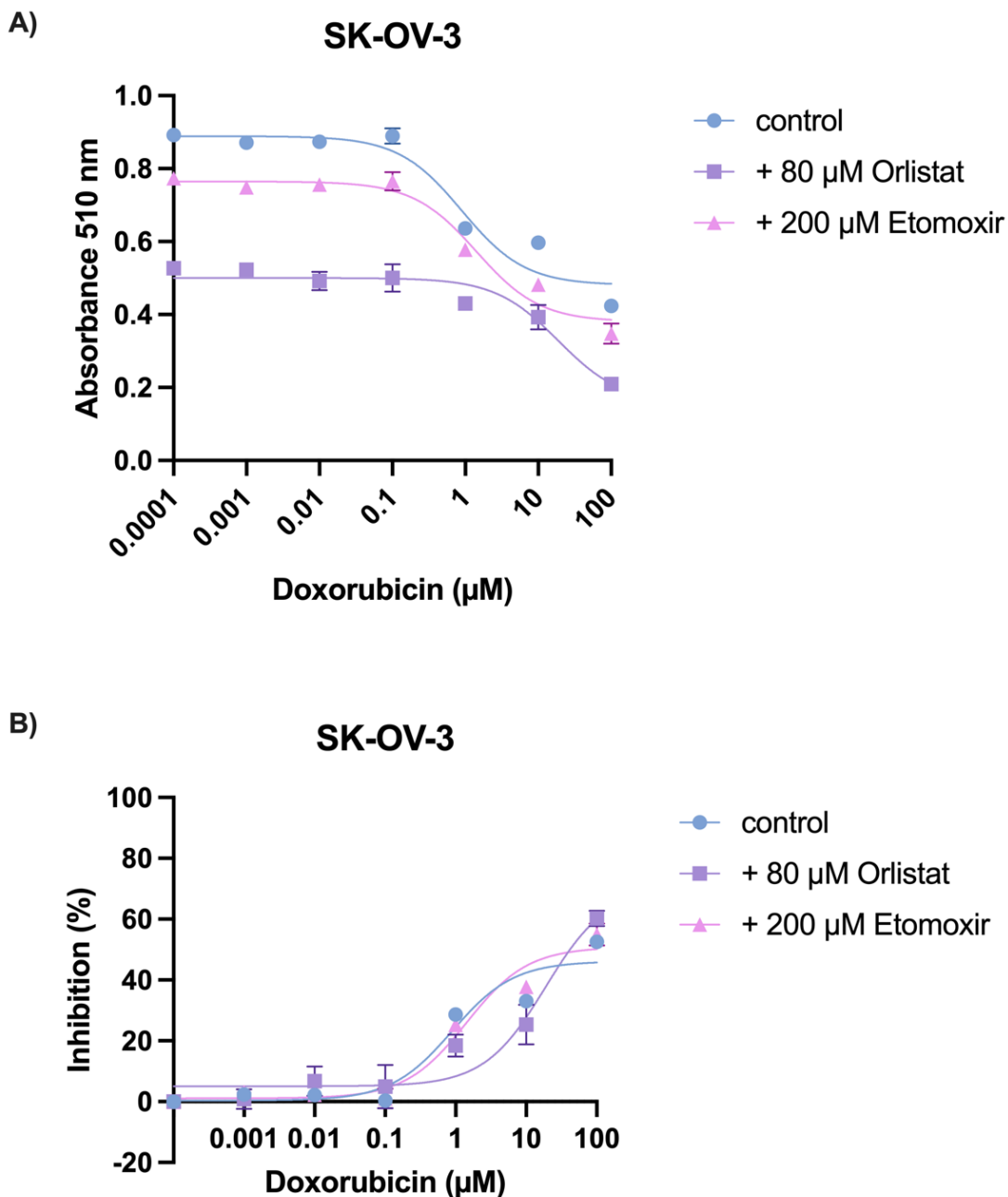


Figura 6-17. Gráfico dosis-respuesta a doxorubicina en células SK-OV-3. Células OVCAR-3 fueron tratadas con concentraciones crecientes de doxorubicina

durante 24 horas. La línea celeste corresponde las células SK-OV-3 tratadas únicamente con doxorubicina; la línea morada corresponde a células SK-OV-3 tratadas con 200 μM de etomoxir por 48 horas y 24 horas con doxorubicina; y la línea rosada corresponde a células SK-OV-3 tratadas con 80 μM de orlistat por 48 horas y 24 horas con doxorubicina. A) Gráfico dosis-respuesta a doxorubicina en células SK-OV-3 sin y con tratamiento a orlistat y etomoxir. B) Gráfico porcentaje de inhibición a doxorubicina en células SK-OV-3 sin y con tratamiento a orlistat y etomoxir. Las barras de error indican SEM. N=3. Experimento realizado por triplicado

Tabla 3. Valores de IC_{50} obtenidos para doxorubicina en células SK-OV-3 sin tratar y tratadas con orlistat y etomoxir.

Condición	IC_{50} (μM)
DOX (control)	0.895 ± 0.315
DOX + 80 μM orlistat	18.780 ± 9.397
DOX + 200 μM etomoxir	1.424 ± 0.435

7. DISCUSIÓN

La reprogramación metabólica de las células cancerosas ha ganado atención como un objetivo principal en el tratamiento del cáncer (Boroughs & DeBerardinis, 2015). Las células cancerosas enfrentan la necesidad de adaptarse a las cambiantes circunstancias impuestas por las diversas etapas del desarrollo del cáncer y el microambiente circundante para satisfacer con éxito las demandas de proliferación celular. Entre los aspectos más críticos de esta adaptación se encuentra la reprogramación metabólica que experimentan estas células, la cual es crucial para respaldar la supervivencia y proliferación celular (Vander Heiden & DeBerardinis, 2017). Este proceso de reprogramación metabólica está íntimamente influenciado por la disponibilidad de nutrientes en el entorno local de las células cancerosas. Tanto la presencia como la abundancia de estos nutrientes determinarán el fenotipo metabólico que las células cancerosas adoptan para sobrellevar las distintas etapas del proceso tumorigénico (Elia et al., 2018; Lorendeau et al., 2015).

Mediante análisis metabolómicos, se pudo determinar una marcada diferencia en el perfil metabólico entre las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3. Así, se determinó que OVCAR-3 exhibe un perfil metabólico mayoritariamente glicolítico, mientras que SK-OV-3 muestra una orientación metabólica más hacia el metabolismo lipídico (Alarcon-Zapata, 2023).

En una búsqueda de los mecanismos de resistencia en células SK-OV-3, decidimos realizar un análisis lipidómico con el propósito de contrastar características lipídicas entre las células OVCAR-3 y SK-OV-3. El objetivo primordial se centró en la identificación y correlación de la expresión lipídica con la agresividad inherente a estas células cancerosas. Observamos que existe una mayor expresión lipídica en las células SK-OV-3, así como la presencia de lípidos no detectados en las células OVCAR-3. Las células SK-OV-3 presentan una diversidad de lípidos pertenecientes a las familias de glicerofosfolípidos, esfingolípidos, glicerolípidos y esteroides, mientras que los ácidos grasos se encontraban presentes en ambas líneas celulares, pero regulados al alza en SK-OV-3. La clase lipídica predominante

fue la de los glicerofosfolípidos, correspondiendo al 55% de los lípidos identificados. Los glicerofosfolípidos están compuestos fosfolípidos, triacilgliceroles, diacilgliceroles, esfingolípidos y esteroides, los cuales desempeñan funciones cruciales en las membranas celulares, así como en los sistemas de almacenamiento de energía, señalización celular y modulación de la estructura y función proteica. Sin embargo, estas propiedades se ven amplificadas y alteradas en el contexto del cáncer. Las células cancerosas, caracterizadas por su rápida proliferación, demandan una mayor capacidad biosintética y disponibilidad de sustratos para duplicar el contenido lipídico de sus membranas durante cada ciclo de división celular (Ridgway, 2013).

Observamos que dentro de los lípidos identificados por *LipidBlast* regulados al alza y expresados solamente en SK-OV-3 para el modo de ionización ESI+ correspondían a fosfatidilcolinas (PC), destacando PC 34:1|PC 16:0_18:1, PC 32:1|PC 16:0_16:1, PC 34:1 y PC 30:0|PC 14:0_16:0. Estas PC se diferencian según el número total de carbonos y el número de enlaces dobles presentes en las cadenas de los ácidos grasos. La fosfatidilcolina (PC) es un glicerofosfolípido, caracterizado por su estructura compuesta por una cabeza de colina y un grupo fosfato unido a dos cadenas de ácidos grasos. En condiciones fisiológicas, la colina es un nutriente esencial adquirido a través de la dieta o mediante la metabolización de lípidos que la contienen. Una vez ingresada en la célula, la colina principalmente se destina a la síntesis de PC. Este fosfolípido se distribuye asimétricamente a lo largo de la membrana de la bicapa lipídica, representando aproximadamente el 40% al 50% del total de fosfolípidos presentes. Además de su función como componente estructural, la PC actúa como precursor de otros fosfolípidos esenciales en la membrana celular, tales como la esfingomielina (SM) y la fosfatidiletanolamina (PE), destacando su papel crítico como fuente directa o indirecta de elementos constitutivos para la integridad de las membranas celulares (Saito et al., 2022). Esto respalda nuestros resultados puesto que observamos un aumento en la expresión de PC, SM y PE en las células SK-OV-3.

La PC también desempeña un papel importante como fuente de segundos mensajero lipídicos; el metabolismo de la PC produce moléculas de señalizadoras como ácido fosfatídico, diacilglicerol (DAG), lisofosfatidilcolina (lyso-PC) y ácido araquidónico (AA), los cuales tienen efector protumorales. El incremento de la PC en células cancerosas inicialmente se interpretaba como una respuesta para satisfacer las demandas de crecimiento acelerado, debido a que el aumento en el consumo de colina y la secreción de PC por parte de las células cancerosas se correlacionaban positivamente con las tasas de proliferación celular (Jain et al., 2012). En un estudio *in vitro*, se observó que las células no malignas que tienen altas tasas de proliferación mantienen niveles más bajo de fosfocolina y colina total en comparación con las células cancerosas (Daly et al., 1987), lo que sugiere que el metabolismo alterado de la colina no solo promueve la proliferación celular, sino también la transformación maligna y la progresión del cáncer (Glunde et al., 2011). Además, la acumulación de PC se ha asociado con un fenotipo de cáncer más agresivo (Aboagye & Bhujwalla, 1999; Ackerstaff et al., 2001). Nuevamente, estos hallazgos apoyan nuestros resultados ya que hemos observado una sobreexpresión regulada al alza de PC específicamente en células SK-OV-3 en comparación con OVCAR-3. Esta distinción es importante, dado a que las células SK-OV-3 exhibe un perfil más invasivo y agresivo en contraste con las células OVCAR-3 (Ahmed & Stenvers, 2013).

Con respecto a la resistencia que presenta SK-OV-3 a drogas antineoplásicas, se observó que el silenciamiento de la colina quinasa- α (ChoK- α) aumentó significativamente la sensibilidad a cisplatino, paclitaxel y doxorubicina en células SK-OV-3 resistentes a cisplatino (Granata et al., 2014). La ChoK- α es una enzima que está involucrada en la síntesis de PC, catalizando la fosforilación de la colina para producir fosfocolina, un paso crucial en la biosíntesis de PC (Saito et al., 2022). Se plantea que la modulación descendente de la ciclina A1 después del silenciamiento de ChoK- α podría afectar la capacidad de las células para detener el ciclo celular para reparar el ADN después de un daño en el ADN. De hecho, p53 después de ser activado por señales de daño en el ADN, puede dirigirse a la ciclina

A1 como parte de su respuesta reguladora, conllevando a la detención del ciclo celular en la fase G2/M (Rivera et al., 2006).

Otro lípido que se encontró regulado al alza en las células SK-OV-3 fue la esfingomielina SM 34:2;O2. Las esfingomielinas (SM) representan la clase más abundante de esfingolípidos en las células. Se sintetizan de *novo* a partir de las ceramidas (CER) y se hidrolizan en CER, moléculas que desempeñan funciones cruciales en la proliferación y apoptosis celular (Bienias et al., 2016). Se ha observado una disminución en los niveles de CER en tumores de ovario, mientras que las SM son elevadas en comparación con el tejido sano (Fong et al., 2011; Prinetti et al., 2006). También se ha reportado altos niveles de SM en líneas celulares de cáncer de ovario resistente a paclitaxel (Huang et al., 2016). Asimismo, se ha vinculado la actividad de la esfingomielinasa ácida, la enzima que convierte las SM en CER, con la resistencia al cisplatino en tumores ováricos (Dai et al., 2015; Huang et al., 2016).

El cáncer de ovario se caracteriza por su rápida y extensa diseminación en la cavidad peritoneal. La ascitis crea un entorno tumoral peculiar que facilita la acumulación de diversos factores que promueven el cáncer, como citoquinas, proteínas y metabolitos. Esta ascitis es rica en lípidos, lo que induce a las células cancerosas a modificar su metabolismo hacia la utilización de lípidos. Esta adaptación metabólica se logra a través de la síntesis lipogénica de *novo* y la activación de rutas catabólicas (Ji et al., 2020).

Tal como se mencionó anteriormente, se conoce que las células de cáncer de ovario expresan altos niveles de ácido graso sintasa (FASN), cuya función es catalizar la síntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir de precursores de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH, además de ser la enzima limitante de la velocidad para la producción endógena de ácidos grasos de *novo* (Grunt et al., 2020; Maier et al., 2006).

Orlistat actúa como un inhibidor irreversible formando un aducto covalente con la serina activa del dominio tioesterasa de FASN (Pemble et al., 2007). Además de orlistat, encontramos otros inhibidores de FASN, como G28UCM, un derivado

sintético del galato de epigallocatequina que interacciona con el dominio β -cetoacil reductasa de FASN (Puig et al., 2011), y Fasnall, una tiofenopirimidina diseñada para interferir específicamente con la unión al cofactor NADPH (Alwarawrah et al., 2016). Estas drogas han demostrado reducir el crecimiento y la supervivencia de las células de cáncer de ovario. Sin embargo, para este estudio, se optó por utilizar orlistat como inhibidor de FASN, dado a su aprobación por la FDA como fármaco contra la obesidad y su disponibilidad en el mercado, lo que lo convierte en un fármaco más accesible. Igualmente, no existen las investigaciones suficientes en células de cáncer de ovario resistentes a DOX.

Encontramos que orlistat induce una disminución en la viabilidad y proliferación celular de una manera dependiente de la dosis. No obstante, en el caso de la línea celular SK-OV-3, se observó una reducción de la viabilidad celular solo en la concentración máxima investigada (100 μ M), mientras que en OVCAR-3 observamos los efectos citotóxicos a partir de la concentración 40 μ M. El tratamiento con orlistat detuvo la proliferación celular tanto de OVCAR-3 como de SK-OV-3. Cuando utilizamos la concentración de 30 μ M de orlistat para ambas líneas celulares, se evidenció una detención más marcada en OVCAR-3 en comparación con SK-OV-3. Pero, cuando SK-OV-3 se trató con 80 μ M, la detención de la proliferación celular comenzó a partir del segundo día, lo que sugiere un posible incremento en la apoptosis debido a la dosis. La literatura respalda la inducción de la apoptosis dependiente de la dosis por orlistat en células de cáncer de mama (Menendez et al., 2005). A pesar de este posible efecto apoptótico en SK-OV-3, es relevante destacar que el número de células permaneció dentro del mismo rango durante los 5 días de tratamiento, confirmando la detención de la proliferación celular.

La detención dosis-dependiente de la proliferación celular también ha sido observada al emplear los inhibidores G28UCM y Fasnall en las líneas celulares 2780, OVCAR-3 y SK-OV-3 después de un tratamiento de 72 horas con dichas drogas (Grunt et al., 2021). Por lo tanto, independientemente del inhibidor específico

de FASN utilizado, la supresión de la síntesis de ácidos grasos conlleva a una notable reducción en la proliferación celular de células de cáncer de ovario.

Se ha investigado que orlistat detiene la proliferación en la etapa G1/S, a través de la vía Rb y ocasiona una reducción en la síntesis del ADN, seguida de apoptosis mediada por receptores mediante la activación de caspasas-8. La proteína del Retinoblastoma (Rb) es un inhibidor de la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. En células de cáncer de mamas tratadas con orlistat, encontraron una fosforilación reducida de Rb y niveles elevados del complejo Rb y E2F-1 (Knowles et al., 2004).

Tal como observamos en literatura y en nuestros resultados, es notable la dependencia de las células cancerosas en la síntesis hiperactiva de lípidos de *novo* para sostener procesos vitales como la biogénesis, el crecimiento y la supervivencia de la membrana celular (Kuhajda, 2006). En particular, los ácidos grasos han adquirido importancia en los últimos años debido a su capacidad para generar coenzimas redox, como NADH, NADPH y FADH₂, a tasas superiores por unidad en comparación con la glucosa (De Oliveira & Liesa, 2020). Estas moléculas desempeñan roles cruciales en la producción de ATP, procesos anabólicos y actividades antioxidantes, cuales son esenciales en la regulación del crecimiento y proliferación celular. Se ha observado que varios tipos de tumores recurren a la oxidación de ácidos grasos como su principal fuente de energía (Shim et al., 2022). Entre las enzimas participantes de este proceso, encontramos la carnitina palmitoiltransferasa (CPT), la cual presenta dos isoformas que se localizan principalmente en las mitocondrias.

La isoforma CPT1A destaca como un punto de interés significativo en el estudio del cáncer de ovario debido a su elevada expresión en la mayoría de las líneas celulares de cáncer de ovario y en los carcinomas serosos primarios de ovario. Este fenómeno ha sido corroborado por análisis de datos genómicos del cáncer de ovario provenientes del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), los cuales revelan que una alta expresión de ARNm de CPT1A se correlaciona con una

disminución en la supervivencia general de las pacientes afectadas (Shao et al., 2016).

Etomoxir es un derivado del ácido oxirano carboxílico que inhibe irreversiblemente la actividad de CPT1A, impidiendo así el transporte de ácidos grasos hacia las mitocondrias y limitando su catabolismo a través de la β -oxidación (Turnbull et al., 1984; Wolf & Engel, 1985). Esta acción desencadena un mecanismo compensatorio que favorece una oxidación más eficiente de la glucosa para la generación de energía. Como consecuencia de este proceso, etomoxir ha sido empleado en contextos clínicos como un agente hipoglucemiante en el tratamiento de la diabetes mellitus (Estan et al., 2014; Hübinger et al., 1997).

El tratamiento con etomoxir también demostró una reducción en la viabilidad y proliferación celular, lo cual fue dependiente de la dosis en ambas líneas celulares estudiadas. A la concentración de 200 μ M, etomoxir redujo la viabilidad celular cerca del 60% en ambas líneas. A 100 μ M, el tratamiento con etomoxir detuvo la proliferación celular en OVCAR-3 después del tercer día, y en SK-OV-3, después del cuarto día. Notablemente, OVCAR-3 mostró ser más sensible al tratamiento con etomoxir, resultando en inducción de muerte celular. Por otro lado, el tratamiento con 200 μ M detuvo la proliferación en ambas líneas celulares desde el segundo día. Interesantemente, el tratamiento prolongado con etomoxir resultó en muerte celular en ambas líneas.

Se ha reportado en la literatura que el etomoxir, a una concentración de 200 μ M, inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones, lo que resulta en una disminución en la proliferación celular, independientemente de la β -oxidación de ácidos grasos. Investigaciones realizadas en células de cáncer de mama han evidenciado que dosis bajas de etomoxir (10 μ M) bloquean eficientemente la oxidación de ácidos grasos en un 90%, pero no reducen la proliferación celular. Esto sugiere que a dosis bajas, las células tienen la capacidad de ajustar su absorción y utilización de otros nutrientes para compensar la pérdida de ácidos grasos (Yao et al., 2018).

En células de leucemia mieloide aguda humana, se observó que las concentraciones de etomoxir entre 25 y 100 μM tienen efectos nulos en el contenido neto de ATP, mientras que a 200 μM se produce una disminución aproximada del 20% tras 4 horas de tratamiento (Estan et al., 2014). Por eso, sugerimos que la muerte celular observada en las células OVCAR-3 y SK-OV-3 tras 5 días de tratamiento con etomoxir se debe al agotamiento de ATP. Además, se ha informado que el etomoxir puede provocar estrés oxidativo debido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular, activando y potenciando vías apoptóticas (Pike et al., 2011).

A nivel intracelular, la expresión anormal de enzimas metabólicas claves involucradas en la ingesta, síntesis, oxidación y almacenamiento de ácidos grasos en las células de cáncer de ovario ha sido vinculada con propiedades promotoras de tumores (Ji et al., 2020). Entre estas enzimas se destacan CD36, FASN, CPT1A y CPT1B, cuyos niveles de expresión varían según la naturaleza y la agresividad del cáncer. Con el propósito de explorar posibles diferencias en la expresión basal de estas enzimas entre una línea celular sensible, OVCAR-3, y una línea resistente, SK-OV-3, realizamos un estudio comparativo. Nuestros hallazgos revelaron que el gen CD36 presenta una expresión significativamente mayor en SK-OV-3, en comparación con OVCAR-3. Por otro lado, observamos que el gen FASN mostraba una mayor expresión en las células OVCAR-3 en contraste con las células SK-OV-3. En literatura, se ha mencionado que tanto en OVCAR-3 como en SK-OV-3 (también en otras líneas de cáncer de ovario) existe una sobreexpresión de estas enzimas, aunque no se ha establecido una relación entre el comportamiento de la línea celular y la expresión diferencial de las enzimas. No obstante, se ha señalado una conexión entre la sensibilidad a inhibidores y los niveles de la enzima de interés, como FASN, señalando que esta relación puede variar según la línea celular específica (Veigel et al., 2015).

La creciente evidencia muestra que las células cancerosas reprograman por completo su metabolismo en función de la disponibilidad de nutrientes y productor metabólicos. Por ende, nos propusimos investigar la adaptación metabólica de las

células OVCAR-3 y SK-OV-3, que exhiben fenotipos metabólicos distintos, frente al tratamiento con orlistat y etomoxir. Para ello, evaluamos la expresión de ARNm de las enzimas lipídicas CD36, FASN, CPT1A y CPT1B, así como las enzimas glicolíticas GLUT1, HK2, PKM y LDHA, mediante RT-qPCR.

Nuestros resultados revelan que las células OVCAR-3 no logran reprogramar su metabolismo frente a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y la β -oxidación de los mismos. Esto sugiere que, además de depender de la glicólisis, estas células también obtienen gran parte de su energía a partir de los ácidos grasos.

Encontramos que en las células SK-OV-3, la inhibición de la síntesis de ácidos grasos mediante el uso de orlistat indujo un incremento significativo en la expresión de los genes CPT1A y CPT1B. Se ha observado que el tratamiento con orlistat en tumores de cáncer de ovario no produce alteraciones en los niveles de β -hidroxibutirato y carnitina en comparación con los controles, lo que sugiere que los tumores pueden persistir en la ejecución de la β -oxidación de ácidos grasos para mantener la bioenergética tumoral (Papaevangelou et al., 2018). El β -hidroxibutirato es un cuerpo cetónico generado durante la cetogénesis, proceso metabólico en el cual el organismo descompone grasas para obtener energía en situaciones de déficit de carbohidratos. En este contexto, postulamos que la β -oxidación en estas células continúa activa tras la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y, posiblemente, se intensifica en respuesta al tratamiento con orlistat.

Resulta notable que, además, se haya observado un incremento significativo en la expresión del gen FASN tras el tratamiento con orlistat, fenómeno que se acentuó a las 48 horas de tratamiento. En un estudio llevado a cabo en líneas celulares de cáncer de ovario, se observó que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos mediante el uso de otros inhibidores de la enzima FASN, como G28UCM (un derivado sintético del galato de epigallocatequina que interacciona con el dominio β -cetoacil reductasa de FASN) (Puig et al., 2011), y Fasnall (una tiofenopirimidina diseñada para interferir específicamente con la unión al cofactor NADPH) (Alwarawrah et al., 2016), no produjo alteraciones en los niveles de diversas enzimas lipídicas, incluida FASN (Grunt et al., 2021). Por lo tanto, este hallazgo

refuerza nuestros resultados, evidenciando que, independiente del mecanismo de acción de estas drogas, las células son capaces de compensar el bloqueo de FASN aumentando la expresión de su ARN mensajero, y posiblemente de su proteína, para contrarrestar dicho efecto.

Por otro lado, se observó que la inhibición de FASN conlleva a una disminución en la expresión del gen CD36, un fenómeno que también fue documentado en el estudio realizado por *Grunt et al.*, en el que se constató que la expresión de CD36 se mantiene en niveles iniciales y que la absorción de lípidos se regula negativamente. Estos descubrimientos llevan a concluir que las células de cáncer de ovario son extremadamente sensibles a la interferencia con la función de FASN (Grunt et al., 2021).

La inhibición de la enzima FASN no solo afecta el metabolismo lipídico, sino que también induce cambios en la expresión de ARNm de diversas enzimas glicolíticas, como GLUT1, HK2, PKM y LDHA, en células SK-OV-3. Por otro lado, en las células OVCAR-3, la inhibición de FASN con orlistat resulta en una disminución en la expresión de los genes de GLUT1, PKM y LDHA después de 48 horas de tratamiento. Además, se ha observado que el uso de G28UCM para inhibir FASN reduce la expresión de algunas enzimas glicolíticas en células SK-OV-3 después de 8 horas de tratamiento, pero esta disminución se revierte y aumenta después de 24 horas, destacando que la regulación de las enzimas glicolíticas mediada por fármacos fue más pronunciada en SK-OV-3 que en OVCAR-3. Esta disparidad en la expresión de genes glicolíticos entre ambas líneas celulares pueden atribuirse a sus distintas dependencias de la glicólisis para el metabolismo (Grunt et al., 2020). Se sabe que para la síntesis de ácidos grasos de *novo*, la glucosa cumple un rol fundamental. La glucosa se convierte en acetil-CoA en la matriz mitocondrial para sintetizar citrato en el ciclo de Krebs. En consecuencia, la glicólisis está dirigida para respaldar la producción de acetil-CoA necesaria para la síntesis de ácidos grasos (Ta & Seyfried, 2015). Por ende, este aumento nos está sugiere que las células SK-OV-3 tienen la capacidad de adaptarse metabólicamente la utilización de sustratos generados por otras vías metabólicas, como la glicólisis.

La disminución significativa en la expresión del gen FASN se observó a partir de las 24 horas de tratamiento con etomoxir en células SK-OV-3. Aunque actualmente no se ha investigado específicamente la expresión de FASN después del tratamiento con etomoxir en el contexto del cáncer, estudios previos han demostrado una disminución en la expresión del ARNm de FASN tras 18 horas de tratamiento con etomoxir en células del cúmulo bovino (Brisard et al., 2014). El citrato, producto metabólico de la β -oxidación de los ácidos grasos, puede seguir dos vías metabólicas: ingresar al ciclo de Krebs o participar en la síntesis de ácidos grasos. Para que el citrato se convierta en malonil-CoA, se requiere una serie de reacciones enzimáticas específicas. Este proceso juega un papel crucial en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, ya que el malonil-CoA es un intermediario clave en la elongación de cadenas de ácidos grasos y en la biosíntesis de ácidos grasos saturados. Por lo tanto, sugerimos que la expresión de FASN se debe a la falta de citrato y/o malonil-CoA en las células cancerosas (De Oliveira & Liesa, 2020).

El propósito de estudiar la expresión de los genes lipídicos y glicolíticos en células SK-OV-3 tras 24 y 48 horas de tratamiento con orlistat y etomoxir fue para discernir posibles efectos compensatorios de esta célula frente a la reprogramación metabólica inducida y evitar sacar conclusiones prematuras en respuesta a efectos agudos observados a las 24 horas. Se ha observado un aumento en la expresión de CPT1A en células cancerosas asociadas a ascitis de ratones con cáncer de ovario tratados con etomoxir sugiriendo una regulación compensatoria positiva en células cancerosas que persisten tras el tratamiento (Sawyer et al., 2020). Además, en un estudio realizado en células derivadas de cáncer de próstata, que comparte similitudes metabólicas con el cáncer de ovario, se encontró que el tratamiento con etomoxir durante 24 horas también aumentaba la expresión de CPT1A, reflejando una respuesta compensatoria al tratamiento (Schlaepfer et al., 2015). Nuestros resultados respaldan estos hallazgos, dado que tras 24 horas de tratamiento con etomoxir, también observamos un significativo aumento en el ARNm de CPT1A. Sin embargo, tras las 48 horas de tratamiento con etomoxir, la expresión del gen CPT1A regresó a niveles basales. Curiosamente, la expresión del ARNm de CPT1B

aumentó tras las 48 horas de tratamiento. La isoforma CPT1A se expresa mayoritariamente en hígado, mientras que la isoforma CPT1B se expresa en tejido muscular (Hishida et al., 2019). Ambas isoformas comparten una afinidad por los sustratos de carnitina y acil-CoA de cadena larga, sin embargo, se observa una diferencia en la afinidad hacia el sustrato carnitina, siendo esta más débil en CPT1B. Además, la actividad de ambas isoformas es inhibida por malonil-CoA, pero la sensibilidad a la inhibición por malonil-CoA es de 30 a 100 veces más elevada en CPT1B en comparación a CPT1, (McGarry & Brown, 1997; McGarry et al., 1983) por lo que la actividad de CPT1B depende únicamente de las variaciones en las concentraciones del inhibidor. Se sugiere que el incremento en la expresión del ARNm de CPT1B, consecuente a la reducción en la expresión de CPT1A, se origina como respuesta compensatoria ante la inhibición de CPT1A inducida por etomoxir. Las células SK-OV-3 parecen intentar una adaptación metabólica frente a la inhibición de la β -oxidación, incrementando la expresión de otra isoforma que pueda sustituir la función de CPT1A en la oxidación de ácidos grasos para la producción de energía. Sin embargo, estas células no logran una adaptación completa, como se evidencia en la Figura 6-7B, donde se observa que la inhibición prolongada de la β -oxidación conduce finalmente a la muerte celular.

La disminución significativa en la expresión del gen FASN se observó a partir de las 24 horas de tratamiento con etomoxir en células SK-OV-3. Aunque actualmente no se ha investigado específicamente la expresión de FASN después del tratamiento con etomoxir en el contexto del cáncer, estudios previos han demostrado una disminución en la expresión del ARNm de FASN tras 18 horas de tratamiento con etomoxir en células del cúmulo bovino (Brisard et al., 2014). El citrato, producto metabólico de la β -oxidación de los ácidos grasos, puede seguir dos vías metabólicas: ingresar al ciclo de Krebs o participar en la síntesis de ácidos grasos. Para que el citrato se convierta en malonil-CoA, se requiere una serie de reacciones enzimáticas específicas. Este proceso juega un papel crucial en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, ya que el malonil-CoA es un intermediario clave en la elongación de cadenas de ácidos grasos y en la biosíntesis de ácidos grasos saturados. Por lo tanto, sugerimos que la expresión de FASN se debe a la

falta de citrato y/o malonil-CoA en las células cancerosas (De Oliveira & Liesa, 2020).

La expresión del gen CD36 no mostró cambios significativos a las 24 horas de tratamiento con etomoxir en las células SK-OV-3, sin embargo, se observó una disminución notable a las 48 horas. Similarmente a FASN, hay una escasez de estudios que investiguen la expresión de CD36 tras la inhibición de la β -oxidación en el contexto del cáncer. Por lo tanto, proponemos que el bloqueo de la oxidación de ácidos grasos conlleva a una reducción tanto en la síntesis como en la captación de ácidos grasos proveniente del entorno exógeno.

Con respecto a la medición de los genes glicolíticos, observamos que el tratamiento con etomoxir durante un período de 24 horas conduce a un aumento en la expresión de los genes GLUT1, HK2, PKM y LDHA en las células SK-OV-3. Se ha documentado previamente que la actividad de etomoxir, en concentraciones que oscilan entre 25 y 200 μ M, inhibe la actividad mitocondrial de manera dependiente de la dosis, con un ligero aumento concomitante en la formación de lactato en células de leucemia mieloide aguda humana (Estan et al., 2014). Dado que las células SK-OV-3 han demostrado compartir similitudes metabólicas con las células mencionadas anteriormente, se presume que el aumento en la expresión génica podría representar un mecanismo adaptativo de la maquinaria glicolítica. Este mecanismo probablemente tiene como objetivo mantener la producción de ATP ante la inhibición de la β -oxidación inducida por etomoxir. Sin embargo, al prolongar el tratamiento a 48 horas, observamos una drástica disminución en la expresión de los genes mencionados. Este hallazgo subraya que, a pesar de intentar adaptarse mediante el incremento de la glicólisis, las células no logran ajustarse completamente a la inhibición de la β -oxidación. Esta disminución en la expresión génica coincide con la observación de una tasa de proliferación celular disminuida en las células SK-OV-3, lo que finalmente culmina en muerte celular.

Doxorrubicina (DOX) ha sido reconocida por su eficacia clínica como agente antineoplásico en el tratamiento de segunda línea en varios tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de ovario. No obstante, su citotoxicidad dosis-dependiente

presenta un desafío significativo en la práctica clínica. La administración de altas dosis de DOX en pacientes conlleva a una reducción notable en la supervivencia, además de un incremento significativo en la incidencia de efectos secundarios adversos. Además, se ha observado que existe una cierta población de células que son resistente a DOX (Meirelles et al., 2012). Este fenómeno subraya la necesidad de explorar estrategias que permitan minimizar la toxicidad asociada a DOX sin comprometer su eficacia terapéutica en el tratamiento del cáncer de ovario.

Hemos evidenciado que la inhibición selectiva de la glicólisis, mediante el uso de 2-DG, tiene un impacto sustancial en OVCAR-3, induciendo apoptosis y sensibilizando las células a DOX. En contraste, la supresión de la glicólisis en SK-OV-3 se traduce en un aumento en la resistencia a DOX, lo que resalta la capacidad de estas células para modificar su metabolismo mediante la activación y fortalecimiento de otras rutas metabólicas, como el metabolismo de los lípidos. Este efecto en las células SK-OV-3, además de contrarrestar los efectos de la inhibición de la glicólisis, podría amplificar las vías metabólicas asociadas con la resistencia a fármacos antineoplásicos (Toledo-Oñate, 2023).

Por lo tanto, hemos optado por investigar el impacto de orlistat y etomoxir, ya que se han identificado FASN y CPT1A como blancos potenciales para la terapia oncológica, destacando su papel crucial en la proliferación, la viabilidad y la respuesta a fármacos antineoplásicos en las células cancerosas.

Inicialmente, nuestro objetivo era investigar los cambios en la sensibilidad a DOX después del tratamiento con los inhibidores orlistat y etomoxir, empleando las métricas de inhibición de la tasa de crecimiento (GR), un método basado en la comparación de las tasas de crecimiento celular en presencia y ausencia de fármacos (Hafner et al., 2016). Este enfoque, además, nos permite evaluar si una droga tiene un efecto citostático o citotóxico. Sin embargo, no fue posible emplear este tipo de curva de dosis-respuesta para el análisis de la respuesta a DOX en presencia de orlistat y etomoxir. Esto se debe a que el método GR considera el número de divisiones celulares durante un período de tiempo determinado, y como observamos, ambos inhibidores detuvieron la proliferación celular a partir de las 48

horas de tratamiento, tiempo utilizado para el ensayo. Por ende, no fue posible graficar a través de las curvas GR en este contexto experimental.

Es por eso que decidimos evaluar la sensibilidad a DOX mediante los valores IC_{50} . Encontramos que tanto el tratamiento con orlistat como con etomoxir no afectaron la potencia farmacológica de DOX en las células OVCAR-3. Este efecto se atribuye principalmente al perfil metabólico de estas células, el cual está asociado principalmente a la glicólisis, tal como se demostró mediante análisis metabólicos y la inhibición de la glicólisis (Alarcon-Zapata, 2023; Toledo-Oñate, 2023). Aunque no se evidenció un efecto sinérgico entre las drogas, se observó una disminución en la viabilidad celular dentro de la población inicial de células OVCAR-3. Este hallazgo subraya la heterogeneidad presente en el cáncer, manifestando la coexistencia de diversas subpoblaciones celulares con comportamientos y perfiles metabólicos distintos dentro de un mismo tumor. Como se mencionó previamente, una parte significativa de las células OVCAR-3 muestra una dependencia predominante de la vía glicolítica, aunque también se han identificado células sensibles a la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y la β -oxidación. Este resultado refuerza las conclusiones obtenidas en relación con la proliferación celular y la expresión génica durante el tratamiento con orlistat y etomoxir.

Interesantemente, observamos que en las células SK-OV-3, caracterizadas por presentar un perfil lipídico, el tratamiento combinado de orlistat o etomoxir con DOX no logró sensibilizar las células a DOX. La DOX por sí sola mostró tener un IC_{50} de $0.895 \pm 0.315 \mu\text{M}$, mientras que la combinación de etomoxir y DOX arrojó un valor de $1.424 \pm 0.435 \mu\text{M}$. Resulta desafiante atribuir este fenómeno a una posible reprogramación metabólica, ya que el uso de etomoxir solo provocó una detención de la proliferación celular acompañada de muerte celular, junto con una reducción en la expresión de genes lipídicos y glicolíticos. Así que, esto sugiere que las células SK-OV-3 no lograron compensar el bloqueo de la β -oxidación de ácidos grasos. En la literatura se ha informado que el tratamiento combinado de etomoxir con cisplatino vuelve a sensibilizar las células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino. Se observaron curvas de dosis-respuesta a cisplatino que se desplazan

significativamente hacia la izquierda con el tratamiento en estas células cancerosas (Tan et al., 2022). Tanto el cisplatino como DOX actúan al nivel del ADN, interfiriendo con su replicación y provocando la muerte celular cancerosas. Por lo tanto, sugerimos que una de las drogas utilizadas está interfiriendo con el mecanismo de acción de la otra. Puede suceder que etomoxir esté ingresando a la célula cancerosa mediante el mismo receptor utilizado por la DOX; no obstante, hasta el momento, no se ha encontrado evidencia al respecto en la literatura científica disponible.

Por otro lado, el uso combinado de orlistat y DOX aumentó el IC_{50} $18.780 \pm 9.397 \mu M$, disminuyendo drásticamente la potencia farmacológica de DOX. Observamos que la inhibición de la síntesis de ácidos grasos, mediante el uso de orlistat, ocasionó un aumento del mensajero de enzimas involucradas en la degradación de ácidos grasos, además de contrarrestar el efecto de orlistat aumentando aún más la expresión del ARNm de FASN. Incluso, la glicólisis también se vio incrementada, aportando sustratos metabólicos y energía. Interesantemente, el incremento de la glicólisis podría estar potenciando las vías de las pentosas (PPP), el cual proporcionará intermediarios metabólicos como NADPH (Stanton, 2012). El NADPH es un componente crítico de las defensas antioxidantes, ya que proporciona la capacidad reductora necesaria para la regeneración de glutatión reducido a partir de su forma oxidada por la acción de la enzima glutatión reductasa. El glutatión (GSH) es una molécula antioxidante clave que neutraliza los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), protegiendo a las células del estrés oxidativo (Lv et al., 2019).

Por otro lado, tanto la cisteína y como la glutamina, metabolitos que se encuentra aumentado en distintos tipos de cáncer, incluido el cáncer de ovario, desempeñan papeles fundamentales como precursores metabólicos en la síntesis de glutatión. Se ha investigado que el metabolismo reductor de la glutamina también desempeña un papel en la modulación del estrés oxidativo al favorecer la producción de NADPH en las mitocondrias, lo que contribuye a neutralizar la ROS mediante la generación de glutatión (Jiang et al., 2016). La dependencia de las

células cancerosas de la β -oxidación de ácidos grasos *in vivo* se ha asociado con la promoción de la defensa antioxidante mediante la producción de NADPH, así como una mayor resistencia a fármacos antineoplásicos, tanto en glioblastoma como en cáncer gástrico (He et al., 2019; Pike et al., 2011). Además, se ha demostrado que las células SK-OV-3 exhiben niveles elevados de glutatión. Por lo tanto, sugerimos que el uso combinado de orlistat potencia vías metabólicas que generan niveles elevados de NADPH, tales como la glicólisis, la vía de las pentosas y la β -oxidación. Esto, a su vez, intensificará la síntesis de glutatión, la cual ya está elevada de manera inicial en las células SK-OV-3, contrarrestando así la ROS producidas por el mecanismo de acción de DOX (Alarcon-Zapata, 2023).

8. CONCLUSION Y PROYECCIONES

La aplicación de la lipidómica como una herramienta ómica nos proporciona información detallada sobre las vías metabólicas y de señalización lipídica que podrían estar desreguladas en el cáncer, lo que revela posibles biomarcadores útiles para el diagnóstico temprano, la predicción del pronóstico y el desarrollo de terapias innovadoras.

En este estudio, examinamos la expresión de lípidos en dos líneas celulares de cáncer de ovario: OVCAR-3, sensible a drogas antineoplásicas, y SK-OV-3, resistente a drogas. Nuestros hallazgos revelaron un aumento en la concentración de lípidos en las células resistentes en comparación con las células sensibles, con una marcada predominancia de la clase lipídica de los glicerofosfolípidos, especialmente las fosfatidilcolinas (PC). Existe correlación con un incremento en la síntesis de fosfatidilcolinas y una mayor agresividad tumoral, así como una mayor resistencia a la quimioterapia. Por lo tanto, enfocarse en las fosfatidilcolinas podría ser un área de investigación crucial para futuras investigaciones en este campo.

Aunque se han logrado avances en los tratamientos contra el cáncer, la aparición de resistencia a las drogas antineoplásicas en las células cancerosas sigue siendo un desafío importante. Hasta el momento, prevenir la quimiorresistencia sigue siendo la necesidad clínica más urgente en el tratamiento farmacológico del cáncer (Yoo & Han, 2022).

La adaptación a las drogas antineoplásicas y la proliferación de las células cancerosas requiere cambios metabólicos significativos. Tradicionalmente, se ha considerado que la reprogramación metabólica desencadenada por estos tratamientos es un efecto secundario de los procesos biológicos generados por los fármacos, y no una causa directa de la resistencia a los mismos. Sin embargo, investigaciones recientes, respaldadas por nuestros hallazgos, han revelado que la presión terapéutica ejercida por un fármaco específico induce una reprogramación metabólica en las células cancerosas, lo que promueve su resistencia a dicho tratamiento (Zaal & Berkers, 2018; Zhao et al., 2013).

Las células resistentes tienen la capacidad de reprogramar su metabolismo celular frente al bloqueo de la síntesis de ácidos grasos mediante el uso de orlistat, potenciando otras vías asociadas al metabolismo lipídico, como la oxidación de ácidos grasos. Tanto la síntesis de ácidos grasos como la glicólisis son aprovechadas por las células cancerosas para proporcionar energía para su proliferación y crecimiento celular. Sin embargo, la inhibición de la β -oxidación mediante etomoxir conduce un agotamiento del ATP en las células resistentes, lo que a largo plazo puede resultar en la muerte celular, subrayando la importancia crucial de esta vía metabólica en el cáncer.

Lamentablemente, a pesar de las sugerencias de varias investigaciones que proponen el bloqueo de la síntesis y oxidación de los ácidos grasos como posibles blancos terapéuticos para revertir la quimiorresistencia en diversos tipos de cáncer, nuestros hallazgos indican que el uso de etomoxir y orlistat no logra sensibilizar a estas células resistentes a doxorrubicina. De hecho, observamos que el tratamiento con orlistat aumentó aún más la resistencia en las células, mientras que etomoxir no provocó cambios, sugiriendo la privación completa de ácidos grasos no es beneficiosa para el tratamiento de la paciente.

Nuestros resultados podrían extrapolarse a lo que está sucediendo con la evolución del tumor en las pacientes con cáncer de ovario. Inicialmente, cuando una paciente se ha diagnosticado el cáncer en estadios tempranos, el tumor estará exhibiendo un perfil metabólico predominantemente glicolítico. A medida que el tumor va creciendo e invadiendo otros tejidos u órganos cercanos, el perfil metabólico de las células cancerosas se va reprogramando hacia un la utilización de lípidos como fuente de energía. En pacientes con cáncer de ovario, se observa comúnmente la diseminación de células cancerosas a la cavidad abdominal, lo que resulta en la formación de células flotantes que inducen cambios en el epitelio peritoneal, promoviendo así la acumulación de grandes volúmenes de ascitis. Este fluido peritoneal, generalmente rico en nutrientes de alta energía como ácidos grasos y lípidos, proporciona un entorno propicio para el crecimiento de las células cancerosas (Chen et al., 2019). Por lo tanto, las células de cáncer de ovario

requieren grandes cantidades de lípidos para sobrevivir y crecer. No sólo importan lípidos del huésped, sino que también producen lípidos de *novo* (Grunt et al., 2021). Sin embargo, llega un punto en el que los lípidos ambientales no son suficientes para mantener la progresión tumoral, lo cual podría agravarse por cambios en la dieta de las pacientes, induciendo una nueva reprogramación metabólica hacia el metabolismo de los aminoácidos. Se han identificado alteraciones en varias vías metabólicas en sueros de pacientes con cáncer de ovario avanzado, incluyendo el metabolismo de la histidina y el triptófano, la biosíntesis de arginina, el metabolismo de la arginina y la prolina, el metabolismo de la alanina, el aspartato y la glutamina (Plewa et al., 2017). Particularmente, se encuentran tumores capaces de sintetizar aminoácidos mediante la activación de otras vías, así como tumores con deficiencias en una o más vías de síntesis o recuperación de aminoácidos, lo que los lleva a depender del suministro extracelular de estos nutrientes, siendo el tejido muscular una fuente rica en proteínas y, por ende, en aminoácidos (Cantor et al., 2012). Este fenómeno se observa en pacientes que desarrollan caquexia, caracterizada por la pérdida de masa muscular debido a la disminución de la síntesis proteica y el aumento de su degradación (Miján de la Torre, 2016).

La inhibición de la síntesis de ácidos grasos ocasionó una disminución de la población inicial de casi un 40% de las células, pero el 60% restante reconfiguró su programa metabólico para sobrevivir y adquirir resistencia a DOX. Mientras que la β -oxidación no tuvo efecto en la sensibilización a DOX, pero si gran parte de su población inicial se redujo. Las células remanentes que sobrevivieron al tratamiento combinado probablemente reconfiguraron su metabolismo celular hacia la utilización de aminoácidos para seguir satisfaciendo sus necesidades metabólicas (Li & Zhang, 2016), volviéndolas más agresivas y resistentes a la terapia contra el cáncer.

Por lo tanto, es primordial estudiar el metabolismo celular de las células resistentes remanentes con el objetivo de ampliar el conocimiento en este campo, lo cual contribuirá a mejorar las estrategias terapéuticas dirigidas para retardar la progresión del cáncer. Este avance no solo puede mejorar la calidad de vida de las

pacientes, sino también reducir la tasa de mortalidad asociada y potencialmente revertir la quimioresistencia (Nantasupha et al., 2021).

Además, es crucial destacar que este estudio se realizó en modelos celulares, lo que implica que no se tuvieron en cuenta otros factores relevantes. La plasticidad metabólica de los tumores está influenciada por diversos elementos como la composición de la dieta, el origen tisular del tumor y el microambiente tumoral. En este último, las células cancerosas interactúan con una variedad de células, incluidas las inmunes, endoteliales y los fibroblastos (Altea-Manzano et al., 2020; Jiang et al., 2020). Por ende, los conocimientos derivados de estos modelos celulares podrían extrapolarse a sistemas más complejos, como los organoides, lo que permitiría una mejor aproximación a la situación que se presenta en los tumores del cuerpo humano en comparación con los modelos celulares utilizados.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-aleem, S., Li, X., Anstadt, M. P., Perez-Tamayo, R. A., & Lowe, J. E. (1994). Regulation of glucose utilization during the inhibition of fatty acid oxidation in rat myocytes. *Horm Metab Res*, 26(2), 88-91. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1000779>
- Aboagye, E. O., & Bhujwala, Z. M. (1999). Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 59(1), 80-84.
- Ackerstaff, E., Pflug, B. R., Nelson, J. B., & Bhujwala, Z. M. (2001). Detection of increased choline compounds with proton nuclear magnetic resonance spectroscopy subsequent to malignant transformation of human prostatic epithelial cells. *Cancer Res*, 61(9), 3599-3603.
- Aft, R. L., Zhang, F. W., & Gius, D. (2002). Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *British Journal of Cancer*, 87(7), 805-812. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600547>
- Aguilar-Gallardo, C., & Simon, C. (2013). Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Semin Reprod Med*, 31(1), 5-13. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1331792>
- Ahmed, N., & Stenvers, K. L. (2013). Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol*, 3, 256. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00256>
- Alarcon-Zapata, P. (2023). Análisis Metabolómico Utilizando UHPLC-HR-QTOF-MS en Cáncer de Ovario y la Contribución de sus Exosomas en los Mecanismos de Quimiorresistencia y Agresividad Tumoral.
- Alarcon-Zapata, P., Perez, A. J., Toledo-Oñate, K., Contreras, H., Ormazabal, V., Nova-Lamperti, E., Aguayo, C. A., Salomon, C., & Zuniga, F. A. (2023). Metabolomics profiling and chemoresistance mechanisms in ovarian cancer cell lines: Implications for targeting glutathione pathway. *Life Sci*, 333, 122166. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122166>
- Altea-Manzano, P., Cuadros, A. M., Broadfield, L. A., & Fendt, S. M. (2020). Nutrient metabolism and cancer in the in vivo context: a metabolic game of give and take. *EMBO Rep*, 21(10), e50635. <https://doi.org/10.15252/embr.202050635>
- Alwarawrah, Y., Hughes, P., Loiselle, D., Carlson, D. A., Darr, D. B., Jordan, J. L., Xiong, J., Hunter, L. M., Dubois, L. G., Thompson, J. W., Kulkarni, M. M., Ratcliff, A. N., Kwiek, J. J., & Haystead, T. A. (2016). Fasnall, a Selective FASN Inhibitor, Shows Potent Anti-tumor Activity in the MMTV-Neu Model of HER2(+) Breast Cancer. *Cell Chem Biol*, 23(6), 678-688. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.04.011>
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*, 11(6), 1101-1110. <https://doi.org/10.1002/bit.260110607>
- Arora, T., Mullangi, S., & Lekkala, M. R. (2022). Ovarian Cancer. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33620837>
- Arora, T., Mullangi, S., & Lekkala, M. R. (2024). Ovarian Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing

Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.

- Bian, X., Liu, R., Meng, Y., Xing, D., Xu, D., & Lu, Z. (2021). Lipid metabolism and cancer. *J Exp Med*, 218(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20201606>
- Bienias, K., Fiedorowicz, A., Sadowska, A., Prokopiuk, S., & Car, H. (2016). Regulation of sphingomyelin metabolism. *Pharmacol Rep*, 68(3), 570-581. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.12.008>
- Boroughs, L. K., & DeBerardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*, 17(4), 351-359. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brisard, D., Chesnel, F., Elis, S., Desmarchais, A., Sánchez-Lazo, L., Chasles, M., Maillard, V., & Uzbekova, S. (2014). Tribbles expression in cumulus cells is related to oocyte maturation and fatty acid metabolism. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-44>
- Cai, Y., Wang, J., Zhang, L., Wu, D., Yu, D., Tian, X., Liu, J., Jiang, X., Shen, Y., Zhang, L., Ren, M., & Huang, P. (2015). Expressions of fatty acid synthase and HER2 are correlated with poor prognosis of ovarian cancer. *Med Oncol*, 32(1), 391. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0391-z>
- Cantor, J. R., Panayiotou, V., Agnello, G., Georgiou, G., & Stone, E. M. (2012). Engineering reduced-immunogenicity enzymes for amino acid depletion therapy in cancer. *Methods Enzymol*, 502, 291-319. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416039-2.00015-x>
- Chatterjee, K., Zhang, J., Honbo, N., & Karliner, J. S. (2010). Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, 115(2), 155-162. <https://doi.org/10.1159/000265166>
- Chen, R. R., Yung, M. M. H., Xuan, Y., Zhan, S., Leung, L. L., Liang, R. R., Leung, T. H. Y., Yang, H., Xu, D., Sharma, R., Chan, K. K. L., Ngu, S. F., Ngan, H. Y. S., & Chan, D. W. (2019). Targeting of lipid metabolism with a metabolic inhibitor cocktail eradicates peritoneal metastases in ovarian cancer cells. *Commun Biol*, 2, 281. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0508-1>
- Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese, R. V., Jr. (2013). Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell Metab*, 18(2), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.05.017>
- Dai, S. Y., Liu, J. J., Sun, X. F., & Wang, N. (2015). Acid sphingomyelinase, a novel negative biomarker of ovarian cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(11), 2076-2083.
- Daly, P. F., Lyon, R. C., Faustino, P. J., & Cohen, J. S. (1987). Phospholipid metabolism in cancer cells monitored by ³¹P NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, 262(31), 14875-14878.
- Damia, G., & Brogini, M. (2019). Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair. *Cancers (Basel)*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010119>

- De Oliveira, M. P., & Liesa, M. (2020). The Role of Mitochondrial Fat Oxidation in Cancer Cell Proliferation and Survival. *Cells*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/cells9122600>
- DeFilippis, R. A., Chang, H., Dumont, N., Rabban, J. T., Chen, Y. Y., Fontenay, G. V., Berman, H. K., Gauthier, M. L., Zhao, J., Hu, D., Marx, J. J., Tjoe, J. A., Ziv, E., Febbraio, M., Kerlikowske, K., Parvin, B., & Tlsty, T. D. (2012). CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues. *Cancer Discov*, 2(9), 826-839. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0107>
- Dettmer, K., Nurnberger, N., Kaspar, H., Gruber, M. A., Almstetter, M. F., & Oefner, P. J. (2011). Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies: optimization of harvesting and extraction protocols. *Anal Bioanal Chem*, 399(3), 1127-1139. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4425-x>
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D. A., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun*, 4, 2126. <https://doi.org/10.1038/ncomms3126>
- Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., & Myers, A. E. (2016). Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*, 93(11), 937-944. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281838>
- Elia, I., Doglioni, G., & Fendt, S. M. (2018). Metabolic Hallmarks of Metastasis Formation. *Trends Cell Biol*, 28(8), 673-684. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.04.002>
- Estan, M. C., Calvino, E., Calvo, S., Guillen-Guio, B., Boyano-Adanez Mdel, C., de Blas, E., Rial, E., & Aller, P. (2014). Apoptotic efficacy of etomoxir in human acute myeloid leukemia cells. Cooperation with arsenic trioxide and glycolytic inhibitors, and regulation by oxidative stress and protein kinase activities. *PLOS ONE*, 9(12), e115250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115250>
- Ezrahi, S., Aserin, A., & Garti, N. (2019). Basic principles of drug delivery systems - the case of paclitaxel. *Adv Colloid Interface Sci*, 263, 95-130. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.004>
- Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., & Subramaniam, S. (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta*, 1811(11), 637-647. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>
- Faraji, A., Dehghan Manshadi, H. R., Mobaraki, M., Zare, M., & Houshmand, M. (2016). Association of ABCB1 and SLC22A16 Gene Polymorphisms with Incidence of Doxorubicin-Induced Febrile Neutropenia: A Survey of Iranian Breast Cancer Patients. *PLOS ONE*, 11(12), e0168519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168519>
- Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P. L., & Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncol*, 6(4), 551-562. <https://doi.org/10.2217/fon.10.11>
- Fong, M. Y., McDunn, J., & Kakar, S. S. (2011). Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer. *PLoS ONE*, 6(5), e19963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019963>

- Fu, Y., Liu, S., Yin, S., Niu, W., Xiong, W., Tan, M., Li, G., & Zhou, M. (2017). The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy. *Oncotarget*, 8(34), 57813-57825. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18175>
- Glatz, J. F., & Luiken, J. J. (2017). From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. *Biochimie*, 136, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.12.007>
- Glunde, K., Bhujwala, Z. M., & Ronen, S. M. (2011). Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer*, 11(12), 835-848. <https://doi.org/10.1038/nrc3162>
- Gordon, A. N., Tonda, M., Sun, S., Rackoff, W., & Doxil Study, I. (2004). Long-term survival advantage for women treated with pegylated liposomal doxorubicin compared with topotecan in a phase 3 randomized study of recurrent and refractory epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 95(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.07.011>
- Granata, A., Nicoletti, R., Tinaglia, V., De Cecco, L., Pisanu, M. E., Ricci, A., Podo, F., Canevari, S., Iorio, E., Bagnoli, M., & Mezzanzanica, D. (2014). Choline kinase-alpha by regulating cell aggressiveness and drug sensitivity is a potential druggable target for ovarian cancer. *Br J Cancer*, 110(2), 330-340. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.729>
- Grunt, T. W., Lemberger, L., Colomer, R., López Rodríguez, M. L., & Wagner, R. (2021). The Pharmacological or Genetic Blockade of Endogenous De Novo Fatty Acid Synthesis Does Not Increase the Uptake of Exogenous Lipids in Ovarian Cancer Cells. *Front Oncol*, 11, 610885. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.610885>
- Grunt, T. W., Slany, A., Semkova, M., Colomer, R., López-Rodríguez, M. L., Wuczkowski, M., Wagner, R., Gerner, C., & Stübiger, G. (2020). Membrane disruption, but not metabolic rewiring, is the key mechanism of anticancer-action of FASN-inhibitors: a multi-omics analysis in ovarian cancer. *Scientific Reports*, 10(1), 14877. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71491-z>
- Hafner, M., Niepel, M., Chung, M., & Sorger, P. K. (2016). Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nature Methods*, 13(6), 521-527. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3853>
- Hallas-Potts, A., Dawson, J. C., & Herrington, C. S. (2019). Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas. *Scientific Reports*, 9(1), 5515. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41941-4>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hasan, N., Ohman, A. W., & Dinulescu, D. M. (2015). The promise and challenge of ovarian cancer models. *Transl Cancer Res*, 4(1), 14-28. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2015.01.02>
- He, W., Liang, B., Wang, C., Li, S., Zhao, Y., Huang, Q., Liu, Z., Yao, Z., Wu, Q., Liao, W., Zhang, S., Liu, Y., Xiang, Y., Liu, J., & Shi, M. (2019). MSC-regulated lncRNA MACC1-AS1 promotes stemness and chemoresistance through fatty acid oxidation in gastric cancer. *Oncogene*, 38(23), 4637-4654. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0747-0>

- Hishida, A., Watanabe, R., Hattori, Y., Okugawa, Y., Shirai, Y., & Miki, C. (2019). Polymorphisms in CPT1B and CPT2 have no significant effect on plasma carnitine levels in Japanese cancer patients. *Nagoya J Med Sci*, 81(3), 477-487. <https://doi.org/10.18999/nagjms.81.3.477>
- Huang, H., Tong, T. T., Yau, L. F., Chen, C. Y., Mi, J. N., Wang, J. R., & Jiang, Z. H. (2016). LC-MS Based Sphingolipidomic Study on A2780 Human Ovarian Cancer Cell Line and its Taxol-resistant Strain. *Scientific Reports*, 6, 34684. <https://doi.org/10.1038/srep34684>
- Hübinger, A., Knode, O., Susanto, F., Reinauer, H., & Gries, F. A. (1997). Effects of the carnitine-acyltransferase inhibitor etomoxir on insulin sensitivity, energy expenditure and substrate oxidation in NIDDM. *Horm Metab Res*, 29(9), 436-439. <https://doi.org/10.1055/s-2007-979072>
- Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., Kafri, R., Kirschner, M. W., Clish, C. B., & Mootha, V. K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336(6084), 1040-1044. <https://doi.org/10.1126/science.1218595>
- Ji, Z., Shen, Y., Feng, X., Kong, Y., Shao, Y., Meng, J., Zhang, X., & Yang, G. (2020). Deregulation of Lipid Metabolism: The Critical Factors in Ovarian Cancer. *Front Oncol*, 10, 593017. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.593017>
- Jiang, Y., Pan, Y., Rhea, P. R., Tan, L., Gagea, M., Cohen, L., Fischer, S. M., & Yang, P. (2016). A Sucrose-Enriched Diet Promotes Tumorigenesis in Mammary Gland in Part through the 12-Lipoxygenase Pathway. *Cancer Res*, 76(1), 24-29. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-14-3432>
- Jiang, Y., Wang, C., & Zhou, S. (2020). Targeting tumor microenvironment in ovarian cancer: Premise and promise. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1873(2), 188361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188361>
- Jolliffe, I. T. (1995). Rotation of principal components: choice of normalization constraints. *Journal of Applied Statistics*, 22(1), 29-35. <https://doi.org/10.1080/757584395>
- Kalyanaraman, B. (2020). Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biol*, 29, 101394. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101394>
- Kim, M. G., Pak, J. H., Choi, W. H., Park, J. Y., Nam, J. H., & Kim, J. H. (2012). The relationship between cisplatin resistance and histone deacetylase isoform overexpression in epithelial ovarian cancer cell lines. *J Gynecol Oncol*, 23(3), 182-189. <https://doi.org/10.3802/jgo.2012.23.3.182>
- Knowles, L. M., Axelrod, F., Browne, C. D., & Smith, J. W. (2004). A Fatty Acid Synthase Blockade Induces Tumor Cell-cycle Arrest by Down-regulating Skp2². *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30540-30545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405061200>
- Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N., & Smith, J. W. (2004). Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res*, 64(6), 2070-2075. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3645>
- Kroeger, P. T., Jr., & Drapkin, R. (2017). Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 29(1), 26-34. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000340>

- Kubicka, A., Matczak, K., & Labieniec-Watala, M. (2021). More Than Meets the Eye Regarding Cancer Metabolism. *Int J Mol Sci*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179507>
- Kuhajda, F. P. (2006). Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res*, 66(12), 5977-5980. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-05-4673>
- Kuroki, L., & Guntupalli, S. R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ*, 371, m3773. <https://doi.org/10.1136/bmj.m3773>
- Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. *Lancet*, 393(10177), 1240-1253. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32552-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2)
- Li, Z., & Zhang, H. (2016). Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(2), 377-392. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2070-4>
- Liu, H., Liu, Y., & Zhang, J. T. (2008). A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Mol Cancer Ther*, 7(2), 263-270. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0445>
- Lorendeau, D., Christen, S., Rinaldi, G., & Fendt, S. M. (2015). Metabolic control of signalling pathways and metabolic auto-regulation. *Biol Cell*, 107(8), 251-272. <https://doi.org/10.1111/boc.201500015>
- Lv, H., Zhen, C., Liu, J., Yang, P., Hu, L., & Shang, P. (2019). Unraveling the Potential Role of Glutathione in Multiple Forms of Cell Death in Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 3150145. <https://doi.org/10.1155/2019/3150145>
- Maier, T., Jenni, S., & Ban, N. (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*, 311(5765), 1258-1262. <https://doi.org/10.1126/science.1123248>
- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., & Karlan, B. Y. (2016). Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16061. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.61>
- McGarry, J. D., & Brown, N. F. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*, 244(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00001.x>
- McGarry, J. D., Mills, S. E., Long, C. S., & Foster, D. W. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J*, 214(1), 21-28. <https://doi.org/10.1042/bj2140021>
- Meirelles, K., Benedict, L. A., Dombkowski, D., Pepin, D., Preffer, F. I., Teixeira, J., Tanwar, P. S., Young, R. H., MacLaughlin, D. T., Donahoe, P. K., & Wei, X. (2012). Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2358-2363. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120733109>
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(10), 763-777. <https://doi.org/10.1038/nrc2222>

- Menendez, J. A., Vellon, L., & Lupu, R. (2005). Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene. *Annals of Oncology*, 16(8), 1253-1267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/annonc/mdi239>
- Miján de la Torre, A. (2016). El músculo, elemento clave para la supervivencia en el enfermo neoplásico. *Nutrición Hospitalaria*, 33, 11-16. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112016000700003&nrm=iso
- Munoz-Galvan, S., Felipe-Abrio, B., Verdugo-Sivianes, E. M., Perez, M., Jimenez-Garcia, M. P., Suarez-Martinez, E., Estevez-Garcia, P., & Carnero, A. (2020). Downregulation of MYPT1 increases tumor resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway and increasing the stemness. *Mol Cancer*, 19(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1130-z>
- Nantasupha, C., Thonusin, C., Charoenkwan, K., Chattipakorn, S., & Chattipakorn, N. (2021). Metabolic reprogramming in epithelial ovarian cancer. *Am J Transl Res*, 13(9), 9950-9973. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34650675>
- Natanzon, Y., Goode, E. L., & Cunningham, J. M. (2018). Epigenetics in ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*, 51, 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.08.003>
- Nath, A., Li, I., Roberts, L. R., & Chan, C. (2015). Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*, 5, 14752. <https://doi.org/10.1038/srep14752>
- Pajak, B., Siwiak, E., Soltyka, M., Priebe, A., Zielinski, R., Fokt, I., Ziemniak, M., Jaskiewicz, A., Borowski, R., Domoradzki, T., & Priebe, W. (2019). 2-Deoxy-D-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents. *Int J Mol Sci*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010234>
- Papaevangelou, E., Almeida, G. S., Box, C., deSouza, N. M., & Chung, Y. L. (2018). The effect of FASN inhibition on the growth and metabolism of a cisplatin-resistant ovarian carcinoma model. *Int J Cancer*, 143(4), 992-1002. <https://doi.org/10.1002/ijc.31392>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*, 23(1), 27-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Pemble, C. W. t., Johnson, L. C., Kridel, S. J., & Lowther, W. T. (2007). Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nat Struct Mol Biol*, 14(8), 704-709. <https://doi.org/10.1038/nsmb1265>
- Pike, L. S., Smift, A. L., Croteau, N. J., Ferrick, D. A., & Wu, M. (2011). Inhibition of fatty acid oxidation by etomoxir impairs NADPH production and increases reactive oxygen species resulting in ATP depletion and cell death in human glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta*, 1807(6), 726-734. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.022>
- Pillai, S. R., Damaghi, M., Marunaka, Y., Spugnini, E. P., Fais, S., & Gillies, R. J. (2019). Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer*

- Metastasis Rev*, 38(1-2), 205-222. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09792-7>
- Plewa, S., Horała, A., Dereziński, P., Klupczynska, A., Nowak-Markwitz, E., Matysiak, J., & Kokot, Z. J. (2017). Usefulness of Amino Acid Profiling in Ovarian Cancer Screening with Special Emphasis on Their Role in Cancerogenesis. *Int J Mol Sci*, 18(12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122727>
- Prinetti, A., Millimaggi, D., D'Ascenzo, S., Clarkson, M., Bettiga, A., Chigorno, V., Sonnino, S., Pavan, A., & Dolo, V. (2006). Lack of ceramide generation and altered sphingolipid composition are associated with drug resistance in human ovarian carcinoma cells. *Biochem J*, 395(2), 311-318. <https://doi.org/10.1042/bj20051184>
- Puig, T., Aguilar, H., Cufí, S., Oliveras, G., Turrado, C., Ortega-Gutiérrez, S., Benhamú, B., López-Rodríguez, M. L., Urruticoechea, A., & Colomer, R. (2011). A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast Cancer Res*, 13(6), R131. <https://doi.org/10.1186/bcr3077>
- Ridgway, N. D. (2013). The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 48(1), 20-38. <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.735643>
- Rivera, A., Mavila, A., Bayless, K. J., Davis, G. E., & Maxwell, S. A. (2006). Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci*, 63(12), 1425-1439. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-5521-5>
- Rodríguez Carranza, R. (2015). Doxorubicina: Antineoplásicos. In *Vademécum Académico de Medicamentos*. McGraw-Hill Education. accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1113054512
- Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, 53(3), 441-442. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>
- Saito, R. F., Andrade, L. N. S., Bustos, S. O., & Chammas, R. (2022). Phosphatidylcholine-Derived Lipid Mediators: The Crosstalk Between Cancer Cells and Immune Cells. *Front Immunol*, 13, 768606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.768606>
- Sambasivan, S. (2022). Epithelial ovarian cancer: Review article. *Cancer Treatment and Research Communications*, 33, 100629. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2022.100629>
- Samudio, I., Harmancey, R., Fiegl, M., Kantarjian, H., Konopleva, M., Korchin, B., Kaluarachchi, K., Bornmann, W., Duvvuri, S., Taegtmeier, H., & Andreeff, M. (2010). Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest*, 120(1), 142-156. <https://doi.org/10.1172/JCI38942>
- Sawyer, B. T., Qamar, L., Yamamoto, T. M., McMellen, A., Watson, Z. L., Richer, J. K., Behbakht, K., Schlaepfer, I. R., & Bitler, B. G. (2020). Targeting Fatty Acid Oxidation to Promote Anoikis and Inhibit Ovarian Cancer Progression. *Mol Cancer Res*, 18(7), 1088-1098. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-19-1057>
- Schlaepfer, I. R., Glodé, L. M., Hitz, C. A., Pac, C. T., Boyle, K. E., Maroni, P., Deep, G., Agarwal, R., Lucia, S. M., Cramer, S. D., Serkova, N. J., & Eckel, R. H.

- (2015). Inhibition of Lipid Oxidation Increases Glucose Metabolism and Enhances 2-Deoxy-2-[(18)F]Fluoro-D-Glucose Uptake in Prostate Cancer Mouse Xenografts. *Mol Imaging Biol*, 17(4), 529-538. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0814-4>
- Schreurs, M., Kuipers, F., & van der Leij, F. R. (2010). Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. *Obes Rev*, 11(5), 380-388. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00642.x>
- Shao, H., Mohamed, E. M., Xu, G. G., Waters, M., Jing, K., Ma, Y., Zhang, Y., Spiegel, S., Idowu, M. O., & Fang, X. (2016). Carnitine palmitoyltransferase 1A functions to repress FoxO transcription factors to allow cell cycle progression in ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(4), 3832-3846. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6757>
- Shim, J. K., Choi, S., Yoon, S. J., Choi, R. J., Park, J., Lee, E. H., Cho, H. J., Lee, S., Teo, W. Y., Moon, J. H., Kim, H. S., Kim, E. H., Cheong, J. H., Chang, J. H., Yook, J. I., & Kang, S. G. (2022). Etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase 1 inhibitor, combined with temozolomide reduces stemness and invasiveness in patient-derived glioblastoma tumorspheres. *Cancer Cell Int*, 22(1), 309. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02731-7>
- Stanton, R. C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64(5), 362-369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iub.1017>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., 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. *CA Cancer J Clin*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swinnen, J. V., Brusselmans, K., & Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 9(4), 358-365. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000232894.28674.30>
- Ta, N. L., & Seyfried, T. N. (2015). Influence of Serum and Hypoxia on Incorporation of [(14)C]-D-Glucose or [(14)C]-L-Glutamine into Lipids and Lactate in Murine Glioblastoma Cells. *Lipids*, 50(12), 1167-1184. <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4075-z>
- Tan, Y., Li, J., Zhao, G., Huang, K.-C., Cardenas, H., Wang, Y., Matei, D., & Cheng, J.-X. (2022). Metabolic reprogramming from glycolysis to fatty acid uptake and beta-oxidation in platinum-resistant cancer cells. *Nature Communications*, 13(1), 4554. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32101-w>
- Toledo-Oñate, K. (2023). Dependencia del Metabolismo Celular con la Sensibilidad a Drogas Antineoplásicas en Células de Cáncer de Ovario. *Tesis para optar al título de Bioquímico. Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.*
- Turnbull, D. M., Bartlett, K., Younan, S. I., & Sherratt, H. S. (1984). The effects of 2[5(4-chlorophenyl)pentyl]oxirane-2-carbonyl-Co-A on mitochondrial oxidations. *Biochem Pharmacol*, 33(3), 475-481. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(84\)90243-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(84)90243-0)
- van Zyl, B., Tang, D., & Bowden, N. A. (2018). Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment. *Endocr Relat Cancer*, 25(5), R303-R318. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0336>

- Vander Heiden, M. G., & DeBerardinis, R. J. (2017). Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*, 168(4), 657-669. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.039>
- Veigel, D., Wagner, R., Stübiger, G., Wuczkowski, M., Filipits, M., Horvat, R., Benhamú, B., López-Rodríguez, M. L., Leisser, A., Valent, P., Grusch, M., Hegardt, F. G., García, J., Serra, D., Auersperg, N., Colomer, R., & Grunt, T. W. (2015). Fatty acid synthase is a metabolic marker of cell proliferation rather than malignancy in ovarian cancer and its precursor cells. *International Journal of Cancer*, 136(9), 2078-2090. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.29261>
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*, 1(3), 1112-1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Wolf, H. P., & Engel, D. W. (1985). Decrease of fatty acid oxidation, ketogenesis and gluconeogenesis in isolated perfused rat liver by phenylalkyl oxirane carboxylate (B 807-27) due to inhibition of CPT I (EC 2.3.1.21). *Eur J Biochem*, 146(2), 359-363. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08661.x>
- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate Analysis in Metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92-107. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/2213235X11301010092>
- Xintaropoulou, C., Ward, C., Wise, A., Queckborner, S., Turnbull, A., Michie, C. O., Williams, A. R. W., Rye, T., Gourley, C., & Langdon, S. P. (2018). Expression of glycolytic enzymes in ovarian cancers and evaluation of the glycolytic pathway as a strategy for ovarian cancer treatment. *BMC Cancer*, 18(1), 636. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4521-4>
- Yang, C. S., Matsuura, K., Huang, N. J., Robeson, A. C., Huang, B., Zhang, L., & Kornbluth, S. (2015). Fatty acid synthase inhibition engages a novel caspase-2 regulatory mechanism to induce ovarian cancer cell death. *Oncogene*, 34(25), 3264-3272. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.271>
- Yao, C. H., Liu, G. Y., Wang, R., Moon, S. H., Gross, R. W., & Patti, G. J. (2018). Identifying off-target effects of etomoxir reveals that carnitine palmitoyltransferase I is essential for cancer cell proliferation independent of β -oxidation. *PLoS Biol*, 16(3), e2003782. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003782>
- Yi, M., Li, J., Chen, S., Cai, J., Ban, Y., Peng, Q., Zhou, Y., Zeng, Z., Peng, S., Li, X., Xiong, W., Li, G., & Xiang, B. (2018). Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0784-5>
- Yoo, H. C., & Han, J. M. (2022). Amino Acid Metabolism in Cancer Drug Resistance. *Cells*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cells11010140>
- Zaal, E. A., & Berkers, C. R. (2018). The Influence of Metabolism on Drug Response in Cancer. *Front Oncol*, 8, 500. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00500>
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., & Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*, 15(3), 279-291. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018>

- Zhao, J., Zhi, Z., Wang, C., Xing, H., Song, G., Yu, X., Zhu, Y., Wang, X., Zhang, X., & Di, Y. (2017). Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. *Oncol Rep*, 38(4), 2105-2115. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5864>
- Zhao, Y., Butler, E. B., & Tan, M. (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis*, 4(3), e532. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.60>

10. ANEXO

MEDIDAS BÁSICAS DE SEGURIDAD AL TRABAJAR CON SUSTANCIAS PELIGROSAS

Para reducir los riesgos de accidentes con sustancias peligrosas, se deben seguir las siguientes medidas básicas de seguridad al trabajar con sustancias peligrosas:

- Conocer la sustancia peligrosa con la que se va a trabajar, para ello se debe leer cuidadosamente la etiqueta de la sustancia y su Hoja de Datos de Seguridad con el fin de identificar los riesgos a los cuales se ve expuesto.
- Utilizar los elementos de protección personal adecuados de acuerdo con la sustancia que se va a manipular.
- Conocer los procedimientos a seguir en caso de emergencia. Elementos de protección personal para el uso de sustancias peligrosas:
 1. Mascarilla nk95.
 2. Guantes de nitrilo.
 3. Antiparras.
 4. Overol.