



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPENDENCIA DEL METABOLISMO CELULAR
CON LA SENSIBILIDAD A DROGAS
ANTINEOPLÁSICAS EN CÉLULAS DE CÁNCER
DE OVARIO**

POR KARIN IGNACIA TOLEDO OÑATE

Plan de trabajo de Tesis presentado(a) a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía/Profesor patrocinante: Dr. Felipe Zúñiga Arbalti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Marzo, 2022

Concepción, Chile

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	vi
ABREVIACIONES	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades del cáncer	1
1.2. Cáncer de ovario	2
1.3. Drogas antineoplásicas utilizadas en el tratamiento para el cáncer de ovario	5
1.4. Mecanismos de resistencia	7
1.5. Metabolismo celular	9
1.6. Alteración del metabolismo celular en cáncer	11
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVO GENERAL	14
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Objetivo específico 1: Determinar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante la cuantificación de glucosa, lactato y RT-QPCR	15
5.1.1. Cultivo de líneas celulares OVCAR-3 y SKOV-3	15
5.1.2. Cuantificación de glucosa y lactato	15
5.1.3. Cuantificación de genes relacionados a la vía glicolítica por RT-QPCR	16
5.2. Objetivo específico 2: Modificar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 utilizando 2-DOG	17
5.2.1. Determinación de la citotoxicidad de 2-DOG	17
5.2.2. Cuantificación de glucosa, lactato y genes de la vía glucolítica por RT-QPCR a concentraciones crecientes de 2-DOG	19

5.3. Objetivo específico 3: Evaluar sensibilidad a Doxorrubicina en las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en presencia de modificadores del metabolismo celular	20
5.3.1. Evaluar sensibilidad de Doxorrubicina en líneas celulares	20
5.3.2. Evaluar sensibilidad de Doxorrubicina en líneas celulares tratadas con 2-DOG	22
6. CARTA GANTT	24
7. BIBLIOGRAFÍA	25
8. ANEXO	29

ÍNDICE DE TABLAS

5.1.3 – 1: Partidores utilizados en RT-QPCR	pág. 16
6 – 2: Carta Gantt	pág. 24

ABREVIACIONES

EOC	Carcinoma epitelial
HGSC	Carcinoma seroso de alto grado
2-DOG	2-desoxi-D-glucosa
Gg-P	Glicoproteína P
MDR	Resistencia a múltiples drogas
HR	Recombinación homóloga
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
HK	Hexoquinasa
GLUT 1	<i>Glucose transporter 1</i>
HKII	Hexoquinasa II
PFKP	Fosfofructoquinasa
PKM2	Piruvato quinasa M2
LDHA	Lactato deshidrogenasa A
SRB	Sulforodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
OD	Densidad óptica

RESUMEN

El cáncer de ovario se ha caracterizado por ser uno de los cánceres ginecológicos con mayor tasa de mortalidad puesto que suele ser asintomático en estadios iniciales, generando que el 75% de los casos se diagnostican como enfermedad avanzada, y por ser quimiorresistente. La resistencia a drogas antineoplásicas se relaciona con mecanismos propios de las células cancerosas; pero se ha estudiado que la reprogramación metabólica, en donde predomina la glicólisis aeróbica, también puede ser causa de la quimiorresistencia. Se hipotetiza que la modificación del metabolismo celular en líneas celulares provenientes de cáncer de ovario cambia la sensibilidad a drogas antineoplásicas. Se realizará la cuantificación de glucosa, lactato y genes relacionados con la glicólisis mediante RT-QPCR, se analizará el efecto de 2-Dexosi-D-glucosa (2-DOG) sobre el metabolismo celular y se evaluará si es capaz de producir un cambio en la sensibilidad a Doxorrubicina. Se espera observar una mayor sensibilidad a Doxorrubicina tras modificar el metabolismo celular con 2-DOG en las células cancerosas para mejorar la respuesta a la quimioterapia y mejorar la calidad de vida de las pacientes con cáncer de ovario.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del cáncer.

El cáncer es una de las enfermedades no transmisibles que representa elevadas tasas de mortalidad a nivel mundial, siendo la segunda causa de muerte en Chile. Se proyecta que durante el próximo decenio se instale como la principal causa de muerte en Chile y se espera que este cambio afecte principalmente a las mujeres(MINSAL, 2018). En las últimas décadas, el cáncer ha aumentado su incidencia de manera alarmante, probablemente a causa del estilo de vida, hábitos cambiantes y al aumento de la esperanza de vida (Roy & Saikia, 2016). Los cánceres con mayor prevalencia son: cáncer de mamas (11.7%), pulmón (11.4%), colon-rectal (10%), próstata (7.3%) y estómago (5.6%). Con respecto al cáncer con mayor tasa de mortalidad, el cáncer de pulmón (18%) encabeza esta lista junto con el cáncer de colon-rectal (9.4%), hígado (8.3%), estómago (7.7%) y de mamas (6.9%).

Se sabe que esta patología se caracteriza por una desregulación en la división celular normal provocando una proliferación descontrolada de células malignas que son morfológica y funcionalmente diferentes. La iniciación y el

desarrollo del cáncer se genera por una acumulación secuencial de mutaciones, donde cada una promueve la pérdida de rasgos específicos del tejido hasta que se produce la desdiferenciación y la regresión a un fenotipo más primitivo (Aguilar-Gallardo & Simon, 2013).

1.2. Cáncer de ovario.

El cáncer de ovario es una de las neoplasias ginecológicas malignas con mayor tasa de mortalidad, el cual afecta a mujeres de todas las edades, pero se diagnostica con mayor frecuencia después de la menopausia (Doubeni, Doubeni, & Myers, 2016).

En Chile, las 5 mayores incidencias del país se encuentran en las regiones de 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 (MINSAL, 2019).

Dependiendo del tejido de origen, el cáncer de ovario se divide en tres: carcinoma epitelial, carcinomas de células germinales y carcinoma de células estromales. El más común en mujeres es el carcinoma epitelial (EOC),

correspondiendo al 90% de los casos. EOC se clasifica en dos tipos histológicos: tumores de tipo 1, que son considerados genéticamente homogéneos, de lento desarrollo y suelen estar contenidos dentro del ovario en el momento que se descubre el cáncer, por lo que se puede decir que la mayoría de este tipo de cáncer son diagnosticados en etapa temprana; y tumores de tipo 2, que se caracterizan por ser altamente invasivos y de crecimiento rápido, por lo que se detectan en una etapa tardía (Kroeger & Drapkin, 2017). En este último tipo, encontramos el carcinoma seroso de alto grado (HGSC).

El HGSC es la forma de cáncer de ovario que se diagnostica con mayor frecuencia. Corresponde al 75% de los casos y se caracteriza por ser genéticamente inestable a causa de genes mutados. El gen mutado con mayor frecuencia es el TP53, gen que codifica para la proteína p53, proteína supresora de tumores, cuyas funciones más importantes se relacionan con la activación de enzimas de reparación del ADN y la apoptosis en el caso de que el daño en el ADN sea irreparable, evitando así la proliferación de las células que contienen un ADN anormal. Las mutaciones de TP53 generan proteínas p53 no funcionales (Matulonis et al., 2016).

Con respecto a su etiopatogenia, a excepción de la casuística que procede de la predisposición hereditaria, se cree que las dos principales

hipótesis que podrían explicar la carcinogénesis en el ovario son: las sucesivas ovulaciones, que terminan ocasionando traumas repetidos y reparación del epitelio del ovario, lo cual termina induciendo una mutación genética para terminar en una neoplasia; y el exceso de secreción de gonadotropinas, que termina en altas concentraciones de estrógenos y consecuentemente a una proliferación epitelial y posible transformación maligna (MINSAL, 2018).

Su alta tasa de mortalidad se debe a que aproximadamente el 75% de las pacientes son diagnosticadas en una etapa avanzada porque la enfermedad en etapa temprana suele ser asintomática y, además los síntomas que se generan en la etapa avanzada son inespecíficos; y porque se desarrolla una enfermedad recurrente y resistencia a la quimioterapia, a pesar de que inicialmente respondan bien al tratamiento (Matulonis et al., 2016). En cambio, en etapas tempranas, se asocia con una supervivencia de 5 años en el 92% de los casos, pero solo del 17% al 28% para aquellas con cáncer de ovario en etapas avanzadas (Kroeger & Drapkin, 2017).

Además, por el hecho de tratarse de etapas avanzadas, es necesario establecer tratamientos antineoplásicos agresivos que, además del efecto terapéutico esperado, producen efectos colaterales, deteriorando la salud de la paciente, lo que perjudica aún más su supervivencia.

Aproximadamente el 80% de las pacientes presentan una recidiva de la enfermedad en los primeros 5 años tras el diagnóstico, donde solo el 15% de los casos responden a la quimioterapia posterior (van Zyl, Tang, & Bowden, 2018).

1.3. Drogas antineoplásicas utilizadas en el tratamiento para el cáncer de ovario.

El tratamiento de primera línea para el cáncer de ovario se basa en realizar una cirugía donde se logre el máximo esfuerzo citorreductor seguida de una quimioterapia adyuvante intravenosa basada en la combinación de platino y un taxano, frecuentemente paclitaxel (Kuroki & Guntupalli, 2020).

En los derivados del platino, encontramos carboplatino y cisplatino. El mecanismo de ambos consiste en la formación de un enlace covalente con los átomos de nitrógeno de dos guaninas adyacentes de la misma cadena de ADN o con una hebra distinta. Actúa como aducto del ADN que provocará la inhibición de la replicación del ADN a causa del impedimento de la separación de las hebras del ADN; por lo tanto, la célula no podrá dividirse y se inhibirá la

transcripción del ADN, lo que terminará inhibiendo la división celular para finalmente inducir la apoptosis.

Con respecto a la familia de los taxanos, Paclitaxel promueve la polimerización de los dímeros de tubulina que forman los microtúbulos y los estabiliza evitando la despolimerización, provocando que los cromosomas no alcancen su configuración para la metafase, lo que terminará con el bloqueo de la mitosis para finalmente inducir la apoptosis (Ezrahi, Aserin, & Garti, 2019).

En la década de los 90 se comenzó con el desarrollo de nuevas drogas con actividad en segunda línea para tratar el cáncer de ovario tras recaída al tratamiento de primera línea. Tras varios estudios, se compararon estas drogas en monoterapia entre sí en la segunda línea de tratamiento y sus resultados motivaron la aprobación de doxorrubicina liposomal pegilada para el tratamiento de segunda línea en el cáncer de ovario (Gordon, Tonda, Sun, Rackoff, & Doxil Study, 2004).

Doxorrubicina es un antibiótico antraciclino con actividad antitumoral producido por *Streptococcus peucetius var. caesius*. Su mecanismo de acción se basa en que puede intercalarse con el ADN, afectando así muchas de sus funciones e inhibiendo la síntesis de ADN y ARN. Es capaz de producir roturas sobre cadenas simples y doble; por lo tanto, tiene propiedades mutagénicas y

carcinogénicas (Rodríguez Carranza, 2015). Doxorubicina liposomal pegilada corresponde al fármaco que se administra en liposomas. Las moléculas de doxorubicina están encapsuladas en una esfera de bicapa lipídicas, cuyo tamaño es de 100 nm aproximadamente, lo que permite que se depositen selectivamente en el tumor pues no entra en tejidos con uniones capilares estrechas, como el tracto gastrointestinal. Estas características permiten una mayor extravasación de las vesículas hacia el tumor, lo que fomenta una mayor expulsión de la droga en el tumor (Green & Rose, 2006).

1.4. Mecanismos de resistencia a drogas antineoplásicas.

La resistencia a la quimioterapia está relacionada con mecanismos propios de las células tumorales. Todavía sigue siendo objeto de estudio pues existen varios mecanismos involucrados. No obstante, uno de los mecanismos más frecuentes es la resistencia a múltiples drogas (MDR), se genera una sobreexpresión de glicoproteína P (Gp-P), proteína de membrana dependiente de ATP que reduce los niveles celulares de varias drogas (Chandra et al., 2019).

También se ha relacionado la resistencia a drogas antineoplásicas a una p53 disfuncional junto con una reparación del ADN disfuncional. Generalmente,

las drogas empleadas en el tratamiento son agentes intercalantes, por lo que generan lesiones en el ADN. La presencia de estas lesiones activa distintas vías celulares que conducen a una interrupción o ralentización de la síntesis del ADN, bloqueo del ciclo celular y activación de vías de reparación. Una de las vías de reparación más importante es la recombinación homóloga (HR), tipo de recombinación genética en la que secuencias de nucleótidos se intercambian entre dos moléculas idénticas de ADN (Wong-Brown, van der Westhuizen, & Bowden, 2020). La HR repara las roturas de doble hebra que se producen por acción de las drogas antineoplásicas, donde las principales proteínas involucradas en este reconocimiento y reparación del daño son BRCA 1/2. No obstante, los genes BRCA 1/2 suelen estar mutados, provocando una HR deficiente que, inicialmente, genera una acumulación de roturas de doble hebra a causa del reconocimiento de ese daño, lo que a su vez provoca un aumento en la apoptosis; pero que posterior a la quimioterapia, se producen mutaciones de reversión o deleciones intragénicas en los genes mutados de BRCA1 y BRCA2 que restauran el marco de lectura de la proteína dando como resultado una proteína funcional y readquisición de la recombinación homóloga, lo que permite reparar los daños provocados en el ADN, lo que terminará en una resistencia (Damia & Broggini, 2019).

Sin embargo, se ha sugerido que la quimiorresistencia dada en el cáncer de ovario también puede estar asociada al metabolismo alterado que presentan

las células cancerosas. Se ha estudiado que, al interrumpir el programa metabólico de un cáncer, puede existir una mejoría de los resultados de los pacientes (Pillai et al., 2019).

1.5. Metabolismo celular.

Las células intercambian continuamente materia y energía con su entorno con el objetivo de crear y mantener las estructuras celulares, proporcionando así la energía necesaria para sus actividades vitales. El metabolismo consiste en una serie de reacciones que ocurren dentro de las células de los organismos vivos para mantener la vida. El proceso del metabolismo involucra muchas vías celulares interconectadas para proporcionar la energía necesaria a las células para llevar a cabo sus funciones. Se divide en una serie de reacciones químicas que comprenden tanto la síntesis como la degradación de macromoléculas complejas, y se pueden dividir en catabolismo o anabolismo (Judge & Dodd, 2020). Encontramos seis rutas metabólicas importantes para la generación de productos claves para el crecimiento celular: glicólisis, ciclo de Krebs, vías de las pentosas, β -oxidación y síntesis de aminoácidos.

La glucólisis es la conversión enzimática de glucosa en lactato, donde se produce 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En presencia de oxígeno, las células realizan la OXPHOS como vía principal para producir energía, pues genera 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, siendo más eficiente que la glucólisis (Peiris-Pages, Martinez-Outschoorn, Pestell, Sotgia, & Lisanti, 2016).

La mayoría de las células con baja tasa de proliferación dependen principalmente de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para mantener su integridad celular. Como resultado, estas células metabolizan glucosa a piruvato mediante la glicólisis y después oxidan el piruvato en CO_2 gracias a la vía del ciclo de Krebs en las mitocondrias, generando un gradiente electroquímico facilitando la producción de ATP (Wilson, 2017).

En cambio, en las células que poseen una alta tasa de proliferación predomina la glicólisis dado a que es una de las formas más sencillas de generar ATP para compensar la alta demanda energética (Viola, Munari, Sanchez-Rodriguez, Scolaro, & Castegna, 2019).

1.6. Alteración del metabolismo celular en cáncer.

En los años treinta, Otto Warburg observó que las células cancerosas consumían altas cantidades de glucosa y la metabolizaban en lactato, incluso en presencia de oxígeno. A este fenómeno se le denominó efecto Warburg o glicólisis aeróbica. Este proceso demuestra que, en comparación con las células normales, las células cancerosas prefieren la glicólisis antes que la fosforilación oxidativa para poder generar la energía necesaria para el crecimiento (Kubicka, Matczak, & Labieniec-Watala, 2021).

Dado a que las células cancerosas tienen una alta tasa de proliferación, algunas de ellas carecen de oxígeno y glucosa. La angiogénesis responde al aumento de la demandad de estos componentes, pero la velocidad de este proceso es insuficiente para satisfacer las necesidades energéticas de un tumor que crece de forma rápida (Fitzgerald, Soro-Arnaiz, & De Bock, 2018). Para poder proliferar aún más, las células cancerosas deben modificar su metabolismo aeróbico a uno anaeróbico. Por lo tanto, la glicólisis es la principal fuente de ATP. En respuesta a una mayor demanda de glucosa, las células cancerosas tienen una sobreexpresión de transportadores de glucosa (Adekola, Rosen, & Shanmugam, 2012).

Otra explicación para el cambio a una glicólisis aeróbica es que las células en proliferación tienen requisitos metabólicos importantes que se extienden más allá del ATP. La dependencia de la glicólisis sobre la OXPHOS puede ayudar a la generación de precursores, pues proporciona intermediarios metabólicos para apoyar la síntesis de la ribosa, aminoácidos y ácidos grasos, que son cruciales para la adaptación metabólica (Peiris-Pages et al., 2016). También sirve como mecanismo potencial para evitar la apoptosis y, por lo tanto, promover la proliferación.

El piruvato que se genera en la glicólisis se convierte parcialmente en ácido láctico por la fermentación de lactato y es excretado hacia el exterior de la célula. Se ha estudiado que existe una mayor síntesis de lactato en las células cancerosas, lo cual se relaciona con la agresividad del cáncer (San-Millan & Brooks, 2017). El exceso de lactato crea un microambiente tumoral ácido, que facilita la migración y la invasión del tumor (Hirschhaeuser, Sattler, & Mueller-Klieser, 2011). Además, el lactato es una fuente de energía importante cuando la glucosa es limitada.

Como se ha dicho anteriormente, la glicólisis es esencialmente una reacción anaeróbica y el hecho de que las células cancerosas la utilicen aún en

presencia de oxígeno, les brinda una ventaja en la supervivencia. Se debe principalmente a que el microambiente del tumor se caracteriza por presentar áreas con bajo nivel de oxígeno, lo que implica la activación del factor HIF-1, que activa genes de la ruta glucolítica. Por lo tanto, en el cáncer, el microambiente hipóxico puede llevar a una glicólisis mejorada. Esta modificación metabólica permite la adaptación a la hipoxia y aumenta la resistencia al tratamiento. Hay tumores que mantienen activo el factor HIF-1 incluso en condiciones de normoxia (Lennicke, Rahn, Lichtenfels, Wessjohann, & Seliger, 2015).

Actualmente existen varias herramientas que ayudan al estudio del metabolismo celular. Encontramos inhibidores, como activadores de las distintas vías metabólicas, orientados principalmente a suprimir la progresión del cáncer. Uno de los inhibidores de la glicólisis más utilizado es la 2-DOG, la cual inhibe la enzima hexoquinasa (HK).

2. HIPOTESIS

La modificación del metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 cambia la sensibilidad a drogas antineoplásicas.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la sensibilidad a drogas antineoplásicas al modificar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante la cuantificación de glucosa, lactato y RT-QPCR.
2. Modificar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 utilizando 2-DOG.
3. Evaluar sensibilidad a Doxorrubicina en las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en presencia de modificadores del metabolismo celular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Objetivo específico 1: Determinar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante la cuantificación de glucosa, lactato y RT-QPCR.

5.1.1. Cultivo de líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3.

Se utilizarán las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 (líneas sensibles y altamente resistente, respectivamente), ambas derivadas de cáncer de ovario, las cuales serán cultivadas en medio RPMI suplementado al 10% con suero fetal bovino inactivado, glutamina y 100 UI/L penicilina/estreptomicina (1%) y se incubarán a 37°C y 5% de CO₂.

5.1.2. Cuantificación de Glucosa y Lactato.

El consumo de glucosa será medido directamente desde el medio de cultivo extraído de las placas de 12 pocillos utilizando el equipo Accu-Check glucómetro.

Para la medición de lactato, se utilizará el mismo medio de cultivo usado para la medición de glucosa, se mezclará con buffer y se determinará el contenido de lactato utilizando el KIT de detección de lactato (k627-100, BioVision).

5.1.3. Cuantificación de genes asociados a la vía glicolítica por RT-QPCR.

Para la extracción de ARN total, las células adheridas a las placas van a ser tratadas con el reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la extracción de ARN total, se determinará la expresión de genes de enzimas relacionadas con la glicólisis: GLUT1, HKII, PFKP, PKM2 y LDHA. La secuencia de los primarios utilizados se detalla en la **Tabla 1**. Para la reacción de RT-QPCR, se utilizará el Kit Brilliant III SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) y la enzima Transcriptasa Reversa GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR (Promega). Para el RT-QPCR se utilizará el equipo Applied Biosystem 7500 FAST Real Time PCR System, con el protocolo de amplificación: 40°C por 15 min, 95°C por 10 min seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos y alineamiento/extensión a 60°C por 1 minuto.

Tabla 1: Partidores utilizados en RT-QPCR.

Gen	Partidor Fwd	Partidor Rev
ACTB	5'-TGGCATCCACGAACTACCT-3'	5'-ACGGAGTACTTGCGCTCAG-3'
HKII	5'-GAGCCACCACTCACCCTACT-3'	5'-ACCCAAAGCACACGGAAGTT-3'
PFKP	5'-GGGGATGCTCAAGGTATGAAC-3'	5'-TCGGCCTCTGCGATGTTTG-3'
PKM2	5'-TACCATGCGGAGACCATCAA-3'	5'-AGCAACGGGCCCGGTAGAG-3'
GLUT1	5'-AGGTGATCGAGGAGTTCTAC-3'	5'-TCAAAGGACTTGCCCAGTTT-3'
LDHA	5'-ACCCAGTTTCCACCATGATT-3'	5'-CCCAAATGCAAGGAACACT-3'

5.2. Objetivo específico 2: Modificar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 utilizando 2-DOG.

5.2.1. Determinación de la citotoxicidad de 2-DOG.

Se realizará el ensayo de Sulforodamina B (SRB) para determinar la inhibición del crecimiento mediante análisis colorimétrico, que estima indirectamente el número de células tiñendo el contenido de proteínas celulares con el colorante SRB (Vichai & Kirtikara, 2006).

Para esto, se cultivarán 30.000 células por pocillo de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en una placa de 96 pocillos en las mismas condiciones descritas en el apartado 5.1.1. “Cultivo de líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3”. Se dejarán incubando ambas placas en la estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas.

Posterior a las 24 horas, correspondiente al día 2, se comenzará preparando diluciones con las siguientes concentraciones de 2-DOG: 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 80 mM y 100 mM; se tratarán las células con esas concentraciones de 2-DOG por triplicado para cada condición. Se utilizará como control el medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, glutamina y penicilina/estreptomicina 100 UI/L (1%). Las placas se dejarán incubando por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

En el día 3, se eliminará el medio de cultivo presente en ambas placas, se fijarán las células con 100 µL de 10% TCA y se incubarán las placas a 4°C por 1 hora. Se lavarán 5 veces las placas con agua y se dejarán secar al aire. Posteriormente, se añadirá 100 µL de SRB para teñir las células fijadas y se dejará actuar por 30 minutos. Luego, se lavarán las placas con ácido acético 1% para eliminar el exceso de tinte, repitiendo 5 veces el lavado y el secado. Para disolver el colorante unido a las proteínas se añadirá 200 µL de la solución de

base Tris 10 mM, el cual se dejará en agitación durante 15 minutos. Finalmente determinar la OD en el lector de microplacas a 510 nm.

El cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento se realizará utilizando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ control del crecimiento celular} = \frac{\text{OD muestra} - \text{OD día 0}}{\text{OD control negativo} - \text{OD día 0}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibición de crecimiento} = 100 - \% \text{ control del crecimiento celular}$$

5.2.2. Cuantificación de glucosa, lactato y genes de la vía glicolítica por RT-QPCR a concentraciones crecientes de 2-DOG.

Se cultivarán 200.000 células por pocillo de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en placas de 12 pocillos en las mismas condiciones descritas anteriormente en el apartado 5.1. “Cultivo de líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3”. Las células van a ser tratadas con 200 µL de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, glutamina y penicilina/estreptomicina 100 UI/L (1%), el que contendrá concentraciones

crecientes de 2-DG, las que serán determinadas previamente con el ensayo de SRB. Se incubarán ambas placas en la estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas.

Posterior a las 24 horas, se repetirá la misma metodología para la medición del consumo de glucosa, de lactato y de los genes relacionados con la vía glicolítica por RT-QPCR descritas anteriormente en el apartado 5.1.2. “Medición del consumo de Glucosa y producción de Lactato en el medio” y 5.1.3. “Cuantificación de genes relacionados a la vía glicolítica por RT-QPCR”.

5.3. Objetivo específico 3: Evaluar sensibilidad a Doxorrubicina en las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en presencia de modificadores del metabolismo celular.

5.3.1. Evaluar sensibilidad de doxorrubicina en líneas celulares.

La sensibilidad de doxorrubicina se evaluará con el ensayo de SRB, por lo que se realizará el mismo protocolo descrito en el apartado 5.2.1. “Determinación de citotoxicidad de 2-DOG”. En una placa de 96 pocillos se cultivarán 30.000 células por pocillo con concentraciones crecientes de doxorrubicina: 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM, 80 mM y 100 mM. El

procedimiento será realizado por triplicado por cada condición. Para la manipulación de doxorrubicina, se usarán elementos de protección personal para el uso de sustancias peligrosas descritos en ANEXO: “MEDIDAS BÁSICAS DE SEGURIDAD AL TRABAJAR CON SUSTANCIAS PELIGROSAS”.

Tras la realización del ensayo de SRB, se van a cultivar 200.000 células por pocillo de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en placas de 12 pocillos repitiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 5.1.1. “Cultivo de líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3”. Las células van a ser tratadas con concentraciones crecientes de Doxorrubicina, que se determinarán previamente gracias al ensayo de SRB, y se incubarán en la estufa a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas.

Posterior a las 24 horas, se repetirá el mismo procedimiento para la medición del consumo de glucosa, de lactato y de los genes relacionados con la vía glicolítica por RT-QPCR descritas anteriormente en el apartado 5.1.2. “Medición del consumo de Glucosa y producción de Lactato en el medio” y 5.1.3. “Cuantificación de genes relacionados a la vía glicolítica por RT-QPCR”.

5.3.2. Evaluar sensibilidad de Doxorrubicina en líneas celulares tratadas con 2-DOG.

Se cultivarán 30.000 células por pocillo de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en placas de 96 pocillos y se repetirá la misma metodología descrita en el apartado 5.2.2. “Cuantificación de glucosa, lactato y genes de la vía glicolítica por RT-QPCR a concentraciones crecientes de 2-DOG”.

Posterior a las 24 horas de incubación, las células van a ser tratadas con doxorrubicina, cuya concentración será donde presenta un comportamiento citostático para las células, y nuevamente se volverán a incubar por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Transcurrido el tiempo, se repetirá el mismo procedimiento para la medición del consumo de glucosa, de lactato y de los genes relacionados con la vía glicolítica por RT-QPCR descritas anteriormente en el apartado 5.1.2. “Medición del consumo de Glucosa y producción de Lactato en el medio” y 5.1.3. “Cuantificación de genes relacionados a la vía glicolítica por RT-QPCR”.

Para evaluar la sensibilidad de Doxorrubicina en las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 tratadas con 2-DOG, se utilizará nuevamente el ensayo de SRB. Por lo tanto, se seguirá el mismo protocolo descrito en el apartado 5.4. “Determinación de la citotoxicidad de 2-DOG”.

6. CARTA GANTT

Tabla 2. Carta Gantt y planificación del trabajo de investigación										
	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic
Determinar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 mediante la cuantificación de glucosa, lactato y RT-QPCR.										
Cultivo de líneas celulares.	X	X	X	X	X	X	X	X		
Cuantificación de glucosa y lactato.	X									
Cuantificación por RT-QPCR de los genes de la vía glucolítica.		X	X							
Modificar el metabolismo celular de las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 utilizando 2-DOG.										
Determinación de la citotoxicidad de 2-DOG.			X	X						
Cuantificación de glucosa, lactato y genes de la vía glucolítica por RT-QPCR a concentraciones crecientes de 2-DOG.				X	X					
Evaluar la sensibilidad a Doxorrubicina en las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 en presencia de modificadores del metabolismo celular.										
Evaluar sensibilidad de Doxorrubicina en líneas celulares.				X	X					
Evaluar sensibilidad de Doxorrubicina en líneas celulares tratadas con 2-DOG.					X	X				
Presentación en congreso.						X				
Escritura tesis.				X	X	X	X	X	X	
Avance tesis.					X	X	X			
Defensa tesis.										X

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adekola, K., Rosen, S. T., & Shanmugam, M. (2012). Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol*, 24(6), 650-654. doi:10.1097/CCO.0b013e328356da72
- Aguilar-Gallardo, C., & Simon, C. (2013). Cells, stem cells, and cancer stem cells. *Semin Reprod Med*, 31(1), 5-13. doi:10.1055/s-0032-1331792
- Chandra, A., Pius, C., Nabeel, M., Nair, M., Vishwanatha, J. K., Ahmad, S., & Basha, R. (2019). Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Med*, 8(16), 7018-7031. doi:10.1002/cam4.2560
- Damia, G., & Broggini, M. (2019). Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair. *Cancers (Basel)*, 11(1). doi:10.3390/cancers11010119
- Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., & Myers, A. E. (2016). Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *Am Fam Physician*, 93(11), 937-944. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281838>
- Ezrahi, S., Aserin, A., & Garti, N. (2019). Basic principles of drug delivery systems - the case of paclitaxel. *Adv Colloid Interface Sci*, 263, 95-130. doi:10.1016/j.cis.2018.11.004

- Fitzgerald, G., Soro-Arnaiz, I., & De Bock, K. (2018). The Warburg Effect in Endothelial Cells and its Potential as an Anti-angiogenic Target in Cancer. *Front Cell Dev Biol*, 6, 100. doi:10.3389/fcell.2018.00100
- 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. doi:10.1016/j.ygyno.2004.07.011
- Green, A. E., & Rose, P. G. (2006). Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Int J Nanomedicine*, 1(3), 229-239. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717964>
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*, 71(22), 6921-6925. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1457
- Judge, A., & Dodd, M. S. (2020). Metabolism. *Essays Biochem*, 64(4), 607-647. doi:10.1042/EBC20190041
- Kroeger, P. T., Jr., & Drapkin, R. (2017). Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 29(1), 26-34. doi: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). doi:10.3390/ijms22179507

- Kuroki, L., & Guntupalli, S. R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ*, 371, m3773. doi:10.1136/bmj.m3773
- Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., & Seliger, B. (2015). Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal*, 13, 39. doi:10.1186/s12964-015-0118-6
- 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. doi:10.1038/nrdp.2016.61
- MINSAL. (2018). "PLAN NACIONAL DE CÁNCER 2018 – 2028"
- MINSAL. (2019). RESUMEN EJECUTIVO GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA DE CÁNCER DE OVARIO EPITELIAL. SANTIAGO: MINSAL.
- Peiris-Pages, M., Martinez-Outschoorn, U. E., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2016). Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res*, 18(1), 55. doi:10.1186/s13058-016-0712-6
- 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. doi:10.1007/s10555-019-09792-7
- Rodríguez Carranza, R. (2015). Doxorubicina: Antineoplásicos. In *Vademécum Académico de Medicamentos*. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Roy, P. S., & Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, 53(3), 441-442. doi:10.4103/0019-509X.200658

- San-Millan, I., & Brooks, G. A. (2017). Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*, 38(2), 119-133. doi:10.1093/carcin/bgw127
- 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. doi:10.1530/ERC-17-0336
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*, 1(3), 1112-1116. doi:10.1038/nprot.2006.179
- Viola, A., Munari, F., Sanchez-Rodriguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*, 10, 1462. doi:10.3389/fimmu.2019.01462
- Wilson, D. F. (2017). Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. *J Physiol*, 595(23), 7023-7038. doi:10.1113/JP273839
- Wong-Brown, M. W., van der Westhuizen, A., & Bowden, N. A. (2020). Targeting DNA Repair in Ovarian Cancer Treatment Resistance. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 32(8), 518-526. doi:10.1016/j.clon.2020.03.005

8. 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.