

Evaluación del efecto de la dieta cetogénica y los ácidos grasos octanoico y decanoico sobre los genes modulados por PPARs en el desarrollo de tumores de glioblastoma: estudio de investigación con modelo in vitro de la línea celular T98G e in vivo de pez cebra.

Laura Alejandra Vargas Romero

11932123877

Universidad Antonio Nariño

Programa Maestría en Bioquímica

Facultad de ciencias

Ciudad, Colombia

2023

Evaluación del efecto de la dieta cetogénica y los ácidos grasos octanoico y decanoico sobre los genes modulados por PPARs en el desarrollo de tumores de glioblastoma: estudio de investigación con modelo in vitro de la línea celular T98G e in vivo de pez cebra.

Laura Alejandra Vargas Romero

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director (a):

Ph.D. Mónica Losada Barragán

Codirector (a):

Ph.D. Jeinny Karina Vargas Sánchez

Línea de Investigación:

Nutrición e inmunología

Grupo de Investigación:

Biología celular y funcional e ingeniería de biomoléculas

Universidad Antonio Nariño

Programa Maestría en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2023

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado

_____, Cumple con

los requisitos para optar

Al título de_____.

Firma del Tutor

Firma Jurado

Firma Jurado

Bogotá, 09 Mayo 2023.

Contenido

Pág.

RESUMEN	6
ABSTRACT	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN	8
1. Antecedentes	8
2. Justificación	13
3. Marco teórico	15
3.1 Gliomas	15
3.2 Inflamación.....	17
3.3 Metabolismo	18
3.4 Dieta cetogénica	19
3.5 Receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR).....	20
OBJETIVOS	22
Objetivo General	22
Objetivos específicos	22
DISEÑO METODOLÓGICO	23
1. Análisis de expresión génica en un modelo animal de pez cebra adulto.	23
2. Análisis de expresión génica en un modelo celular de glioblastoma	25
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	28
Resultados	28
Discusión	68
CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Dedicatoria

El presente documento lo dedico a mi abuela Gladys Nayr Martínez Rodríguez, quien ha sido un pilar en todo este proceso, porque siempre creyó en mí y me apoyó desde el primer momento. A mi pareja Luis Galvis, que me ha acompañado y me ha enseñado que hay que esforzarnos por lo que queremos, me ha llenado de amor, apoyo y felicidad. Finalmente, quiero hacer una dedicatoria especial a la doctora Mónica Losada Barragán, que ha sido una persona indispensable en mi proceso académico desde el pregrado, cuando me enseñó desde cero todo el mundo de la biología molecular y lo fascinante que es. Más que mi tutora, ha sido un ejemplo a seguir, la admiro y respeto completamente y agradezco todo lo aprendido junto a ella.

Agradecimientos

El presente documento lo agradezco a mi familia, quienes han sido un gran apoyo para mí durante todo este proceso. A mi pareja sentimental que ha estado para mí desde el primer momento, dándome mucho ánimo y mostrándome que todo ha valido la pena. Agradezco también a mis amigos, quienes han estado a mi lado desde el principio, con los que he compartido muchas risas, aprendizaje en el laboratorio, crecimiento académico y mucho apoyo incondicional.

Agradezco a la universidad Antonio Nariño por haberme formado académicamente y a la doctora Mónica Losada Barragán, quien ha sido indispensable en todo mi proceso académico y profesional, ha confiado en mí siempre y ha permitido que yo pueda obtener mi segundo título académico a nivel de educación superior. Finalmente, le agradezco a la empresa Mithoterapies por darme la oportunidad de ser parte de este gran proyecto que me ayudó a crecer profesional y académicamente.

Gracias a todos los que siempre creyeron en mí

RESUMEN

El glioblastoma es un tipo de tumor cerebral agresivo y difícil de tratar. Sin embargo, se ha propuesto que la terapia cetogénica podría tener efectos beneficiosos en el control de su actividad tumoral. Esta dieta, rica en ácidos grasos, actúa como ligandos naturales de los receptores PPAR, que regulan procesos inflamatorios, metabólicos y de crecimiento celular. Para comprobar esto, se evaluó la dieta cetogénica en pez cebra y los ácidos octanoico y decanoico en la línea celular T98G mediante el análisis de expresión génica de genes asociados a metabolismo, crecimiento tumoral e inflamación, y la supresión de los isotipos PPAR- α y PPAR- β . Los resultados muestran que la dieta cetogénica promueve el metabolismo de ácidos grasos y que el PPAR- γ tiene un papel neuroprotector, mientras que PPAR- β podría promover el crecimiento tumoral. Además, se encontró que los ácidos C8 y C10 podrían tener un efecto positivo en la expresión de diferentes genes asociados a crecimiento tumoral, dependiendo de los niveles de glucosa. Estos hallazgos sugieren que la terapia cetogénica podría ser una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento del glioblastoma.

Palabras clave: glioblastoma, dieta cetogénica, expresión génica, crecimiento tumoral, ácidos octanoico, ácido decanoico.

ABSTRACT

Glioblastoma is an aggressive and difficult to treat type of brain tumor. However, it has been proposed that ketogenic therapy could have beneficial effects in controlling its tumor activity. This diet, rich in fatty acids, acts as natural ligands for PPAR receptors, which regulate inflammatory, metabolic and cell growth processes. To test this, we evaluated the ketogenic diet in zebrafish and octanoic and decanoic acids in the T98G cell line by analyzing gene expression of genes associated with metabolism, tumor growth and inflammation, and suppression of PPAR- α and PPAR- β isotypes. The results show that ketogenic diet promotes fatty acid metabolism and that PPAR- γ has a neuroprotective role, whereas PPAR- β could promote tumor growth. In addition, it was found that C8 and C10 acids could have a positive effect on the expression of different tumor growth-associated genes, depending on glucose levels. These findings suggest that ketogenic therapy could be a promising therapeutic strategy for the treatment of glioblastoma.

Keywords: glioblastoma, ketogenic diet, gene expression, tumor growth, octanoic acid, decanoic acid.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes

En el cerebro, el glioblastoma es el tumor maligno primario más frecuente en la población adulta, siendo de gran interés por su alta tasa de mortalidad. Como lo reportaron Tan et al. el glioblastoma presenta una mediana de supervivencia menor a 2 años [1]. Así mismo, ha sido investigado el mecanismo mediante el cual las células logran sobrevivir en el ambiente cerebral, indicando un proceso de neovascularización disfunciones por parte de este tumor, así como un proceso de glucólisis e hipoxia [2]. Los tumores del glioma, son dependientes de la actividad de células del sistema nervioso central (SNC), en donde la microglía es indispensable para la adecuada progresión del glioblastoma, mediante la expresión de moléculas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) que mejora el crecimiento tumoral, la invasión, la angiogénesis y la inmunosupresión [3].

Los efectos de este tipo de patologías, que van desde alteraciones metabólicas, que pueden promover la destrucción de tejidos normales, hasta la activación del sistema inmunológico, el cual va acompañado de procesos inflamatorios [4]. Se ha mostrado que en gliomas, IL-10 junto a TGF- β participan aumentando la proliferación y migración de células de glioma por mecanismos de crecimiento autocrino y paracrino [5]. En otra investigación, Conroy, et al. encontraron que IL-8 tiene un papel crítico en la angiogénesis de glioblastoma, promoviendo este proceso, por medio de la elevada expresión de angiopoyetina y el factor de crecimiento endotelial vascular [6]. Por medio de análisis de expresión génica, Mendes et al. dieron a conocer que la MMP-9, MMP-2 y MMP-3 presentan una elevada expresión

en tejido cerebral neoplásico, en comparación con el tejido normal [7], mostrando una actividad proinflamatoria elevada en estas células tumorales.

En el transcurso del tiempo, se han realizado numerosas investigaciones asociadas a la actividad de este tipo de tumor, así como a la búsqueda de tratamientos que minimicen sus efectos negativos y reduzcan su tasa de mortalidad. Dentro de los procedimientos aplicados se encuentra la cirugía, radioterapia y quimioterapia [2, 8]. Sin embargo, esta enfermedad tiene una progresión rápida de aproximadamente 6 meses que conlleva a la muerte, siendo resistentes en la mayoría de los casos a este tipo de métodos terapéuticos [8]. La falla en las terapias propuestas aplicadas para el glioblastoma, ha llevado a la búsqueda de terapias complementarias que faciliten la reducción del tamaño del tumor para poderlo tratar. Una de ellas es la dieta cetogénica, la cual ha sido utilizada convencionalmente como un tratamiento no invasivo para combatir los efectos de enfermedades neurodegenerativas como la epilepsia refractaria [9].

Específicamente en cáncer cerebral, Zhou et al. presentaron que una dieta cetogénica con restricción calórica, disminuye significativamente el crecimiento intracerebral de tumores en ratones, con un efecto antiangiogénico [10]. También se ha reportado que la restricción calórica generada por esta dieta reduce el crecimiento tumoral por efectos apoptóticos y reduce los efectos proinflamatorios sobre estas células [11]. Esto ocurre, gracias a la reducción en la disponibilidad de glucosa que es el metabolito más importante para la supervivencia de las células cancerosas y el aumento de cuerpos cetónicos, que son difíciles de metabolizar por células tumorales [10-12].

A pesar de los efectos positivos que ha presentado la dieta cetogénica, un exceso de cetosis también puede ser negativo para el organismo, de manera que es necesario restringirla para evitar trastornos. Entre las polémicas asociadas con la dieta cetogénica se encuentra: deficiencia de CPT-1 y CPT-2, defectos en la β -oxidación de ácidos grasos, desórdenes severos en el hígado y defectos cetogénicos [13]. Los desórdenes hepáticos se han evaluado en ratones, donde se presenta esteatosis e inflamación en este modelo, y hepatotoxicidad asociada con el déficit de carnitina [13].

Aunque estas investigaciones son realizadas en un modelo animal de ratón, es bien conocido que el pez cebra tiene relación neurobiológica con los humanos [14], por lo que también es un modelo interesante para evaluar los efectos de tratamientos en la actividad neurológica. Respecto a este modelo, Steenbergen et al. lo propusieron como modelo para el estudio de enfermedades psiquiátricas y de estrés [15]. También ha sido utilizado para estudiar la enfermedad del Alzheimer, donde tiene genes ortólogos a los mutados en esta enfermedad [16]. Se ha reportado también, que el pez cebra es altamente sensible a fármacos neurotrópicos, por lo que es un modelo popular, para el estudio de cáncer del SNC epilepsia [17]. Esto convierte al pez cebra en un modelo de interés investigativo para estudiar los efectos farmacológicos en patologías cerebrales, idóneo para indagar sobre la dieta cetogénica.

Respecto a las investigaciones sobre dieta cetogénica, es importante evaluar sus efectos metabólicos, teniendo en cuenta las alteraciones que tiene el cáncer cerebral en este aspecto. Esto involucra proteínas que participan en procesos como la β -oxidación y ciclo de Krebs, como es el caso de carnitina palmitoil transferasa 2 (CPT2), que transforma la acilcarnitina en carnitina y libera acil-CoA para iniciar el proceso de β -oxidación [18], en la cual white et al. evaluaron el silenciamiento de este gen para determinar su importancia en el metabolismo lipídico, y se

encontró que la pérdida de este gen no genera un comportamiento negativo en la actividad cerebral, y la disminución en la β - oxidación de ácidos grasos en el sistema nervioso central genera acumulación de acilcarnitinas que serán posteriormente movilizadas para su oxidación [19]. Asociado a este proceso también se encuentra la Acil-CoA deshidrogenasa (ACADM), que se encarga de tomar el Acil-Coa producido y generar Enoil-CoA para continuar con dicho proceso oxidativo [20]. Se ha encontrado que alteraciones en esta proteína están fuertemente asociadas a enfermedades cardiovasculares, metabólicas y de hígado graso no alcohólico, y su disminución reduce la β -oxidación, promoviendo la tumorigenicidad [20].

Con respecto a las proteínas involucradas en el ciclo de Krebs, se encuentra α -cetoglutarato deshidrogenasa (OGDHA), encargada de transformar α -cetoglutarato en succinil CoA. Para la cual, Tretter et al. reportaron que es sensible a especies reactivas de oxígeno, en donde el estrés oxidativo conlleva a deficiencia metabólica. Su disminución también se asoció con deficiencia mitocondrial, que es esencial en los procesos neurodegenerativos[21]. Estas proteínas a su vez pueden ser promovidas por la dieta cetogénica, para restringir la ingesta calórica, generar disminución de la glucólisis, y activación del metabolismo lipídico para obtención de energía.

Como la dieta cetogénica proporciona una alta concentración de ácidos grasos, estos actúan como ligandos específicos de reguladores de la expresión génica como PPAR, que modulan la expresión de genes que promueven la oxidación de ácidos grasos. PPAR ha presentado propiedades antineoplásicas, donde los agonistas de PPAR- α (WY-14643) y PPAR- γ (pioglitazona) ayudan a reducir la lesión cerebral en pacientes con glioma, sin destruir las células tumorales [22]. Muchos agonistas de PPAR son útiles para tratar trastornos de glucosa y lípidos,

ya que estos receptores tienen la capacidad de unirse a diferentes ácidos grasos naturales y sintéticos, y transcribir genes implicados en la homeóstasis lipídica y de la glucosa.

Una ventaja que tienen estos receptores es la amplia actividad metabólica que los caracteriza, y eso incluye, su participación en la astrocitosis. Donde se ha encontrado que PPAR- γ mejora la captación de glucosa y glutamato, al mismo tiempo que promueve la liberación de lactato, generando protección a las neuronas de la excitotoxicidad y privación de glucosa [23]. PPAR- α es capaz de inducir β -oxidación, principalmente cuando los niveles de glucosa se encuentran alterados, obteniendo cuerpos cetónicos que suministran energía a las neuronas [23]. En el caso de PPAR- β , es poco el conocimiento que se ha adquirido sobre este isotipo, aunque se ha reportado que activa el metabolismo de lípidos en condiciones de isquemia, principalmente mediante el uso de gotas lipídicas para obtención de energía [23].

Los ligandos de PPAR- α (Bezafibrato, Gemfibrozilo) y PPAR- γ (rosiglitazona) inhiben la viabilidad de glioblastoma, por lo que son potenciales moléculas para el tratamiento del cáncer [24]. Respecto a PPAR- β , se ha propuesto que regula la maduración de células cerebrales, lo que implica mediadores inflamatorios liberados por estas células [25]. También se ha evidenciado que tiene un papel importante en el control de inflamación, comprobado con el aumento del nivel de IFN- γ en ratones con isquemia cerebral y expresión inhibida de PPAR- β [26].

Es importante tener en cuenta que, mediante la regulación del metabolismo lipídico, PPAR ofrece beneficios metabólicos, donde tiene un gran impacto en la homeostasis de glucosa [27]. Teniendo en cuenta esto, es importante comprender la actividad de estos receptores en relación con la terapia cetogénica y los ácidos octanoico (C8) y decanoico (C10) para el tratamiento contra el glioblastoma.

2. Justificación

Los gliomas grado IV, también llamados glioblastoma multiforme, tienen la mayor incidencia entre los tumores cerebrales primarios, con un porcentaje del 60%, alto grado de invasividad con muy mal pronóstico y una tasa de supervivencia muy baja [28-30]. Aunque el glioblastoma es un tumor poco frecuente, con una incidencia global de menos de 10 por cada 100.00 personas, presenta un mal pronóstico con una tasa de supervivencia de 14 a 15 meses, por lo que es considerado un problema de salud pública [30].

La naturaleza altamente invasiva del glioblastoma hace que la mayoría de las terapias actuales sean ineficaces y la calidad de vida es deficiente. Solo existe un tratamiento farmacológico aprobado para el glioblastoma que es radiación y quimioterapia con temozolomida [31-33]. Tanto el tumor como su tratamiento contribuyen a aumentar la carga del paciente, comorbilidades incapacitantes, incluida la disminución de funciones neurocognitivas [32]. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamientos complementarios, novedosos y de bajos efectos secundarios para el paciente.

Como posible tratamiento, se ha descrito la dieta cetogénica, la cual está basada en una dieta con una alta proporción de grasas y baja proporción de carbohidratos y proteínas. Algunas investigaciones preliminares han empezado a probar la dieta cetogénica, como nueva terapia complementaria en el tratamiento de glioblastoma multiforme. Este efecto ha sido inicialmente explicado bajo el principio de una dieta cetogénica restrictiva en calorías, lo cual funcionaría según la teoría del efecto Warburg [34, 35]. La deficiencia de glucosa en la dieta reduciría la capacidad que tiene el tumor de hacer glicolisis anaeróbica y producir el ATP que se necesita para la progresión y desarrollo del tumor. Por otro lado, los cuerpos cetónicos producidos en el paciente mediante el metabolismo de las grasas servirían como sustratos metabólicos del ciclo de

Krebs y sustento energético para el paciente supliendo la deficiencia de glucosa. Además, bajo la restricción calórica se induce la activación de genes que son neuroprotectores y que pueden inducir la apoptosis de células cancerígenas [36]. Aunque, la restricción de glucosa fue el sustento original de las terapias basadas en dieta cetogénica como potencial tratamiento complementario para el cáncer, múltiples investigaciones han sugerido otros mecanismos resaltando el efecto de los ácidos grasos de cadena media (AGCM) para controlar el desarrollo del tumor. Particularmente, el ácido octanoico (C8) y decanoico (C10) presentan efectos beneficiosos en diferentes enfermedades cerebrales como lesión cerebral traumática, epilepsia y Alzheimer [37].

Los AGCM son ligandos naturales de los factores de transcripción PPARs, los cuales son expresados en diferentes tejidos con una alta tasa metabólica, pero también en células del sistema inmune. Los PPARs, son capaces de regular la expresión de genes metabólicos y proinflamatorios, modular la expresión de enzimas antioxidantes, especies reactivas de oxígeno y favorecer la biogénesis mitocondrial, lo que genera un efecto neuroprotector [38, 39]. Los PPARs, han sido estudiados también por sus efectos en glioblastoma, donde se ha encontrado que su activación, frena el ciclo celular del tumor induciendo apoptosis y regulando la acción de factores de transcripción tumorales con efecto proinflamatorio y dirigiendo a una alteración de proteínas mitocondriales lo cual genera una catástrofe metabólica para el tumor [40]. Además, el microambiente inmunológico del tumor, determinado por macrófagos y microglía, también puede ser modulado por la activación de los PPARs los cuales pueden regular su perfil metabólico e inflamatorio, lo que va a repercutir en bloquear la reprogramación inducida por el tumor, reduciendo la invasión, metástasis y la resistencia a terapias [41].

De esta manera, ha sido de interés en varias investigaciones probar ligandos de PPAR para modular el desarrollo del tumor [41], como es el caso de los ácidos grasos de cadena media. El efecto de la dieta cetogénica sobre el tratamiento de tumores de glioblastoma, podría ser atribuido a la capacidad señalizadora de estos ácidos, regulando procesos no solamente metabólicos sino también transcripcionales a través de los genes y vías de señalización modulados por los PPARs. Considerando lo anterior, en este trabajo se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de la dieta cetogénica y los ácidos grasos octanoico y decanoico sobre los genes modulados por PPAR en el desarrollo de tumores de glioblastoma: estudio de investigación con modelo in vitro de la línea celular T98G e in vivo de pez cebra?

3. Marco teórico

3.1 Gliomas

El cuerpo humano está conformado por diferentes sistemas especializados. El sistema nervioso, encargado de transmitir señales desde el cerebro hacia el resto de órganos, es uno de los sistemas más importantes [42]. Como es bien conocido, en él existen diferentes tipos de células encargadas de mantener las condiciones necesarias para que ocurra la sinapsis y mantener la homeostasis. Estas células son conocidas como células gliales, dentro de las cuales se encuentran los astrocitos, oligodendrocitos, microglía y las células endoteliales [42].

Los astrocitos tienen una función importante, ya que participan en lo que se conoce como “sinapsis tripartita”, en donde no solo participan las neuronas pre y pos sinápticas, sino también los astrocitos como mediadores que eliminan la sinapsis cuando deja de ser funcional [43]. Los oligodendrocitos se encargan de formar la vaina de mielina, que generan un aislamiento eléctrico alrededor de las fibras nerviosas, permitiendo la rápida transmisión de señales eléctricas en el

cerebro [44]. Respecto a la microglía, básicamente cumple una función inmunitaria similar a la de los macrófagos, pero en el cerebro, protegiendo las funciones del sistema nervioso [44].

Teniendo en cuenta lo anterior, existen diferentes tipos de tumores que pueden atacar el sistema nervioso, dependiendo la célula que se vea afectada. En general, estos tumores se conocen como gliomas, siendo los tumores cerebrales más frecuentes encontrados en humanos. Estos se clasifican histopatológicamente en subtipos que incluyen astrocitomas, oligodendrogliomas y ependiomas. Adicionalmente, estos también se clasifican en grado I-IV según los criterios patológicos establecidos por la OMS [45, 46]. Mientras los gliomas grado I son en su mayoría tratables con resección quirúrgica total, los gliomas grado II y III son invasivos, progresan a tumores de mayor grado y tienen mal pronóstico [46].

Los pacientes que padecen este tipo de cáncer presentan supervivencia media dependiendo el grado tumoral, donde los de grado I presentan tiempos de vida de 6 a 8 años, mientras que los de grado IV pueden ir de 10 a 24 meses [46]. Estos tumores se originan en los astrocitos, que son células indispensables estructuralmente, manteniendo la red neuronal [47, 48]. Dentro de los astrocitomas de alto grado se incluyen los tumores más comunes del sistema nervioso central en adultos, el glioblastoma multiforme (GBM) y el astrocitoma anaplásico [48].

GBM se ha caracterizado por tener la mayor incidencia entre los tumores cerebrales primarios, con un porcentaje del 60%, alto grado de invasividad con muy mal pronóstico y una tasa de supervivencia muy baja [45, 49, 50]. Esta enfermedad está asociada a procesos inflamatorios durante el desarrollo del tumor, invasión y metástasis, ya que un microambiente inflamatorio es esencial para el crecimiento de cualquier tumor [51]. El microambiente depende de células como los macrófagos asociados a tumores, que promueven la secreción de factores de crecimiento, la angiogénesis y suprimen la inmunidad adaptativa [52].

Durante la transformación neoplásica y progresión tumoral, el metabolismo de la célula tumoral es reprogramado significativamente bajo un patrón metabólico anormal caracterizado por una alta tasa de glicolisis anaeróbica y disfunción mitocondrial. El alto consumo energético que requiere para disparar su alta proliferación celular implica que el tumor trabaje a altas concentraciones de glucosa necesaria para la producción de ATP bajo condiciones de hipoxia (Efecto Warburg) [53, 54].

3.2 Inflamación

El microambiente inflamatorio es una característica importante que promueve los cambios epigenéticos del glioblastoma, ayudando al tumor a burlar la vigilancia inmunológica. Las células tumorales de glioblastoma y la microglía/macrófagos son los mayores contribuyentes de la condición inflamatoria [55]. La microglía presenta dos fenotipos característicos: M1 que responde a lesión o infección mediante la producción de citocinas proinflamatorias que permita la infiltración de leucocitos periféricos en el tejido [14], y M2 es el fenotipo antiinflamatorio que facilita la fagocitosis, promueve la reconstrucción de matriz extracelular y reparación de tejidos [56].

Los macrófagos reclutados, intentan restaurar la función normal del tejido dañado, pero su interacción con las células neoplásicas en el microambiente tumoral cambia sus propiedades, lo que resulta en inmunosupresión y promoción del crecimiento tumoral. A su vez, en este tipo de cánceres los macrófagos asociados al tumor comprenden microglía residente, macrófagos perivasculares o periféricos y células derivadas de monocitos [57].

Este proceso inflamatorio impulsa la progresión neoplásica a tumores malignos, las citocinas inflamatorias mejoran la proliferación, capacidad invasiva del tumor. Los tumores de

glioblastoma se encuentran rodeados de citocinas proinflamatorias, algunas quimiocinas y factores de crecimiento, principalmente las citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 promueven la supervivencia y crecimiento de estos tumores [55]. Específicamente la IL-1 β , cumple un papel importante en la supervivencia del glioblastoma, ya que se ha encontrado que tiene una regulación positiva mediada por el factor inducible a la hipoxia, indispensable en la progresión tumoral [55].

Estas características están relacionadas con la resistencia al tratamiento que conlleva a un peor pronóstico general, enfatizando la importancia de estudiar los mecanismos de interacción de los macrófagos con el tumor, por lo que las células malignas descarrilan las respuestas inmunes antitumorales en favor de programas inmunes que facilitan la progresión tumoral [57].

3.3 Metabolismo

Una de las principales características del cáncer es la alteración metabólica que presenta. Las células tumorales tienen la capacidad de reprogramar las vías de adquisición y metabolismo de nutrientes necesarios para tener las actividades celulares. Se ha descrito que las células normales son capaces de obtener un 10% de energía mediante la glucólisis y el otro 90% lo obtienen por respiración celular, mientras que en las células cancerosas, aproximadamente el 50% de la energía celular es generada a través de procesos glucolíticos, y la energía restante se obtiene en la mitocondria [58]. Se sabe que la glucólisis es el proceso fisiológico que ocurre en respuesta a la hipoxia en los tejidos normales, sin embargo, Otto Warburg observó en 1920 que las células tumorales toman glucosa y producen lactato constantemente, independiente de la disponibilidad de oxígeno del medio [59], ese lactato le permite a las células tumorales adaptarse

mejor, mediante el aumento en la expresión de oncogenes, factores de transcripción y genes proliferadores [60].

Respecto al metabolismo de ácidos grasos, este también se ve alterado en los procesos cancerosos, ya que, en forma de fosfolípidos, estos son esenciales para la formación de membranas celulares y moléculas de señalización. En el caso de las células tumorales, estas son capaces de sintetizar ácidos grasos de novo, mientras que las células normales lo hacen mediante fuentes exógenas como la dieta [61]. Los lípidos cumplen diversas actividades biológicas contribuyendo a aspectos tumorales como el crecimiento, obtención de energía, homeóstasis redox y facilidad de generar metástasis [62]. La síntesis de ácidos grasos es un proceso anabólico que transforma los carbonos obtenidos principalmente del citrato generado a partir del ciclo de Krebs en ácidos grasos. Durante la hipoxia o disfunción mitocondrial, el ciclo de Krebs se ve inhibido, y el citrato se obtiene a partir de la carboxilación reductora de α -cetoglutarato obtenido del metabolismo descontrolado de la glutamina, que genera acetil-CoA [62]. De esta manera se favorece el crecimiento celular y cubrimiento energético en cáncer.

3.4 Dieta cetogénica

Para tratar el cáncer existen diferentes tratamientos que regulan los efectos negativos de esta enfermedad, uno de ellos es la dieta cetogénica, que está definida como un tratamiento no farmacológico para tratar enfermedades neurodegenerativas. Esta consiste en la selección de alimentos que aportan un porcentaje elevado de grasas (80%), bajo contenido de carbohidratos y aporte de proteínas acorde a las necesidades del paciente. La composición normal de esta dieta, está basada en utilizar 4 gramos de grasas por cada gramo de carbohidratos [63, 64]. Debido a la inadecuada disponibilidad de glucosa como fuente de energía, se induce la generación de cuerpos

cetónicos. Este proceso ocurre en el hígado, donde va a transformar la grasa en ácidos grasos libres y, por medio de cetogénesis producirá cuerpos cetónicos como el β -hidroxibutirato (BHB), acetona y acetoacetato. El BHB genera deficiencia del transportador de glucosa 1 y del piruvato deshidrogenasa, que permite aportar Acetil-CoA directamente al ciclo de Krebs sin un proceso previo de glucólisis [64-66]

La terapia cetogénica permite reducir los niveles de glucosa circulante, mientras eleva los niveles de cuerpos cetónicos y ácidos grasos libres, lo que conlleva a alterar varios procesos del metabolismo tumoral [11, 67]. Los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos de cadena media como C8 y C10 podrían inhibir o reducir la viabilidad y alterar el crecimiento de las células tumorales. Adicionalmente, la terapia cetogénica, tiene un efecto neuroprotector frente a los procesos neurodegenerativos secundarios que ocasiona el tumor [12, 68].

3.5 Receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR)

Los PPAR son un tipo de receptores nucleares cuyo principal ligando son los ácidos grasos libres, que le permiten como estos factores de transcripción regulando aspectos clave del metabolismo de lípidos [69]. Sin embargo, también están asociados a la regulación de enfermedades vasculares, diferenciación celular, sensibilización a insulina y cáncer [70]. Se conocen 3 isotipos de este receptor: PPAR- α conocido por participar en la regulación de lípidos y estimular la β -oxidación para producir energía y romper ácidos grasos de cadena larga evitando la acumulación de lípidos y toxicidad [71-73]. PPAR- β que puede ser activado por ácidos grasos de cadena larga, tiene un papel en la proliferación de células epidérmicas y metabolismo lipídico [74]. PPAR- γ que tiene propiedades antiinflamatorias, regula la diferenciación de adipocitos

controlando la homeostasis de glucosa y lípidos, inhibe el estrés oxidativo, y mejora la función endotelial [75].

Respecto a los tumores, la mayoría de las investigaciones indican que la activación de PPAR- β se relaciona con progresión tumoral, mientras que PPAR- α y PPAR- γ se asocian con una actividad antitumoral. Esta actividad antitumoral promovida por PPAR- α está relacionada con la disminución de la migración y la angiogénesis, ya que se ha encontrado que este receptor aumenta la expresión de genes inhibidores de la angiogénesis como los con la endostatina y la trombospondina-1, así mismo, disminuye la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del citocromo P450. Este mismo isotipo se ha relacionado con la regulación inflamatoria [76].

Respecto a PPAR- γ , se ha encontrado que puede bloquear la actividad de la ciclina D1, induciendo la detención del ciclo de celular. Relacionado con esto, promueve la apoptosis regulando negativamente la expresión del gen *BCL-2* y elevando el factor proapoptótico Bax [77]. También se ha encontrado que la expresión tumoral de PPAR- γ está relacionada con una mayor tasa de supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal, convirtiéndolo en un buen blanco terapéutico para otros tipos de cáncer [78].

Finalmente, y con respecto a la actividad negativa de PPAR- β , se ha reportado que la activación de este isotipo por su agonista GW501516 en cáncer de color aumenta la expresión del gen *COX-2* y producción de prostaglandina E2 que genera aumento en la producción de macrófagos y de citocinas proinflamatorias para mejorar la tumorigénesis. Este efecto negativo se ha presentado en diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama y de ovario, exhibiendo que la sobreexpresión de este PPAR- β promueve la supervivencia y proliferación celular [79].

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad regulatoria de los receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPARs) en la respuesta metabólica, inflamatoria y de crecimiento celular frente a la terapia cetogénica y los ácidos octanoico y decanoico en pez cebra y un modelo celular de glioblastoma.

Objetivos específicos

1. Analizar la expresión de genes inflamatorios y metabólicos modulados por la activación de los PPARs en cerebro de pez cebra, frente al tratamiento con una dieta cetogénica.
2. Analizar los efectos del silenciamiento génico de PPAR- α , PPAR- β , PPAR- γ en la modulación inflamatoria, metabólica y de crecimiento tumoral, mediante el análisis de expresión génica y niveles de citocinas en un modelo celular de glioblastoma humano, frente al tratamiento con ácido octanoico y decanoico.
3. Determinar los efectos en la modulación de la expresión génica en un modelo celular de glioblastoma humano en co-cultivo con un modelo celular de microglía, frente al tratamiento con ácido octanoico y decanoico.

DISEÑO METODOLÓGICO

1. Análisis de expresión génica en un modelo animal de pez cebra adulto.

Selección de muestras: desde el Laboratorio de Neurociencias y ritmos circadianos de la Universidad de los Andes, se recibieron las muestras de 20 peces cebra (*Danio Rerio*) adultos (entre 6 y 12 meses). Allí cuentan con un sistema automatizado de recirculación de agua con sistema de monitoreo automático (Aquanearing, Inc) en los que se mantiene la población estable y contenida de peces cebra. Brevemente, los animales se mantuvieron en un sistema de recirculación de agua a $27.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pH 7.2-8.0, niveles entre 7.2 y 8 mg/L de O_2 disuelto. Todos los procedimientos con los animales fueron previamente avalados por el CICUAL y el comité de ética de la Universidad de los Andes.

Grupos experimentales:

A. CD: *Danio Rerio* con dieta estándar L.RNC suplementado con 55% de carbohidratos complejos.

B. KD: *Danio Rerio* con fórmula nutricional a base de ácidos grasos de cadena media (AGCM) con relación 4:1(grasas: carbohidratos).

A partir de la disección del cerebro, se realizaron los siguientes procesos:

Extracción de ARN: la obtención de ARN se realizó mediante el reactivo trizol. Se utilizó cloroformo para obtener la separación de 3 fases: fase inferior de fenol cloroformo, fase intermedia blanca de ADN y una fase superior incolora de ARN. Esa fase incolora se extrajo y se precipitó el ARN utilizando isopropanol. Se realizó un lavado con etanol al 75%, y las muestras fueron resuspendidas en agua libre de RNAsas. Finalmente, la cantidad de ARN se determinó en

un espectrofotómetro teniendo en cuenta la absorbancia de la muestra en una relación de longitud de onda 260/280 nm (la relación A260/A280 para una muestra pura de ARN es 2.0).

Transcripción reversa: se utilizó el kit High capacity cDNA reverse transcription, teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante (No. 4368813, applied biosystems). El proceso de transcripción reversa se realizó teniendo en cuenta las siguientes condiciones: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C durante 5 minutos y finalmente 4°C para almacenar.

Diseño de primers: se realizó el diseño de los primers (forward y reverse) Mediante la herramienta NCBI-gene donde se encontró la secuencia del transcrito de interés. Posteriormente, con ayuda de la herramienta primer-BLAST se adecuaron los parámetros específicos teniendo en cuenta: Porcentaje de GC (no superior al 55%), tamaño entre 18 - 25 pb, temperatura de anillamiento entre 55 - 60 °C y un amplicón entre 50 – 111.

PCR en tiempo real: para evaluar la expresión génica, se realizó PCR en tiempo real del ADNc obtenido para la cuantificación de genes metabólicos, inflamatorios, *ppar* y el gen constitutivo *β-actina*. Para esto, se utilizó el termociclador CFX96 (BIORAD) y la mezcla PowerUp SYBR Green mix. La activación de la enzima fue realizada a 95°C durante 10 segundos, seguida de 40 ciclos que consistieron de: desnaturalización (95°C durante 10 segundos), anillamiento (el tiempo de anillamiento se estandarizó para los primers a evaluar), y elongación (70°C durante 30 segundos). Para finalizar, se realizó una curva de fusión a una velocidad específica de 0.1 °C/s. Se evaluaron los genes metabólicos asociados a β -oxidación: *cpt-1*, *cpt-2*, *acadm*, ciclo de Krebs: *ogdha*, *idh2*, transportador de colesterol: *abca-1*, transportador de monocarboxilato: *slc16a1*, inflamación: *ifn-γ*, *il-8*, *mmp9*, y los receptores *ppar-α*, *ppar-β* y *ppar-γ*. La cuantificación de la expresión relativa de ADNc fue realizada utilizando del método $\Delta\Delta Ct$ [80].

Análisis de datos: los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism, versión 8.0. Se utilizó la prueba t-student, utilizado para evaluar si hay diferencia significativa entre datos paramétricos y Mann Whitney para datos no paramétricos. Todos los datos en este estudio se expresaron como la media \pm desviación estándar (S.D.). Los valores de las pruebas estadísticas con un $p < 0,05$ se consideraron significativos.

2. Análisis de expresión génica en un modelo celular de glioblastoma

Cultivo celular: la línea celular T98G fue cultivada con medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, una solución de antibiótico/antimicótico al 1%. Las células se mantuvieron en dos medios de crecimiento: N.G (glucosa normal 5g/L) y B.G (glucosa baja 1g/L), para posteriores ensayos.

Silenciamiento Knock-down (siRNA): Se realizó un *knockdown* de la expresión de los PPARs (*PPAR- α* y *PPAR- β*) en las células empleando un sistema de RNA de interferencia (siRNA). Este proceso se realizó mediante las instrucciones del fabricante (Santa cruz biotechnology), por medio de transfección mediada por lípidos que permite el ingreso del siRNA de cadena simple unido al complejo RISC (RNA induced silencing complex), se une al ARNm de cada PPAR e induce su degradación.

Tratamientos: posterior a la transfección, se realizaron tratamientos con los ácidos grasos C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), y el agonista de cada isotipo de PPAR (100nM): PPAR- β (GW501516), PPAR- α (fenofibrato). Esto se realizó una vez se cumplieron las 24 horas del proceso de silenciamiento.

Grupos experimentales:

A. Células sin silenciamiento: glioblastoma sin tratamiento, glioblastoma con C8, glioblastoma con C10, glioblastoma con fenofibrato y glioblastoma con GW501516.

B. Células con silenciamiento: glioblastoma con siRNA sin tratamiento, glioblastoma con siRNA y C8, glioblastoma con siRNA y C10, glioblastoma con siRNA y fenofibrato, glioblastoma con siRNA y GW501516.

Los tratamientos se dejaron durante 72 horas, cumplido este tiempo se extrajo el sobrenadante para análisis de proteínas, y se realizó la extracción de RNA y transcripción reversa correspondiente, mediante los procedimientos descritos anteriormente con el fin de realizar los ensayos de PCR en tiempo real. Se evaluaron genes metabólicos asociados a β -oxidación: *ACADM*, ciclo de Krebs: *OGDHA*, *IDH2*, transportador de monocarboxilato: *SLC16A1*, inflamación: *IL-8*, genes tumorales: *PTEN*, *CCND3*, *BCL-2* y el receptor *PPAR- α* , *PPAR- β* y *PPAR- γ* .

Co-cultivo: el proceso de co-cultivo se realizará mediante el uso de un Transwell, en el cual las células se encuentran separadas por una membrana porosa. Durante este ensayo, las células de microglía previamente estimuladas con LPS (1 μ g/mL) se ubicaron en la capa superior del inserto de cultivo celular con membrana de poliéster y el cultivo de glioblastoma se cultivó debajo de la membrana permeable con los tratamientos. De esta manera se simuló un microambiente tumoral y de estrés para las células. Durante este proceso se realizó los tratamientos con los ácidos grasos C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), y un agonista de PPAR (100nM).

Grupos experimentales: microglía-glioblastoma sin tratamiento, microglía-glioblastoma y C8, microglía-glioblastoma y C10, microglía-glioblastoma y fenofibrato, microglía-glioblastoma y GW501516.

Análisis de proteínas: la evaluación de citocinas y proteínas del sobrenadante celular, se realizaron mediante un kit multiplex humano (No. 900000879, BioLegend). El ensayo contiene perlas codificadas por fluorescencia y permite la cuantificación de 7 proteínas en forma simultánea (IL-8, IFN- γ , IL-10, IL-1 β , IL-6, MMP-9, TNF- α), mediante el tamaño de intensidad interna de fluorescencia en cada una de las perlas, las cuales están conjugadas con un anticuerpo que se une de forma específica a un analito. Por último, la estreptavidina- ficoeritrina (SA-PE), se une a los anticuerpos de detección para proporcionar intensidades de señal fluorescentes en proporción a la cantidad de analitos unidos.

Análisis estadístico: los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism, versión 8.0. Se utilizará la prueba de ANOVA de doble vía utilizada para comparar las varianzas entre los promedios de diferentes grupos. Adicionalmente se realizó la prueba de múltiple variable Bonferroni. Todos los datos en este estudio se expresarán como la media \pm desviación estándar (S.D.). Los valores de las pruebas estadísticas con un $p < 0,05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Resultados

1. Analizar la expresión de genes inflamatorios y metabólicos modulados por la activación de los PPARs en cerebro de pez cebra, frente al tratamiento con una dieta cetogénica.

Con el propósito de evaluar la dieta cetogénica y el papel de los receptores PPARs, se realizó el análisis de expresión génica de 20 peces cebra adulto (6 meses aprox), de los cuales 10 peces fueron alimentados con una dieta alta en carbohidratos (CD) y 10 fueron alimentados con la dieta cetogénica (KD) durante 26 días. En el cerebro se analizaron cinco grupos de genes relacionados con: β -oxidación, ciclo de Krebs, transportadores de colesterol y monocarboxilato, inflamación y los isotipos del receptor PPAR. El análisis de expresión génica para los genes que participan en β -oxidación (figura 1) indicó que *cpt-1*, importante para transportar ácidos grasos de cadena larga desde el citosol por unión a moléculas de carnitina [18], no presentó diferencia significativa ($p=0,0503$) entre los grupos experimentales. Sin embargo, *cpt-2*, encargada de transformar la acilcarnitina en carnitina y liberar Acil-CoA [18], mostró un aumento significativo ($p<0,0001$) de diez veces en KD con respecto a CD. Por su parte, *acadm*, indispensable en la descomposición de ácidos grasos de cadena media [78] presentó un aumento significativo ($p=0,0041$) en el grupo KD.

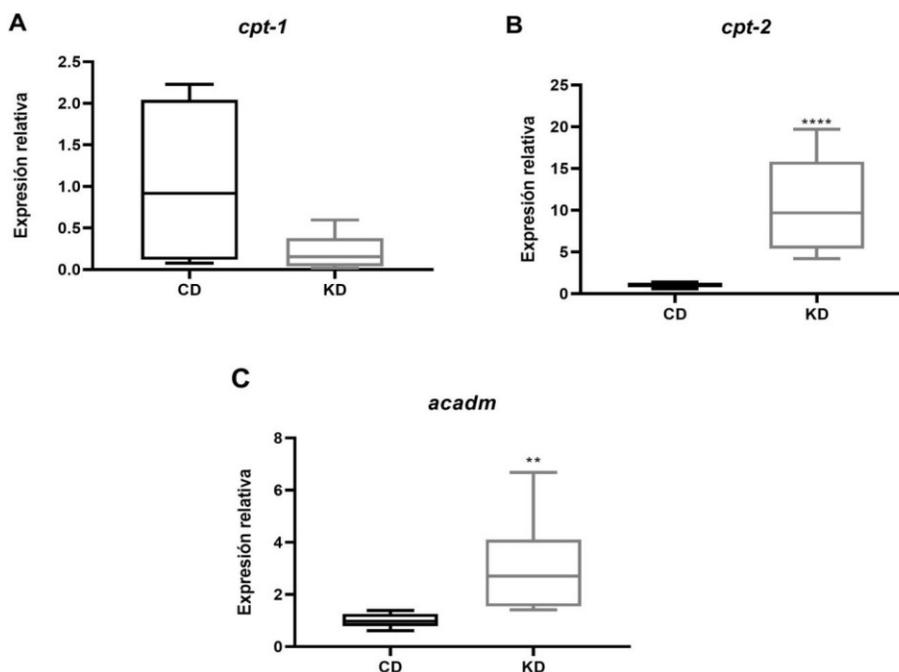


Figura 1. Expresión relativa de genes asociados a β -oxidación en cerebro de pez cebra adulto. La expresión de (A) *cpt-1*, (B) *cpt-2* y (C) *acadm* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta$ CT. n=10. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo β -actina. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de Mann Whitney (*cpt-1*) y t-student (*cpt-2* y *acadm*). $p < 0,0001$ (****) y $p < 0,005$ (**).

Otro proceso importante a considerar en la KD, es el ciclo de Krebs, vía importante en el proceso de respiración celular y obtención de energía a través de la oxidación de acetil-CoA [81]. El análisis de expresión génica mostró en el grupo de peces alimentados con KD un aumento significativo en la expresión de los genes *ogdha* ($p=0,0419$) e *idh2* ($p=0,0010$) (figura 2). *Ogdha* codifica una enzima importante en la conversión de α -cetoglutarato a succinil-CoA [81], en cuanto que *idh2*, está asociado con la producción de α -cetoglutarato a partir de D-isocitrato [81], por lo que un posible aumento en la producción α -cetoglutarato estaría asociado al aumento metabólico de ácidos grasos de cadena media (AGCM) gracias a la KD [82].

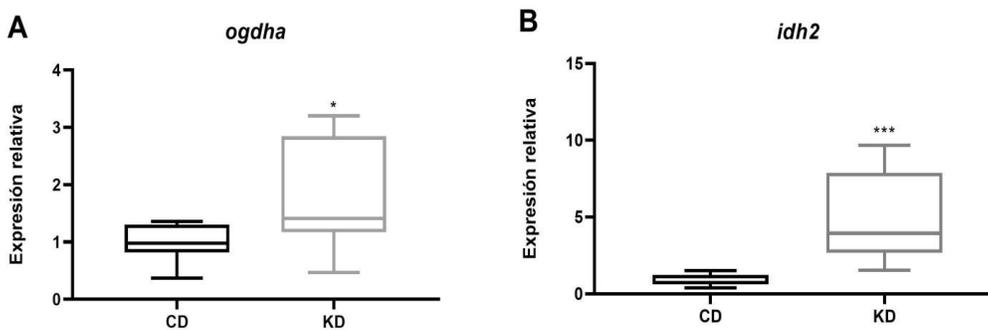


Figura 2. Expresión relativa de genes asociados a ciclo de Krebs en cerebro de pez cebra adulto. La expresión de (A) *ogdha* y (B) *idh2* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. $n=10$. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo β -actina. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba t-student. $p<0,0005$ (***) y $p<0,05$ (*).

Asociado al metabolismo de la KD, existen algunos transportadores que aumentan su actividad bajo estas condiciones (figura 3). El gen *abca-1*, participa en el transporte de colesterol a través de la membrana [83] y se ha caracterizado como un regulador importante del metabolismo del colesterol cerebral [83]. Este gen presentó un incremento significativo en su expresión ($p=0,0028$) lo cual fue dos veces mayor en el grupo KD en comparación con el grupo CD. Por otro lado, el transportador MCT1, codificado por el gen *slc16a1*, tiene una actividad importante en la KD, al transportar moléculas de monocarboxilato (cuerpos cetónicos, piruvato, lactato) [84]. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales.

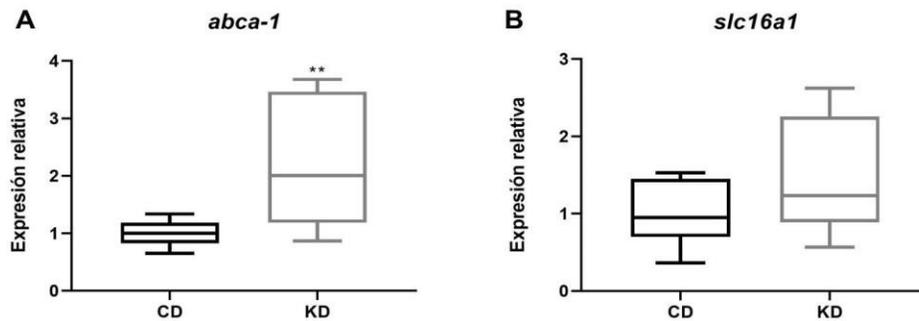


Figura 3. Expresión relativa de genes asociados a transporte en cerebro de pez cebra adulto. La expresión de (A) *abca-1*, (B) *slc16a1* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. n=10. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *β -actina*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba t-student. $p < 0,005$ (**).

Desde el punto de vista inflamatorio se evaluó la expresión de los genes proinflamatorios *il-8*, *ifn- γ* y *mmp9* (figura 4), y el gen antiinflamatorio *il-10*. En este caso, los tres genes proinflamatorios evidenciaron un aumento significativo (*il-8* ($p=0,0148$), *ifn- γ* ($0,0055$) y *mmp9* ($p=0,0002$)) de expresión en el grupo KD con respecto a CD, con valores $p=0,0148$, $p=0,0055$ y $p=0,0002$, respectivamente. Mientras que no se detectaron transcritos de *il-10* en ninguno de los grupos de estudio.

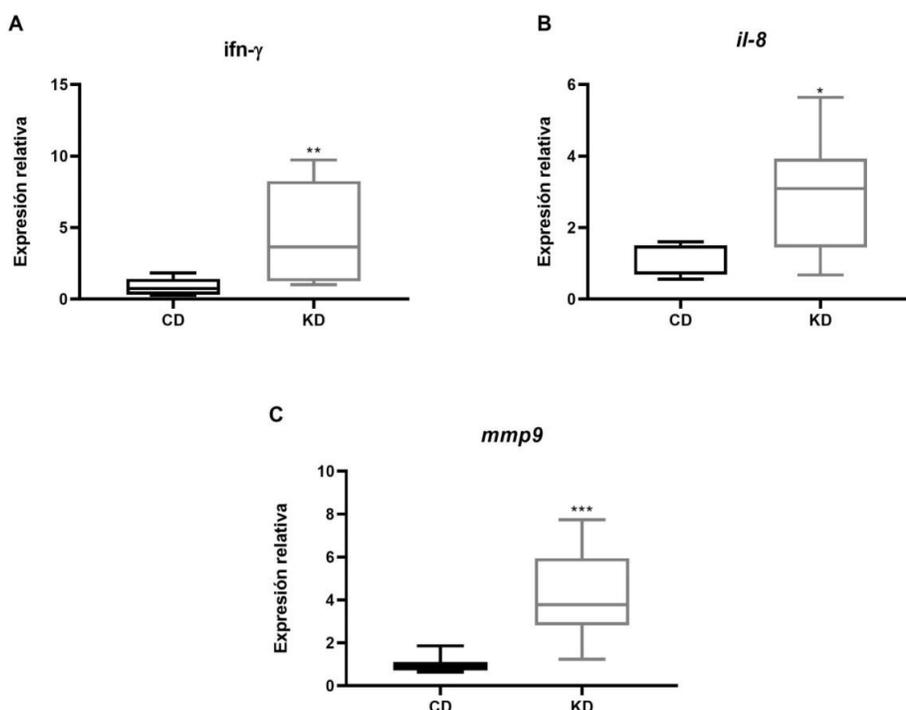


Figura 4. Expresión relativa de genes inflamatorios en cerebro pez cebra adulto. La expresión de (A) *ifn-γ*, (B) *il-8*, (C) *mmp9* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. n=10. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *β-actina*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de Mann Whitney (*il-8* y *mmp9*) y t-student (*ifn-γ*). $p < 0,0005$ (***), $p < 0,005$ (**), $p < 0,05$ (*).

Teniendo en cuenta que los ácidos grasos presentan un rol importante en la KD, y a su vez son ligandos de los receptores PPAR, se realizó el análisis de expresión génica de los isotipos de este receptor (figura 5). En el modelo de pez cebra adulto, se evidenció una disminución significativa en la expresión de *ppar-β* ($p=0,0369$) y aumento en la de *ppar-γ* ($p=0,0059$) en el grupo KD. Notablemente, el isotipo *ppar-α* no presentó niveles detectables de expresión en el tejido estudiado.

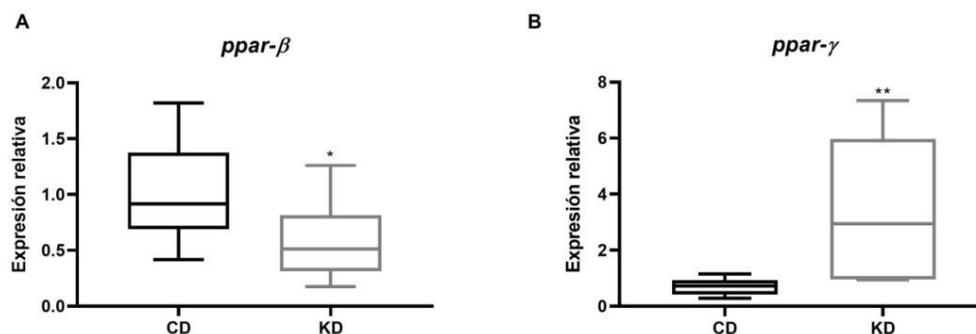


Figura 5. Expresión relativa de PPAR en cerebro de pez cebra adulto. La expresión de (A) *ppar-β*, (B) *ppar-γ* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. n=10. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *β-actina*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba t-student. $p < 0,005$ (**), $p < 0,05$ (*).

2. Analizar los efectos del silenciamiento génico de *PPAR-α*, *PPAR-β*, *PPAR-γ* en la modulación inflamatoria, metabólica y de crecimiento tumoral, mediante el análisis de expresión génica y niveles de citocinas en un modelo celular de glioblastoma humano, frente al tratamiento con ácido octanoico y decanoico.

Para tener un mayor acercamiento al efecto de la KD en células tumorales se decidió utilizar como modelo *in vitro* de glioblastoma la línea celular T98G. En el cultivo se simuló la KD utilizando los ácidos grasos C8 y C10 en medio B.G. Estos ácidos grasos han presentado un efecto neuroprotector [28] y adicionalmente, se ha encontrado que en astrocitos, estos ácidos grasos aumentan la actividad metabólica, produciendo altos niveles de Acetil- CoA, y de β -hidroxibutirato [85].

2.1 Análisis de expresión génica

2.1.1 Análisis de expresión génica en células T98G sin silenciamiento.

En la línea celular T98G, mediante el uso de AGCM y la baja concentración de glucosa, se buscó realizar una aproximación experimental a una dieta cetogénica *in vitro*. Como ya se mencionó anteriormente, *ACADM* es la primera enzima del proceso de β - oxidación. En la figura 6A se evidencia un aumento significativo en los niveles de expresión de *ACADM* para todas las condiciones experimentales realizadas en medio B.G ($p < 0,0001$). Por otro lado, respecto al ciclo de Krebs, los transcritos de las enzimas analizadas *IDH* y *OGDHA* mostraron un aumento significativo en el grupo control con medio B.G con respecto al medio N.G ($p = 0,0018$, *IDH* y $p = 0,0087$, *OGDHA*) (figura 6B y 6C). Sin embargo, para los demás tratamientos no se observó diferencia significativa en la expresión de ambos genes. Los niveles de transcritos asociados al transporte de monocarboxilato (*SLC16A1*) señalaron un incremento significativo en el grupo control realizado en medio B.G en comparación con el grupo control de medio N.G ($p < 0,0001$) (figura 6D).

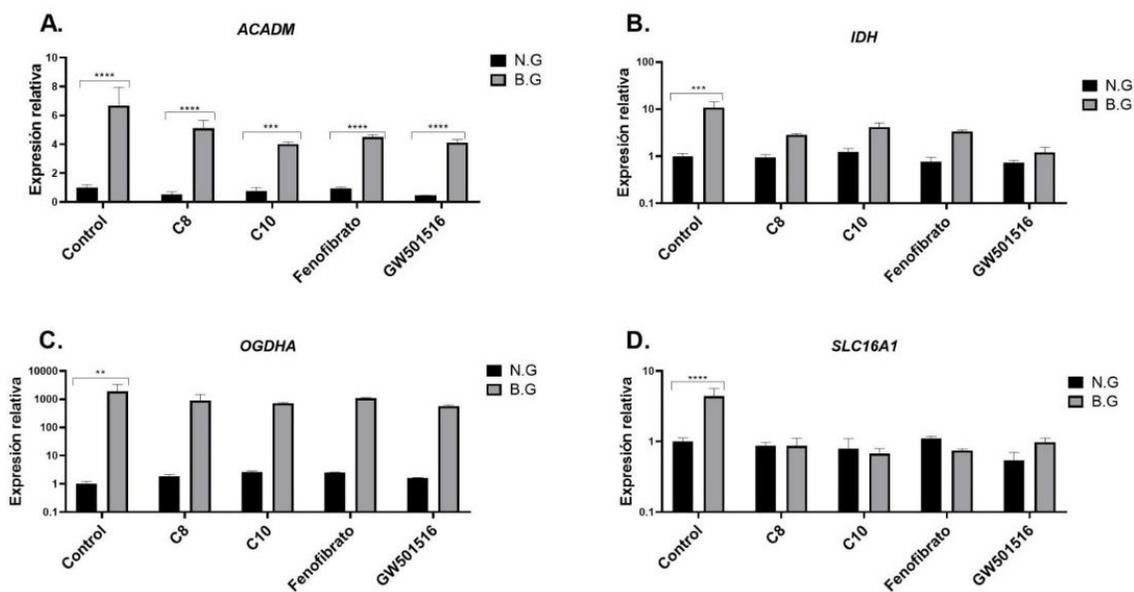


Figura 6. Expresión relativa de genes metabólicos en la línea tumoral T98G sin silenciamiento génico. La expresión de (A) *ACADM*, (B) *IDH*, (C) *OGDHA* y (D) *SLC16A1* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y medio B.G (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,0005$ (***) y $p < 0,005$ (**).

Otra característica importante a analizar en las células tumorales es su capacidad proliferativa, en este caso, se evaluó mediante la expresión de los genes ciclina D3 (*CCND3*), células de linfoma B2 (*BCL-2*) y fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (*PTEN*). Se sabe que las ciclinas de tipo D, como *CCND3*, en asociación con las cinasas dependientes de ciclinas (*CDK4/CDK6*) son impulsores del ciclo celular [86]. En la figura 7A se observa un aumento significativo en los niveles de expresión de *CCND3* en todas las condiciones evaluadas en medio B.G ($p < 0,0001$), excepto en el grupo control.

El gen antitumoral *PTEN* está encargado de suprimir la vía de supervivencia celular fosfoinositida 3-quinasa (PI3K)-AKT [87], antagonizando la acción de PI3K al no permitir la fosforilación de PIP3, y por consiguiente, inactivando AKT [87]. En la figura 7B se observa el análisis de expresión para este gen, el cual mostró un aumento significativo en los grupos control ($p = 0,0003$), C8 ($p < 0,0001$) y C10 ($p < 0,0001$), mientras que para los grupos con fenofibrato y GW501516 no se detectaron cambios significativos.

El gen regulador de la muerte celular *BCL-2* se encarga de promover la supervivencia al inhibir la apoptosis, evitando la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales como el citocromo C y el factor inductor de apoptosis [88]. En las células cultivadas en medio B.G se

observó un aumento significativo en la expresión de este gen en todos los tratamientos respecto al mismo tratamiento en células cultivadas en medio N.G ($p < 0,0001$) (figura 7C).

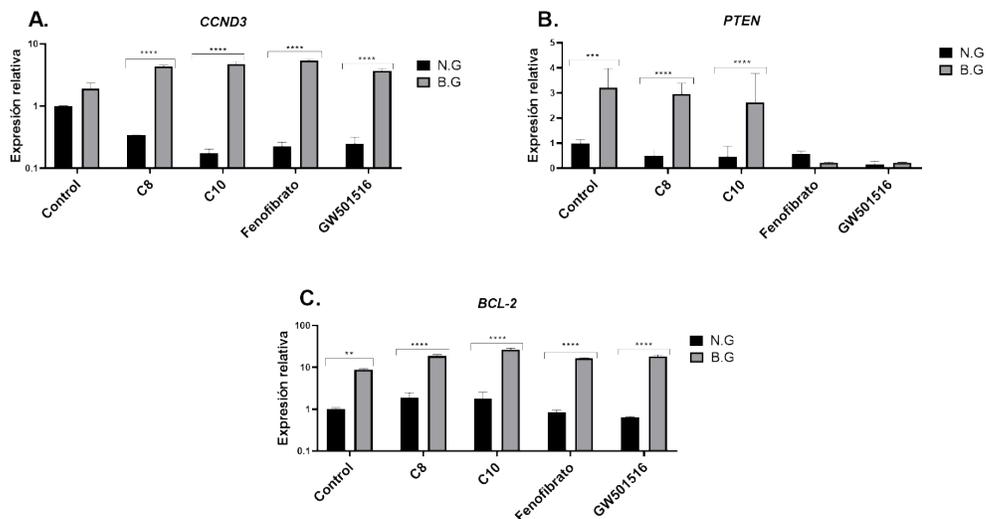


Figura 7. Expresión relativa de genes tumorales en la línea tumoral T98G. La expresión de (A) *CCND3*, (B) *PTEN* y (C) *BCL-2* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y medio B.G (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****) y $p < 0,005$ (**).

Finalmente, con el propósito de evaluar el papel del receptor PPAR, se analizó el nivel de expresión del isotipo *PPAR- α* y *PPAR- β* para cada condición. En la figura 8A se observa que la expresión de *PPAR- α* aumentó significativamente en los tratamientos con C8 ($p = 0,0110$), fenofibrato ($p = 0,0036$) y GW501516 ($p < 0,0001$) en medio B.G con respecto al medio N.G. Mientras que los grupos control y decanoico no presentaron cambios. En el análisis de expresión para *PPAR- β* se evidenció disminución significativa en todos los tratamientos realizados en

medio B.G en comparación con los efectuados en medio N.G ($p < 0,0001$) (figura 8B). Sin embargo, con respecto al isotipo *PPAR-γ* no se detectó expresión génica en la línea celular T98G.

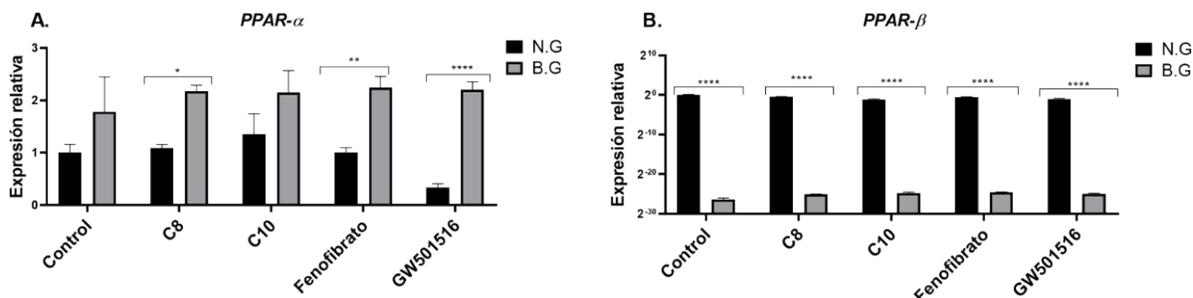


Figura 8. Expresión relativa de *PPAR* en la línea tumoral T98G sin silenciamiento. La expresión de (A) *PPAR-α*, y (B) *PPAR-β* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y medio B.G (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,005$ (**) y $p < 0,05$ (*).

A partir de los resultados obtenidos, se realizó una comparación adicional entre las diferentes condiciones experimentales evaluadas (C8, C10, fenofibrato y GW501516), de forma independiente para los dos medios de cultivo: N.G y B.G. Para esto se elaboró un mapa de calor señalando en verde los valores inferiores a 1, en negro el valor de referencia y en rojo los valores superiores a 1, la escala fue dependiente del nivel de expresión relativa presentado en cada grupo experimental.

En el caso de las células cultivadas en medio N.G y realizando un análisis comparativo de cada tratamiento con su grupo control, se identificó una disminución significativa en la expresión de *ACADM* únicamente para el tratamiento con el agonista de *PPAR-β*, GW501516 ($p = 0,0345$)

(figura 9A). En contraste, el gen *OGDHA* evidenció un aumento significativo de su expresión en los grupos tratados con C10 ($p=0,0040$) y fenofibrato ($p=0,0056$). Sin embargo, los genes *IDH*, *SLC16A1* e *IL-8* no mostraron ningún cambio estadísticamente significativo en su expresión.

En los genes tumorales y receptores PPAR analizados en los grupos experimentales cultivados en medio N.G (figura 9A), se evidenció que la expresión de *CCND3* disminuyó significativamente luego del tratamiento con C8 ($p=0,0307$), C10 ($p=0,0019$), fenofibrato ($p=0,0032$) y GW501516 ($p=0,0043$). Así mismo, los niveles de transcritos de *PTEN* se vieron considerablemente disminuidos con los tratamiento realizados con C8 ($p=0,0475$), C10 ($p=0,0254$) y GW501516 ($p=0,0005$). Mientras que la expresión del gen *BCL-2* no se vio afectada significativamente por ningún tratamiento. Respecto a los receptores PPAR, se evidenció que *PPAR- α* disminuyó su expresión en presencia de GW501516 ($p=0,0261$), en tanto que, *PPAR- β* no presentó cambios bajo ninguna condición.

En contraste con los resultados observados en medio con glucosa normal, los genes evaluados en medio bajo en glucosa exhibieron cambios más drásticos en la expresión génica con los tratamientos efectuados (figura 9B). Los genes metabólicos que presentaron cambios en condiciones B.G comparado con su control fueron: *IDH*, que presentó disminución significativa al tratar las células con C8 ($p=0,0107$), C10 ($p=0,0260$), fenofibrato ($p=0,0126$) y GW501516 ($p=0,0233$); y *SLC16A*, que también disminuyó su expresión en presencia de C8 ($p=0,0147$), C10 ($p=0,0096$), fenofibrato ($p=0,0112$) y GW501516 ($p=0,0187$).

Respecto a los genes tumorales y receptores PPAR analizados en los grupos experimentales cultivados en medio B.G (figura 9B), *CCND3* evidenció un aumento significativo de expresión en los tratamientos C8 ($p<0,0001$), C10 ($p<0,0001$), fenofibrato ($p<0,0001$) y GW501516 ($p=0,0014$). Similarmente, *BCL-2* también presentó una disminución significativa,

provocado por todos los tratamientos utilizados (C8 ($p=0,0050$), C10 ($p<0,0001$), fenofibrato ($p=0,0313$) y GW501516 ($p=0,0064$)). Por el contrario, *PTEN* ostentó una disminución significativa únicamente para los tratamientos con los agonistas fenofibrato ($p=0,0005$) y GW501516 ($p=0,0005$). Finalmente el isotipo de *PPAR-β* aumentó significativamente sus niveles de transcritos en presencia de C10 ($p=0,0174$) y fenofibrato ($p=0,0013$) (figura 9B).

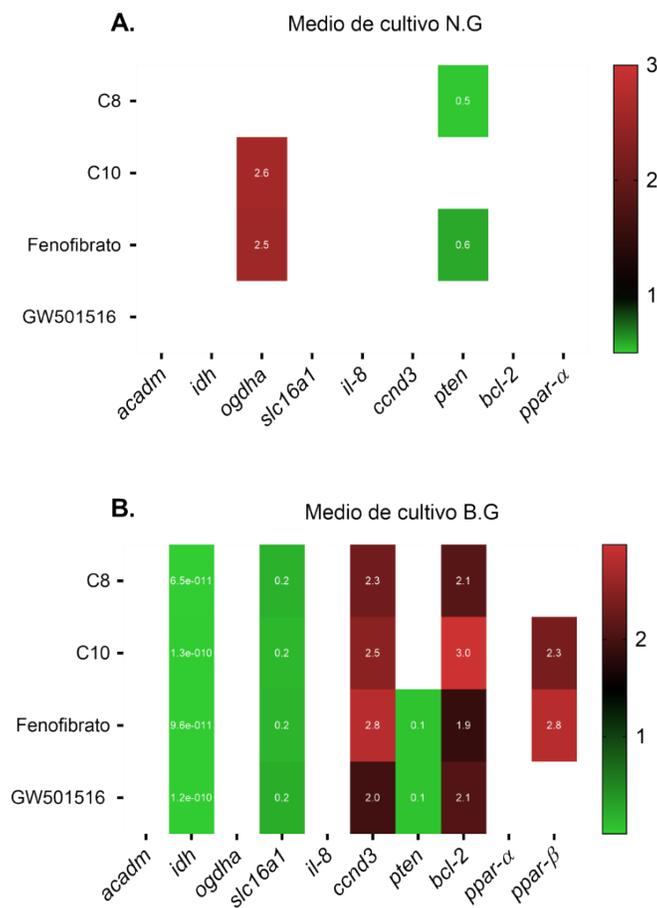


Figura 9. Diagrama de mapa de calor de los niveles de expresión génica en células T98G sin silenciamiento. La expresión génica en (A) medio de cultivo N.G y (B) Medio de cultivo B.G fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y medio B.G ($n=3$). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las columnas y filas del mapa de calor

representan los genes y grupos experimentales, respectivamente. La escala de colores indica veces de cambio en la expresión génica verde con expresión relativa menor a 1, rojo, superior a 2.

2.1.2 Análisis de expresión génica en la línea celular T98G con siRNA *PPAR-α* en medio N.G

Con el propósito de realizar un acercamiento al rol de PPAR en el proceso cetogénico, se realizó el silenciamiento génico de los isotipos *PPAR-α* o *PPAR-β* en medio de cultivo N.G o B.G para los diferentes grupos experimentales. Posteriormente, se determinaron los cambios en expresión génica de los genes previamente analizados para las células sin silenciamiento. En el caso del isotipo *PPAR-α*, las células con interferencia génica para este receptor, presentaron una reducción en su expresión del 80% en comparación con las células sin siRNA para *PPAR-α* (figura 10).

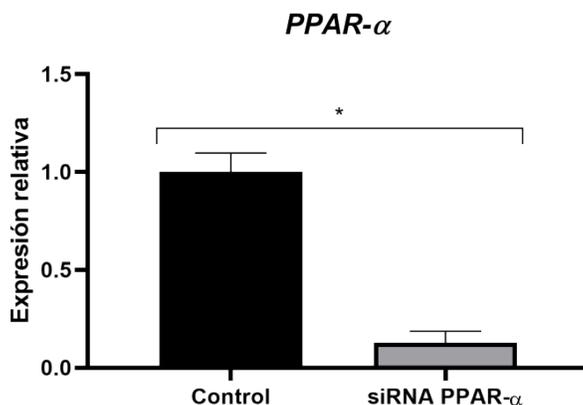


Figura 10. Expresión relativa de *PPAR-α* en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-α*. La expresión de *PPAR-α* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron interferidas mediante una transfección mediada por lípidos (n=3) para los posteriores tratamientos con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y fenofibrato (100nM) durante 72 horas. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *UBC*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba t-student. $p < 0,05$ (*).

En las células cultivadas en medio N.G, se identificó para los genes metabólicos que el gen *ACADM* disminuyó significativamente su expresión en los grupos control ($p=0,0016$), C10 ($p=0,0247$) y fenofibrato ($p=0,0004$) respecto a las células sin silenciamiento, en tanto que C8 y GW501516 no presentaron cambios considerables (figura 11A). Por su parte, *IDH* exhibió un aumento significativo en los niveles de transcritos encontrados exclusivamente en el grupo control en condiciones de silenciamiento ($p<0,0001$) (figura 11B). El gen *OGDHA* mostró una disminución significativa solamente con el fenofibrato en células con interferencia génica para *PPAR- α* ($p=0,0038$) (figura 11C). Por su parte, el silenciamiento no afectó la expresión del gen *SLC16A1* (figura 11D), ya que no se evidenció cambio significativo para ninguno de los tratamientos evaluados.

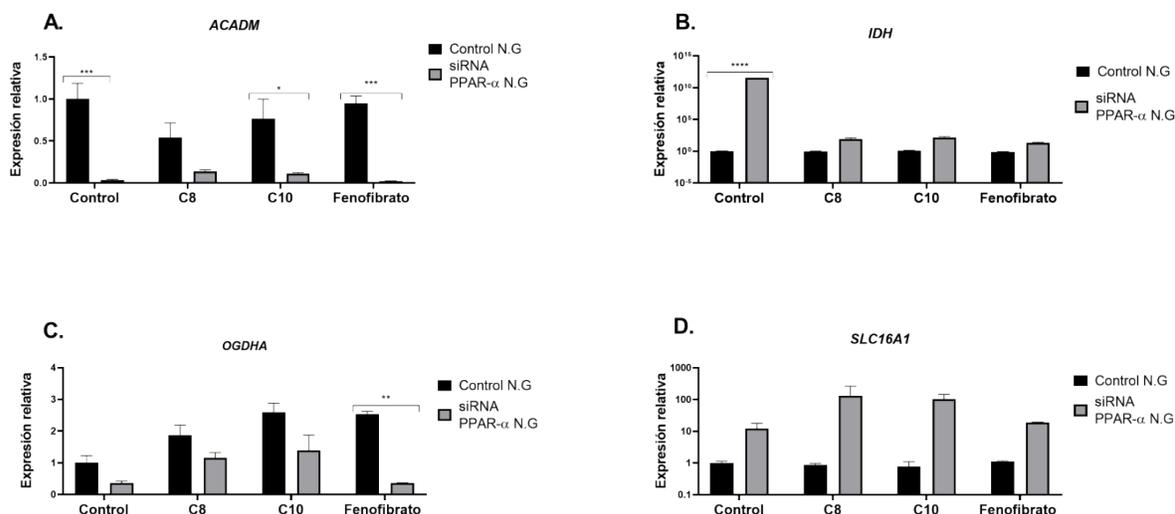


Figura 11. Expresión relativa de genes metabólicos en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR- α* en medio N.G.

La expresión de (A) *ACADM*, (B) *IDH*, (C) *OGDHA* y (D) *SLC16A1* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y fenofibrato (100nM) durante 72 horas en medio N.G y medio B.G (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre

la expresión del gen constitutivo *UBC*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0005$ (***), $p < 0,005$ (**) y $p < 0,05$ (*).

Respecto a los genes tumorales seleccionados, se encontró que la expresión de *CCND3* se vio significativamente disminuida en las células interferidas para PPAR- α en las condiciones: control ($p < 0,0001$), C8 ($p = 0,0384$) y fenofibrato ($p = 0,0124$) (figura 12A). En relación con *PTEN* únicamente los grupos control ($p = 0,0015$) y fenofibrato ($p = 0,0098$) presentaron una reducción significativa en el grupo silenciado (figura 12B). Por otro lado, *BCL-2* no ostentó alteraciones en los niveles de transcritos bajo la presencia de los tratamientos empleados y en condiciones de silenciamiento (figura 12C).

Finalmente, en la figura 13 se observa que la expresión de *PPAR- β* , evidenció un incremento significativo en presencia de C10 ($p = 0,0011$), sin embargo, no se identificaron cambios en la expresión de este gen en las demás condiciones evaluadas (figura 13).

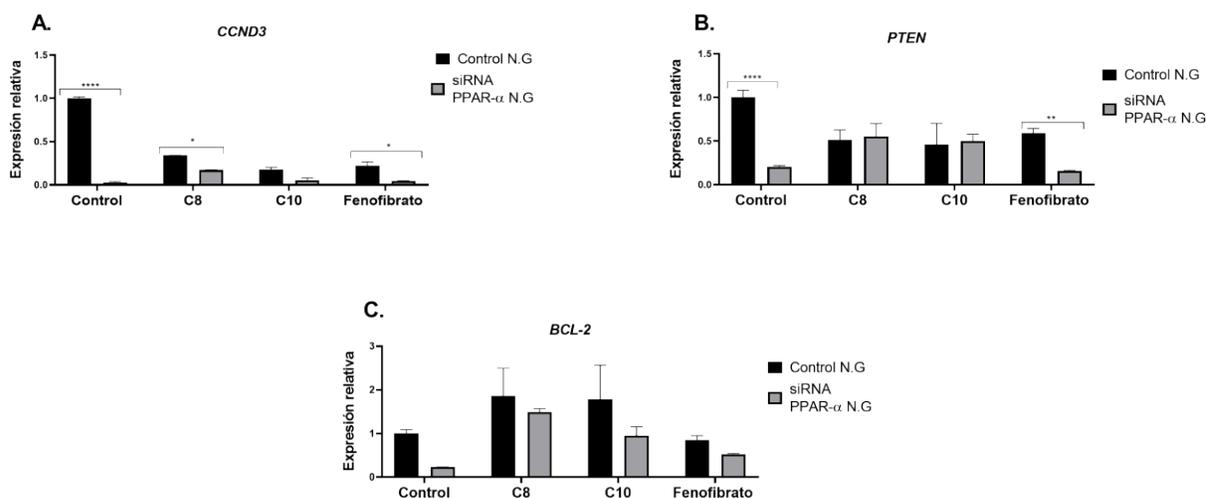


Figura 12. Expresión relativa de crecimiento tumoral en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR- α* en medio N.G. La expresión de (A) *CCND3*, (B) *PTEN* y (C) *BCL-2* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y fenofibrato (100nM) durante 72 horas sin y

con siRNA contra *PPAR-α* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *UBC*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,005$ (**) y $p < 0,05$ (*).

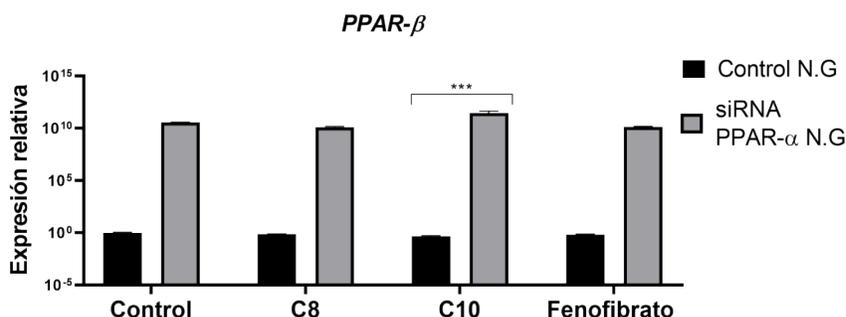


Figura 13. Expresión relativa de *PPAR-β* en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-α* en medio N.G. La expresión de *PPAR-β* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y fenofibrato (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-α* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *UBC*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0005$ (***).

2.1.3 Análisis de expresión génica en la línea celular T98G siRNA *PPAR-α* en medio B.G

Teniendo en cuenta la validación presentada en la figura 10, se realizó el cultivo de células silenciadas en medio B.G para evaluar los cambios de expresión génica bajo estas condiciones. Notablemente, el análisis de los genes metabólicos mostró una inversión en el comportamiento observado en medio N.G. El gen *ACADM* acrecentó su expresión significativamente en los grupos control ($p=0,0023$), C8 ($p=0,0026$) y C10 ($p=0,0059$) en células silenciadas para *PPAR-α* (figura 14A). Por el contrario, *IDH* solo disminuyó su expresión significativamente en el grupo control de células silenciadas ($p=0,0012$) (figura 14B). A pesar de

que *IDH* participa en la misma vía que *OGDHA*, este último presentó un aumento significativo en las células con *knockdown* para *PPAR-α* en presencia de C8 ($p=0,0191$) y fenofibrato ($p=0,0058$) (figura 14C). De manera similar, los transcritos del gen *SLC16A1* se vieron significativamente incrementados en presencia de C8 ($p=0,0128$) y fenofibrato ($p=0,0151$) en células con silenciamiento de *PPAR-α* (figura 14D).

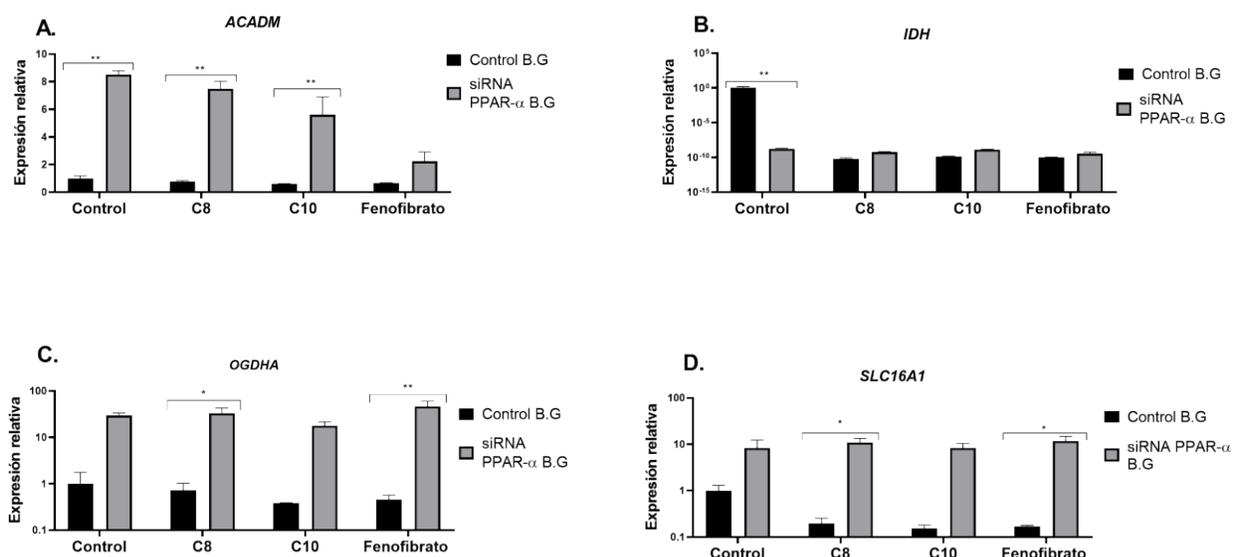


Figura 14. Expresión relativa de genes metabólicos en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-α* en medio B.G. La expresión de (A) *ACADM*, (B) *IDH*, (C) *OGDHA* y (D) *SLC16A1* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y fenofibrato (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-α* ($n=3$). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *UBC*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p<0,005$ (**) y $p<0,05$ (*).

Por su parte, dentro de los genes que participan en supervivencia celular se identificó en células silenciadas para *PPAR-α* que *CCND3* presentó un aumento significativo en su expresión en los grupos sin tratamiento ($p=0,0005$) y C8 ($p=0,0330$) en comparación con las células sin

interferencia génica (figura 15A). De manera similar, la expresión del gen *PTEN* se vio significativamente incrementada en los grupos sin tratamiento ($p < 0,0001$), C10 ($p = 0,0490$) y en presencia de fenofibrato ($p = 0,0098$) de células siRNA *PPAR-α* (figura 15B). El fenofibrato también generó un aumento significativo en la expresión de *BCL-2* en las células interferidas ($p = 0,0192$) (figura 15C). Por último, al disminuir los niveles de glucosa y silenciar la expresión de *PPAR-α*, *PPAR-β* presentó un aumento significativo en sus niveles de transcritos en comparación con las células sin interferencia génica en presencia de los ácidos grasos C8 ($p < 0,0001$) y C10 ($p = 0,0001$), y también en el grupo control ($p < 0,0001$), mientras que los agonistas no indujeron ningún cambio considerable en los niveles de expresión del receptor (figura 16).

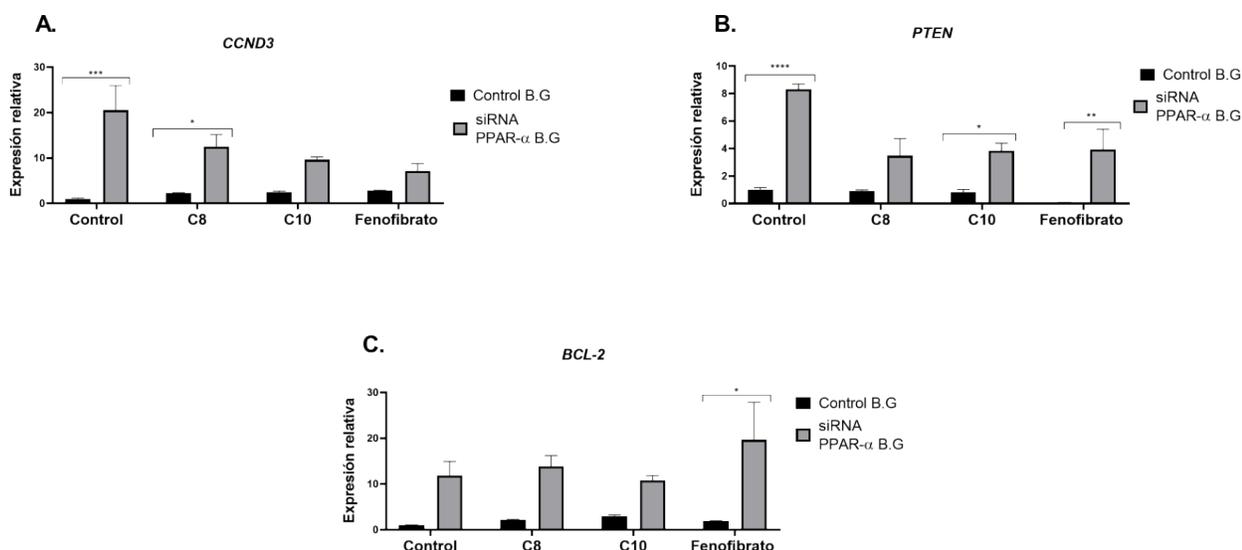


Figura 15. Expresión relativa de genes tumorales en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-α* en medio B.G. La expresión de (A) *CCND3*, (B) *PTEN* y (C) *BCL-2* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y fenofibrato (100nM) durante 72 horas sin y con

siRNA contra *PPAR-α* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *UBC*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0005$ (***), $p < 0,005$ (**), $p < 0,05$ (*).

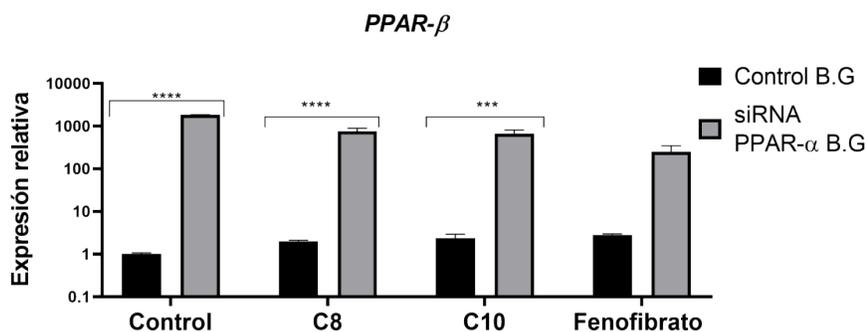


Figura 16. Expresión relativa del gen *PPAR-β* en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-α* en medio B.G. La expresión de *PPAR-β* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y fenofibrato (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-α* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *UBC*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,0005$ (***).

A partir de los resultados de expresión génica obtenidos en las células silenciadas para *PPAR-α*, se realizó una comparación adicional entre las diferentes condiciones experimentales evaluadas (C8, C10 y fenofibrato) de forma independiente para los dos medios de cultivo: N.G. y B.G.

Los niveles de expresión de todos los genes analizados en las células con *knockdown* para *PPAR-α* cultivadas en medio N.G se muestran en la figura 18. Notablemente, en las células silenciadas *ACADM* aumentó significativamente su expresión en presencia de C8 ($p=0,0006$) y C10 ($p=0,0063$), mientras que *IDH* solo incrementó sus niveles de transcritos en presencia de

C10 ($p=0,0382$) en relación con las células sin interferencia. En el caso de los genes *OGDHA* y *SLC16A1* no se detectaron cambios en sus niveles de expresión. Respecto al gen inflamatorio *IL-8* sólo se observó un aumento significativo en las células siRNA *PPAR- α* en presencia de C8 ($p<0,0001$).

En este tipo de análisis, se observó que el ácido graso C8 cumplió un papel importante en la expresión de los genes tumorales en células con *knockdown* para *PPAR- α* cultivadas en medio N.G. En esta línea celular los niveles de transcritos de *CCND3* ($p<0,0001$), *PTEN* ($p=0,0013$) y *BCL-2* ($p=0,0293$) aumentaron significativamente en presencia de C8 en comparación con las células sin silenciamiento (Figura 17), *PTEN* también mostró un aumento en la expresión en el grupo con C10 ($p=0,0056$).

Para finalizar este análisis, los AGCM utilizados mostraron cambio en la expresión de *PPAR*. El gen *PPAR- β* se vio influenciado únicamente por la presencia de C10 ($p=0,0026$), generando un aumento significativo en las células con interferencia para *PPAR- α* . Es importante resaltar que, las células silenciadas en medio B.G no presentaron cambios entre los tratamientos sobre la expresión de los genes metabólicos, inflamatorios, de crecimiento tumoral y de los receptores de *PPAR* (figura 17).

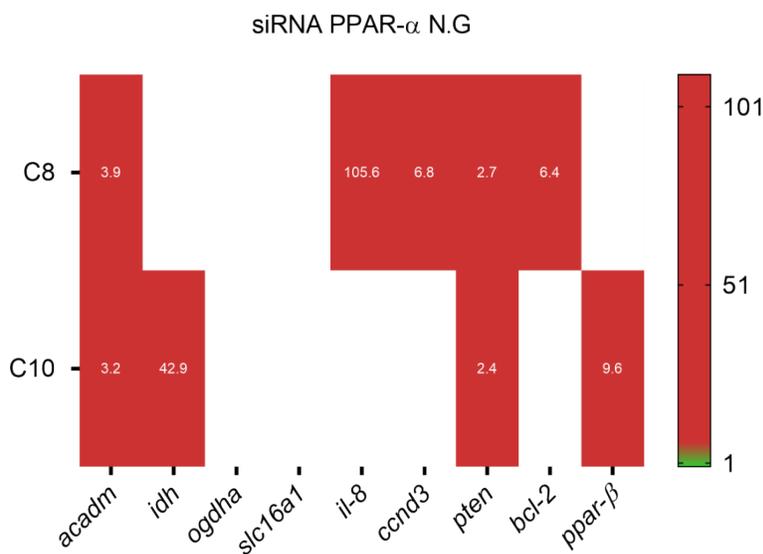


Figura 17. Diagrama de mapa de calor de los niveles de expresión génica en células T98G siRNA *PPAR- α* . La expresión génica medio de siRNA PPAR- α en medio de cultivo N.G fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas (n= 3). Las columnas y filas del mapa de calor representan los genes y grupos experimentales, respectivamente. La escala de colores indica veces de cambio en la expresión génica, verde con expresión relativa inferior a 1, y rojos superior a 1.

2.1.4 Análisis de expresión génica en células T98G siRNA *PPAR- β* en medio N.G

Al igual que con PPAR- α , en la línea celular T98G se realizó un silenciamiento para el gen *PPAR- β* mediante siRNA. La verificación del *knockdown* fue realizada empleando PCR en tiempo real, obteniendo una disminución del 68% respecto al grupo no silenciado (p=0,0015) (figura 18).

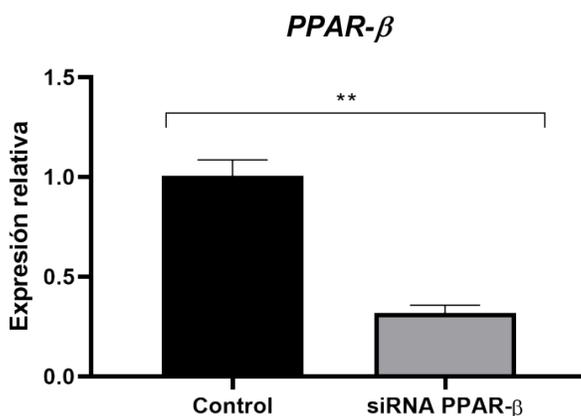


Figura 18. Expresión relativa de genes metabólicos en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-β*. La expresión de *PPAR-α fue* determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron interferidas mediante una transfección mediada por lípidos (n=3) para los posteriores tratamientos con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas. Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba t-student. $p < 0,05$ (*). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba t-student. $p < 0,005$ (**)

En la línea celular silenciada para *PPAR-β* se observaron escasos cambios relacionados con la expresión de genes involucrados con metabolismo (figura 19). Sin embargo, se evidenció que *ACADM* ($p = 0,0078$) y *OGDHA* ($p = 0,0123$) presentaron un incremento significativo en su expresión bajo el tratamiento con GW501516 en comparación con las células sin interferencia (figura 19A y 19C). Cabe resaltar que la expresión de *SLC16A1* (figura 19D) se vio influenciada positivamente solamente por el tratamiento con C10 ($p = 0,0310$), en la línea celular con *knockdown* para *PPAR-β*. Por el contrario, IDH no cambió sus niveles de expresión bajo ninguno de los tratamientos empleados (figura 19B).

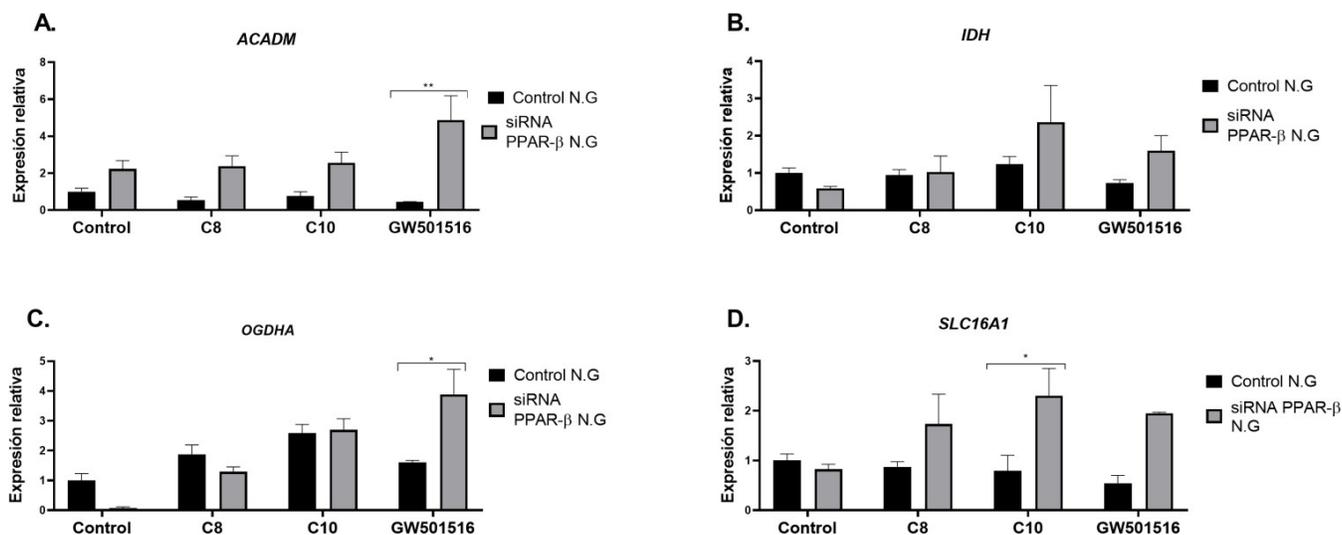


Figura 19. Expresión relativa de genes metabólicos en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-β* en medio N.G. La expresión de (A) *ACADM*, (B) *IDH*, (C) *OGDHA* y (D) *SLC16A1* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. (**), $p < 0,05$ (*).

En relación con la expresión de genes tumorales, en las células silenciadas para *PPAR-β*, se encontró que *CCND3* disminuyó significativamente sus niveles de transcritos en comparación con las células sin silenciamiento en presencia de los ácidos grasos C8 ($p=0,0009$) y C10 ($p=0,0372$), así como en el control ($p < 0,0001$) (figura 20A). Curiosamente, el agonista GW501516 ($p=0,0385$) incrementó significativamente la expresión de *PTEN* a pesar de que el receptor *PPAR-β* se encontraba silenciado en medio N.G (figura 20B). Así mismo, el gen *BCL-2* tuvo un aumento significativo en su expresión con los tratamientos C10 ($p=0,0017$) y GW501516 ($p=0,0066$) en la línea celular con *knockdown* para *PPAR-β* (figura 20C). Adicionalmente, la

expresión de *PPAR-α* (figura 21) en este caso se vio incrementada en las células silenciadas para *PPAR-β* únicamente por la presencia de C8 ($p=0,0303$).

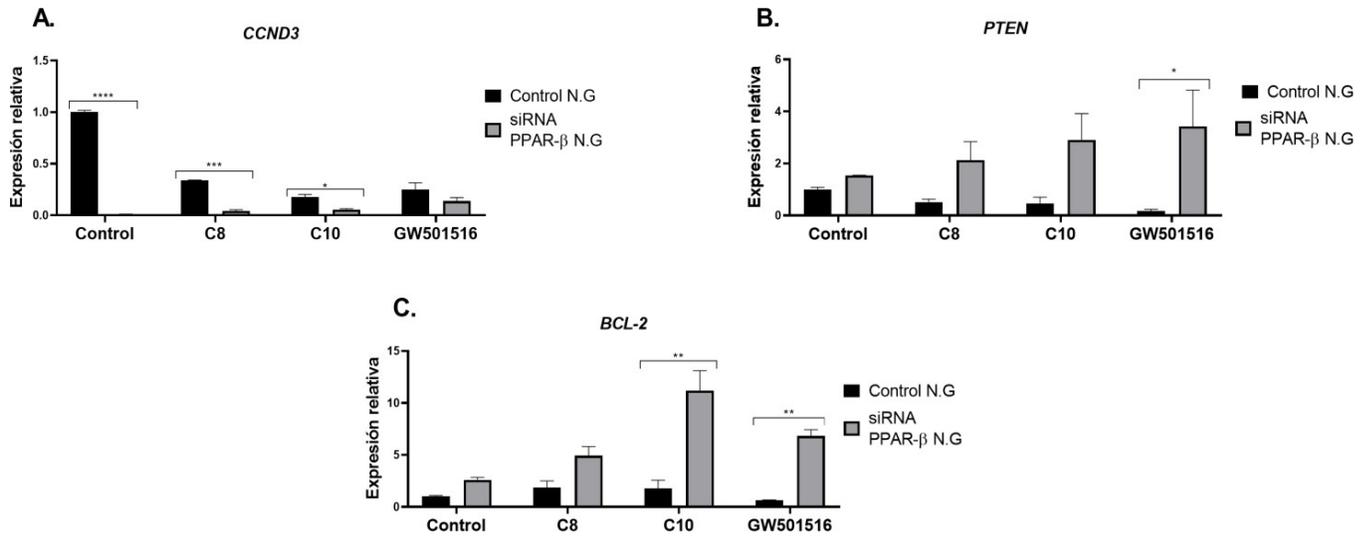


Figura 20. Expresión relativa de genes tumorales en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-β* en medio N.G. La expresión de (A) *CCND3*, (B) *PTEN* y (C) *BCL-2* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p<0,0001$ (****), $p<0,0005$ (***), $p<0,005$ (**), $p<0,05$ (*).

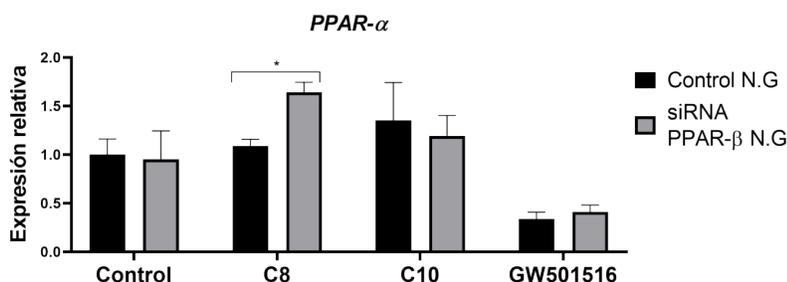


Figura 21. Expresión relativa de *PPAR-α* en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-β* en medio N.G. La expresión de *PPAR-β* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,0005$ (***) y $p < 0,05$ (*).

2.1.5 Análisis de expresión génica en células T98G siRNA *PPAR-β* en medio B.G

Los genes metabólicos evaluados en células con siRNA para *PPAR-β* y cultivadas en medio bajo en glucosa revelaron alteraciones en su comportamiento en comparación con las mismas células en medio B.G. En la línea celular interferida se encontró que el gen *ACADM* disminuyó significativamente en el grupo control ($p=0,0003$) y C10 ($p=0,0379$) (figura 22A), mientras que la expresión de *OGDHA* se vio considerablemente incrementada con los tratamientos C8 ($p < 0,0001$), C10 ($p=0,0409$) y GW501516 ($p=0,0003$) (figura 22B). No obstante, bajo estas condiciones experimentales, el gen *IDH* no se vio expresado en ningún grupo. Al igual que en *ACADM*, la expresión de *SLC16A1* se vio disminuida significativamente en el grupo control ($p < 0,0001$) de células silenciadas para *PPAR-β* cultivadas en medio B.G (figura 22C).

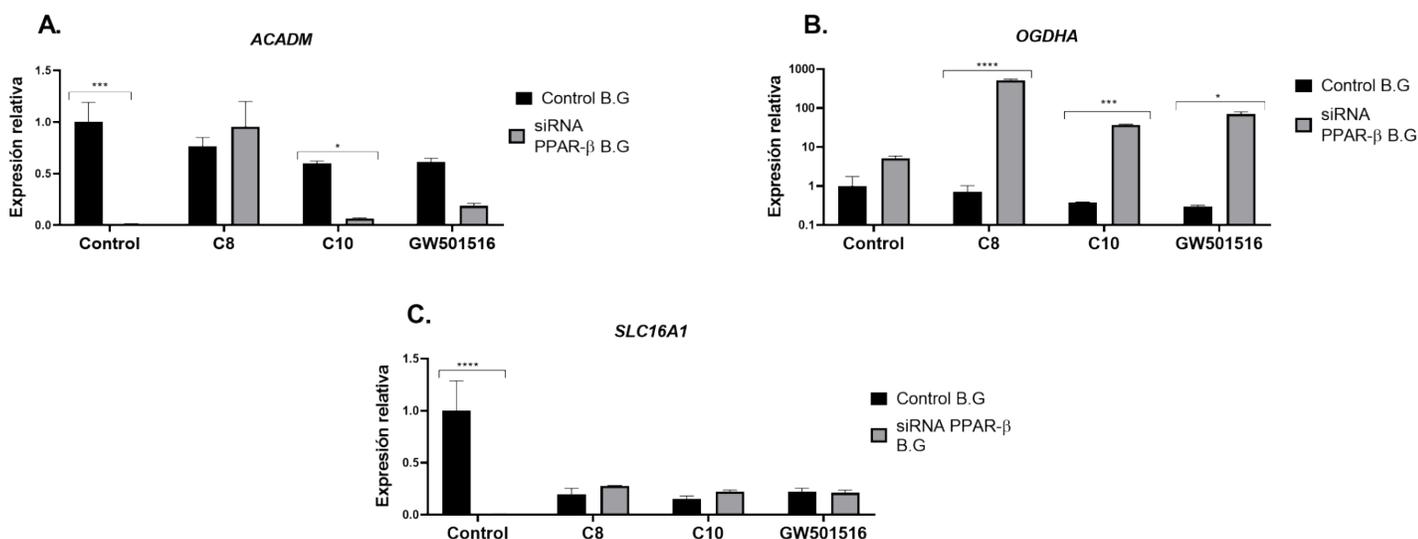


Figura 22. Expresión relativa de genes metabólicos en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-β* en medio B.G. La expresión de (A) *ACADM*, (B) *OGDHA* y (C) *SLC16A1* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,0005$ (***) y $p < 0,05$ (*).

Con respecto al proceso tumoral de estas células silenciadas, *CCND3* (figura 23A) disminuyó considerablemente su expresión bajo el efecto de todas las condiciones: control ($p=0,0049$), C8 ($p < 0,0001$), C10 ($p < 0,0001$) y GW501516 ($p=0,0003$). De manera similar, los tratamientos control ($p=0,0007$), C8 ($p=0,0036$) y C10 ($p=0,0090$) disminuyeron la expresión de *PTEN* (figura 23B) en las células interferidas para *PPAR-β*. Así mismo, *BCL-2* (figura 23C) disminuyó en los grupos control ($p=0,0080$), C8 ($p=0,0015$) y C10 ($p=0,0001$), pero no en GW501516 al silenciar *PPAR-β* y emplear medio B.G. Finalmente, el isotipo *PPAR-α* presentó un incremento significativo en sus niveles de transcritos en las células interferidas para *PPAR-β*

con todos los tratamientos evaluados: C8 ($p < 0,0001$), C10 ($p = 0,0219$) y GW501516 ($p = 0,0028$) (figura 24).

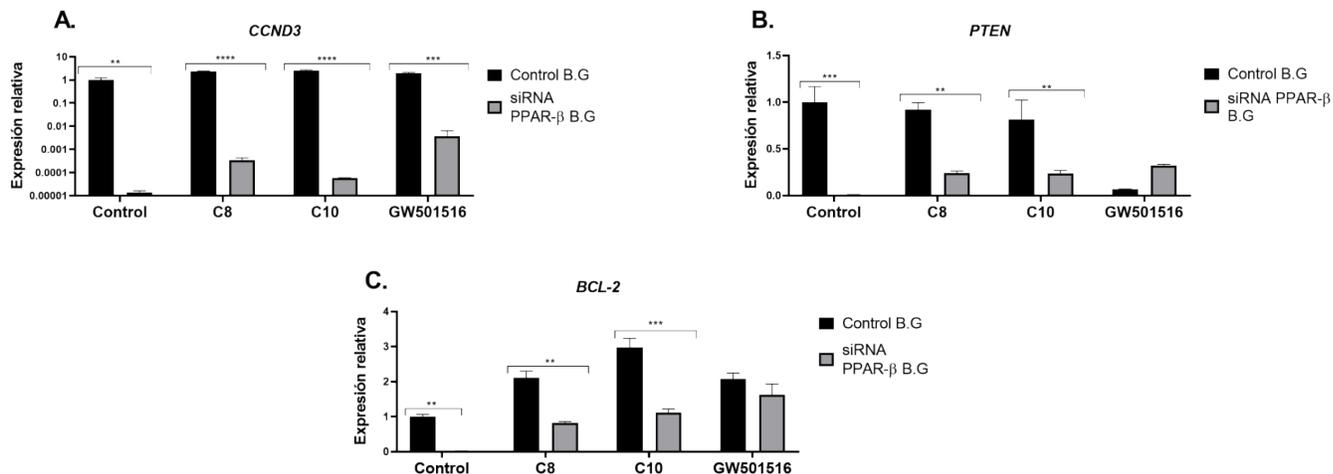


Figura 23. Expresión relativa de genes tumorales en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-β* en medio B.G. La expresión de (A) *CCND3*, (B) *PTEN* y (C) *BCL-2* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* ($n = 3$). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,0005$ (***), $p < 0,005$ (**).

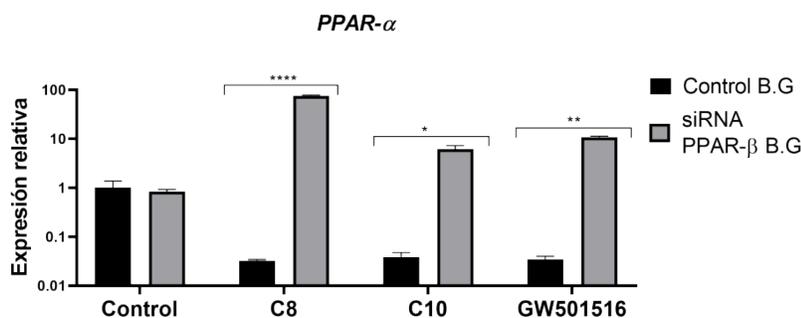


Figura 24. Expresión relativa de *PPAR-α* en la línea tumoral T98G siRNA *PPAR-β* en medio B.G. La expresión de *PPAR-α* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,005$ (**), $p < 0,05$ (*).

En el mapa de calor presentado en la figura 25 se resalta el efecto de los tratamientos empleados en la expresión de los diferentes grupos de genes bajo condiciones de siRNA bajo condiciones de siRNA *PPAR-β* en medio N.G y medio B.G. En medio N.G (figura 25A) el único gen que exhibió alteraciones en su expresión fue *OGDHA* al interferir *PPAR-β*. Este gen mostró un incremento significativo únicamente con el tratamiento realizado con C10 ($p=0,0080$), los demás genes analizados no presentaron alteraciones en las condiciones experimentales evaluadas.

En contraste, al disminuir en medio de cultivo la concentración de glucosa (B.G) en la línea celular silenciada (figura 25B), se evidencia que *ACADM* disminuyó su expresión luego del tratamiento con C8 ($p=0,0003$), por el contrario, el gen *OGDHA* aumentó la expresión en presencia de este mismo ácido graso ($p=0,0007$). Con respecto a *SLC16A1* todos los tratamientos (C8, C10, GW501516) indujeron aumento significativo en su expresión ($p < 0,0001$).

Respecto a la inflamación, el tratamiento con C8 ($p < 0,0001$) indujo un incremento en la expresión de *IL-8* en las células con *knockdown* para *PPAR-β* en medio B.G (figura 25A). Este mismo efecto fue evidenciado en la expresión de genes tumorales, donde el gen *CCND3* aumentó su expresión en presencia de GW501516 en la célula interferida. Así mismo, los niveles de transcritos de *PTEN* mostraron un incremento significativo en todos los tratamientos evaluados (C8, C10 y GW501516) ($p < 0,0001$). Así mismo, también se resalta que la expresión de *BCL-2* se vio incrementada de forma significativa con C8 ($p = 0,0055$), C10 ($p = 0,0004$) y GW501516 ($p < 0,0001$) (figura 25B). Finalmente, al inducir silenciamiento génico de *PPAR-β* en medio B.G se observó que la expresión *PPAR-α* su expresión se vio fuertemente incrementada en presencia de C8 ($p < 0,0001$), C10 ($p = 0,0043$) y GW501516 ($p < 0,0001$).

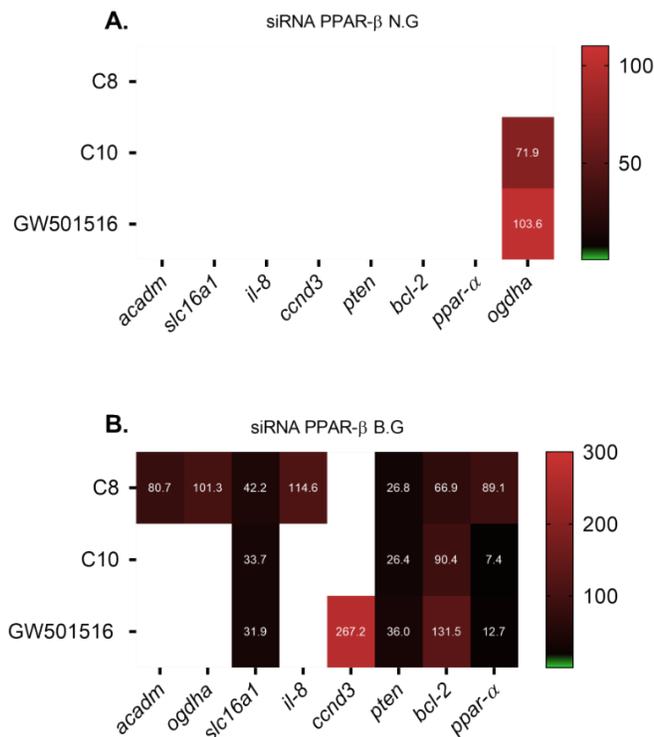


Figura 25. Diagrama de mapa de calor de los niveles de expresión génica en células T98G siRNA *PPAR-β*. La expresión génica medio de siRNA *PPAR-α* en (A) en medio de cultivo N.G y (B) Medio de cultivo B.G fue

determinada por PCR en tiempo real empleando el método $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas (n= 3). Las columnas y filas del mapa de calor representan los genes y grupos experimentales, respectivamente. La escala de colores indica veces de cambio en la expresión génica, verde con expresión relativa menor a 1, y rojo superior a 5.

Como ya se sabe, la línea celular T98G es de tipo tumoral, por lo que fue importante analizar el proceso inflamatorio. Al igual que en los peces, en las células se observó que al reducir los niveles de glucosa, se empieza a desencadenar un posible proceso inflamatorio al evidenciar un aumento en la expresión de la citocina *IL-8*. En la figura 26A se evidencia un aumento significativo en la expresión de este gen en los grupos control (p= 0,0053), C8 (p= 0,0005), C10 (p< 0,0001), fenofibrato (p= 0,0028) y GW501516 (p= 0,0051) en medio B.G comparado con el medio N.G.

Continuando con el análisis de expresión para el proceso inflamatorio, bajo el efecto de los silenciamientos de *PPAR- α* se observó que en medio N.G solo el tratamiento C8 (p<0,0001) aumentó significativamente su expresión (figura 26B). De manera similar, al disminuir la glucosa en esta condición se observó el incremento significativo de *IL-8* (figura 26C) con los tratamientos control (p=0,0018), C8 (p=0,0041), C10 (p=0,0156) y fenofibrato (p=0,0062).

Al inducir silenciamiento del receptor *PPAR- β* en medio N.G, no se evidenció cambio en la expresión de *IL-8* (figura 26D). Sin embargo, al disminuir los niveles de glucosa (B.G) el tratamiento con C8 (p<0,0001) aumentó significativamente la expresión del gen inflamatorio *IL-8* (figura 26E). Estos resultados fueron comprobados mediante la cuantificación de *IL-8* y otras moléculas relevantes para el proceso inflamatorio (figura 27-29).

En estos resultados también se resalta el incremento de expresión de *IL-8* al inducir siRNA *PPAR-β* cuando en medio B.G, evidenciando valores superiores cercanos a 100000 unidades (figura E).

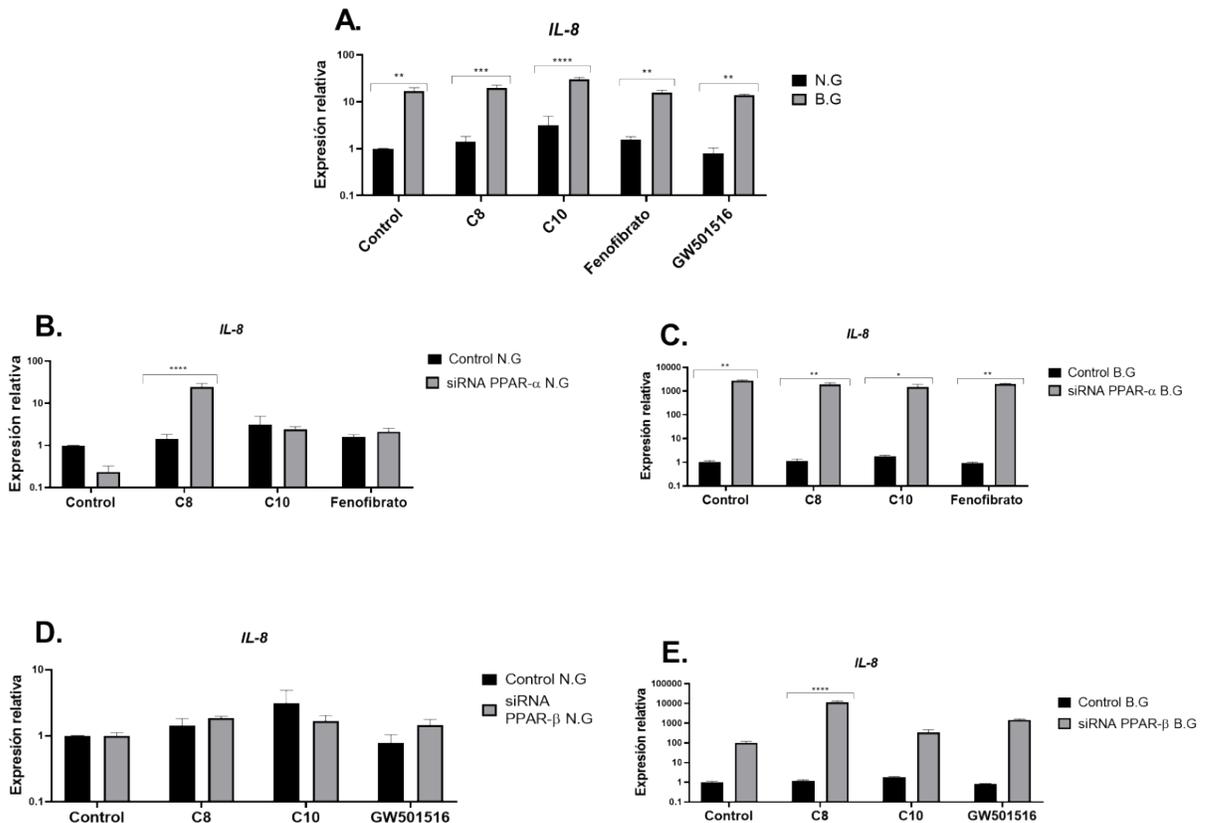


Figura 26. Expresión relativa de *IL-8* en la línea tumoral T98G. La expresión de *IL-8* con (A) sin silenciamiento, (B) siRNA *PPAR-α* en medio N.G, (C) siRNA *PPAR-α* en medio B.G, (D) siRNA *PPAR-β* N.G y (E) siRNA *PPAR-β* B.G fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA (n= 3). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0001$ (****), $p < 0,005$ (**), $p < 0,05$ (*).

2.2 Análisis de proteínas inflamatorias

Considerando la relevancia de la inflamación en el desarrollo tumoral, se realizó la cuantificación de proteínas secretadas involucradas con procesos inflamatorios en las células T98G bajo las diferentes condiciones experimentales. Las células cultivadas en medio B.G mostraron un drástico incremento en los niveles de IL-1 β en los grupos C8 ($p < 0,0001$) y C10 ($p = 0,0170$) (figura 27C). En contraste, la concentración de IL-6 se vio disminuida en las células con medio B.G en los grupos tratados con C8 ($p < 0,0001$), C10 ($p = 0,0006$), fenofibrato ($p = 0,0074$) y GW501516 ($p = 0,0016$), adicionalmente, fue la citocina con mayor producción en células con medio N.G (figura 27A). Así mismo, la secreción de IL-8 fue reducida significativamente en los tratamientos con fenofibrato ($p = 0,0146$) y GW501516 ($p < 0,0001$) (figura 27B). Respecto a IFN- γ tuvo una mayor producción en el grupo control ($p = 0,0014$) (figura 27D). Finalmente, TNF- α no mostró cambio bajo ningún tratamiento planteado (figura 27E).

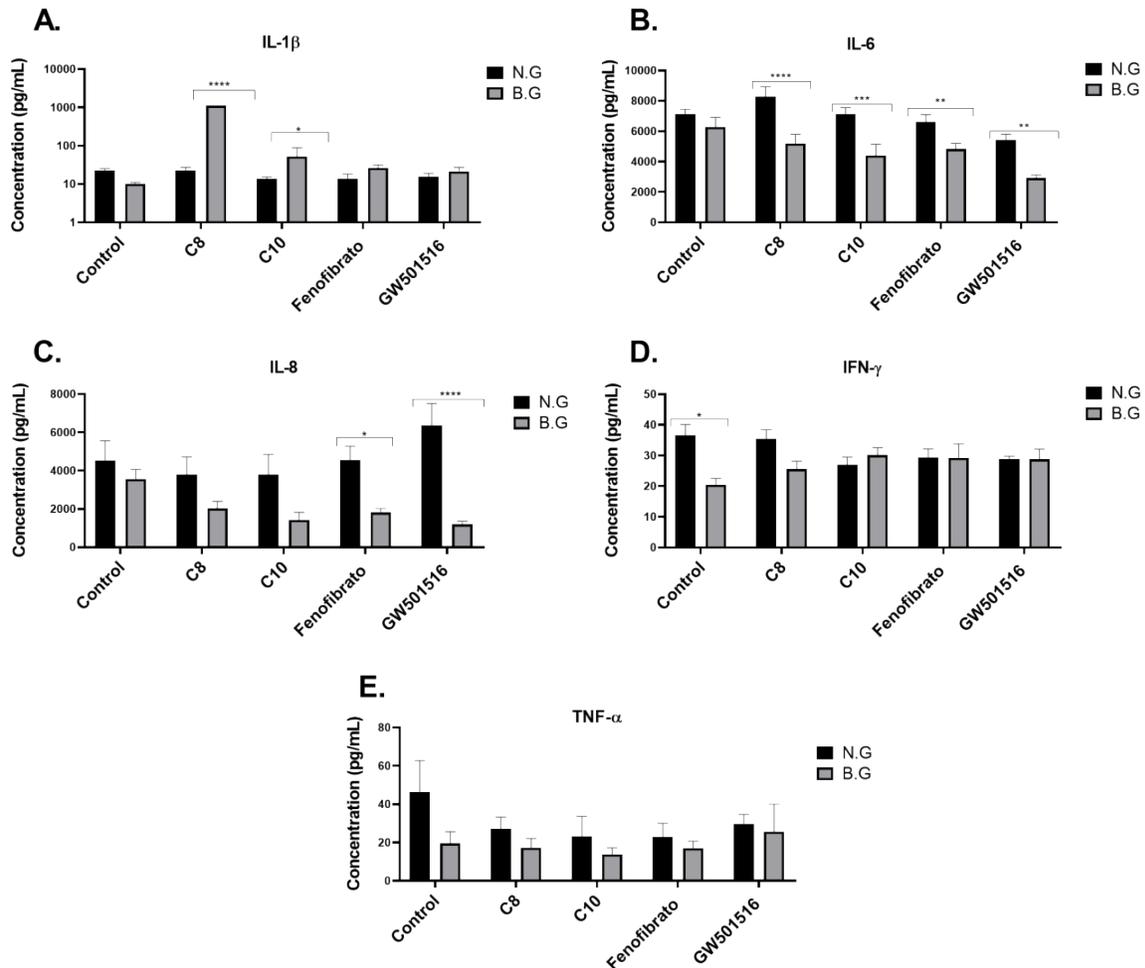


Figura 27. Concentración de proteínas secretadas por células T98G. La concentración de (A) IL-1 β , (B) IL-6 (C) IL-8, (D) TNF- α , (E) IFN- γ fue determinada por citometría de flujo mediante un ensayo multiplex Legendplex. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y B.G (n=3). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. p<0,0001 (****) y p<0,05 (*).

Para evaluar el efecto del *knockdown* de *PPAR- β* sobre el perfil inflamatorio de la línea celular T98G, inicialmente se realizó la comparación de producción de citocinas y proteínas entre el grupo no silenciado (control N.G) y el grupo silenciado (siRNA *PPAR- β* N.G) de las células

cultivadas en medio N.G. Notablemente, se observó un cambio en el comportamiento de los analitos previamente observado en las células sin silenciar. IL-6 presentó un aumento en sus niveles en las células silenciadas en los grupos control ($p=0,0004$), C8 ($p=0,0005$), C10 ($p=0,0052$) y GW501516 ($p=0,0074$) (figura 28B). Así mismo, la concentración de IL-8 en los sobrenadantes de las células interferidas para *PPAR- β* también aumentó en todas las condiciones utilizadas ($p<0,0001$) excepto para el agonista GW501516 (figura 28C). Por el contrario, los niveles de IL-1 β se vieron influenciados únicamente por el silenciamiento, siendo considerable el aumento observado en el grupo control ($p=0.0198$) (figura 28A). Adicionalmente, IFN- γ (figura 28D) mostró un incremento significativo con todos los tratamientos empleados en las células *knockdown* para *PPAR- β* ($p<0,0001$). Finalmente, TNF- α al igual que en el grupo sin silenciamiento, no presentó cambio bajo ninguna condición empleada (figura 28E). En particular, en las células silenciadas para *PPAR- β* se identificó un aumento en la concentración de MMP9, siendo significativamente mayor sus niveles en el grupo tratado con C10 en comparación con las células sin silenciamiento y el mismo tratamiento ($p=0,0054$) (figura 28F).

Adicionalmente se cuantificaron los niveles de proteínas inflamatorias en las células cultivadas en medio bajo en glucosa en los diferentes grupos experimentales, comparando el grupo no silenciado (control B.G) vs la condición silenciada (siRNA *PPAR- β* B.G). En el caso de IL-1 β de células con *knockdown* para *PPAR- β* , solamente el tratamiento con C8 ($p<0,0001$) generó disminución en su producción (figura 29A). En contraste, la concentración de IL-6 (figura 29B) se vio incrementada en todos los grupos evaluados de esa misma línea celular: control ($p=0,0025$), C8 ($p=0,0048$) y GW501516 ($p<0,0001$). Similarmente, IL-8 (figura 29C) presentó un aumento significativo en su concentración en las células silenciadas para *PPAR- β* en los tratamientos C8 ($p<0,0001$), C10 ($p<0,0001$) y GW501516 ($p=0,0043$) (figura 29E). Por su parte,

la producción de IFN- γ se vio influenciada por el silenciamiento planteado en el grupo control ($p < 0.0001$), donde aumentó significativamente (figura 29D). TNF- α no presentó cambio bajo los tratamientos propuestos en el presente proyecto (figura 29E) y MMP9 no presentó concentraciones significativas en el grupo control B.G, por lo que esta proteína fue la única secretada únicamente en el grupo silenciado para PPAR- β .

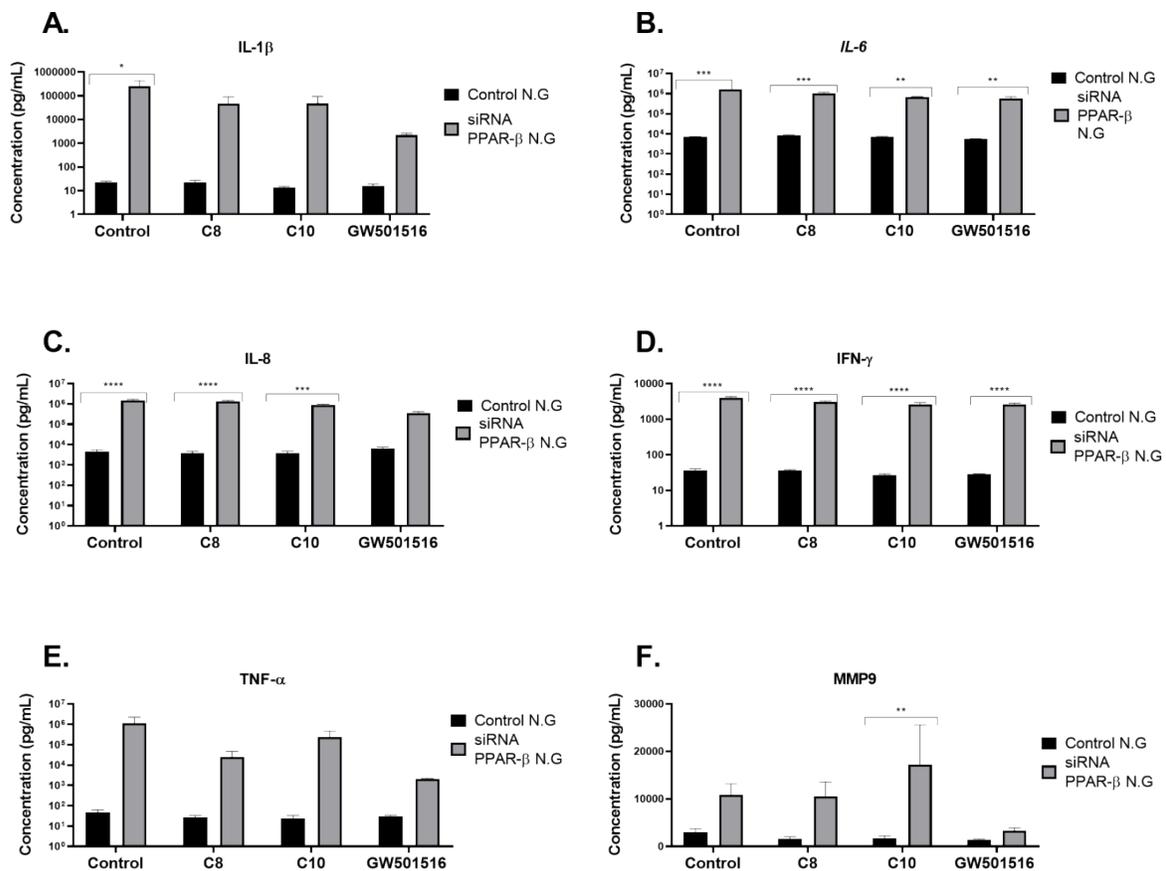


Figura 28. Concentración de proteínas inflamatorias en células T98G silenciados para PPAR- β en medio N.G.

La concentración de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-8, (D) IFN- γ , (E) TNF- α y (F) MMP9 fue determinada por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516

(100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* (n=3). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni.

p<0,0001 (****), p<0,0005 (***), p<0,005 (**), p<0,05 (*).

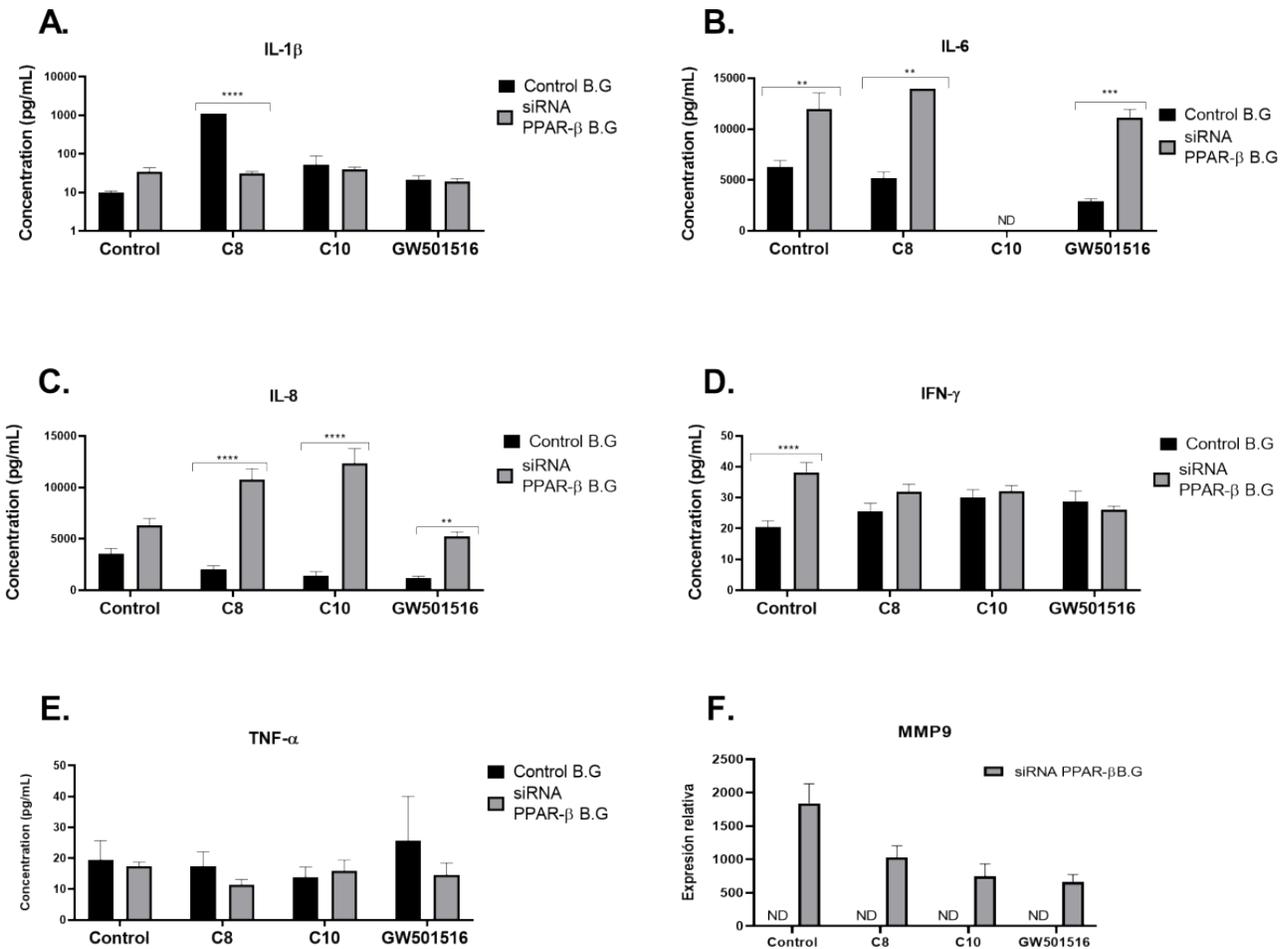


Figura 29. Concentración de citocinas en células T98G silenciados para *PPAR-β* en medio B.G. La concentración de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-8, (D) IFN- γ , (E) TNF- α y (F) MMP9 fue determinada por citometría de flujo. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M) y GW501516 (100nM) durante 72 horas sin y con siRNA contra *PPAR-β* (n=3). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. p<0,0001 (****), p<0,0005 (***), p<0,005 (**).

3. Determinar los efectos en la modulación de la expresión génica en un modelo celular de glioblastoma humano en co-cultivo con un modelo celular de microglía, frente al tratamiento con ácido octanoico y decanoico.

La microglía cumple un papel importante en la regulación de la homeóstasis en el SNC [89]. Considerando esto, es importante resaltar que la microglía cumpliría un papel importante en el microambiente inflamatorio de tumores de glioblastoma. Para evaluar la función de la microglía frente a células de glioblastoma, se realizó un co-cultivo en condiciones inflamatorias, estimulando previamente la microglía con LPS (1µg/mL) durante 24 horas y se evaluó su impacto en expresión génica. Sin embargo, al momento de medir proteínas inflamatorias, se encontró que el tratamiento inflamatorio no fue exitoso. Motivo por el cual, se vio la necesidad de inducir inflamación directamente en la línea T98G.

El ambiente inflamatorio fue inducido mediante el uso de IL-1β (20 ng/mL) durante 2 horas. Luego de este proceso se realizó el análisis de expresión para los genes metabólicos (*ACADM* y *OGDHA*, de inflamación (*IL-8*), crecimiento tumoral (*CCND3*, *PTEN* y *BCL-2*) y PPAR (*PPAR-α* y *PPAR-β*). En este caso se realizó la comparación entre los tratamientos de astrocitos inflamados en medio N.G versus tratamientos de astrocitos inflamados en medio B.G.

La expresión de los genes *ACADM* (figura 30A) y *OGDHA* (figura 30B) se vio influenciada negativamente solamente por la presencia del fenofibrato (p=0,0017 y p=0,0003, respectivamente). Por su parte, la expresión basal de IL-8 en medio N.G fue considerablemente alta en comparación con los demás genes analizados (figura 31). Este resultado es acorde con la inducción óptima del proceso inflamatorio en la línea celular. Notablemente, IL-8 ostentó una disminución significativa en su expresión bajo el efecto del tratamiento con C8 (p=0,0397), C10 (p=0,0016) y fenofibrato (p=0,0199) en medio B.G. Por tanto, es posible que al reducir los

niveles de glucosa en presencia de estos tratamientos se pueda regular el estado inflamatorio en glioblastoma.

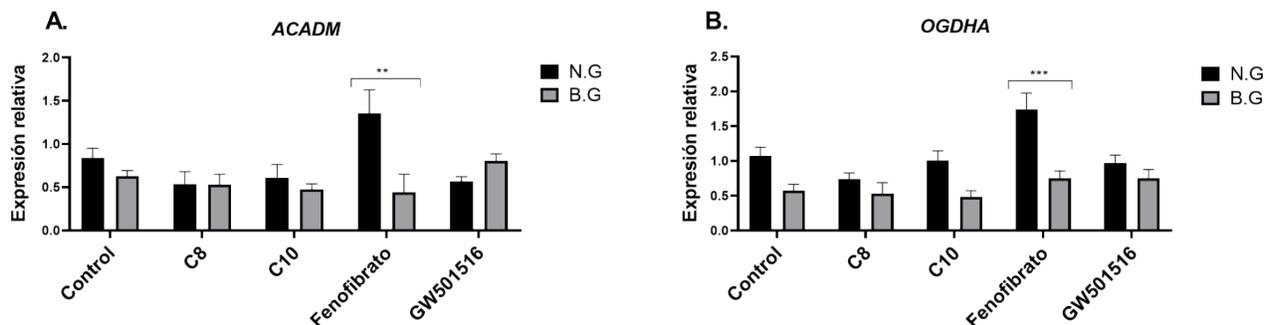


Figura 30. Expresión relativa de genes metabólicos en la línea celular T98G en estado inflamatorio sin silenciamiento La expresión de (A) *ACADM* y (B) *OGDHA* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron previamente tratadas con IL-1 β (1 μ g/mL) durante 2 horas y posteriormente incubadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y B.G (n=3). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,0005$ (***) y $p < 0,005$ (**).

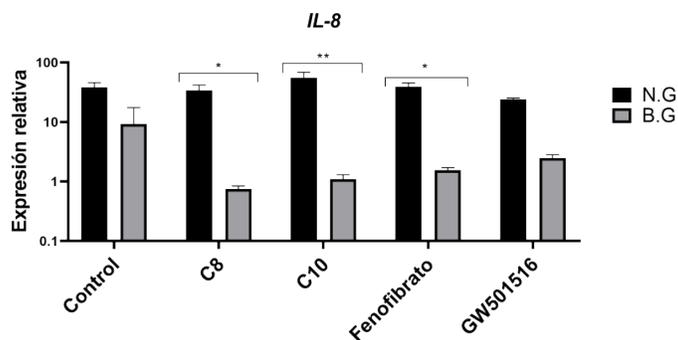


Figura 31. Expresión relativa de *IL-8* en la línea celular T98G en estado inflamatorio sin silenciamiento. La expresión de *IL-8* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron previamente tratadas con IL-1 β (1 μ g/mL) durante 2 horas y posteriormente incubadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y B.G (n=3). Las diferencias

estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación

Bonferroni. $p < 0,005$ (**) y $p < 0,05$ (*).

Adicionalmente, la expresión de los genes tumorales *CCND3* (figura 32A) y *BCL-2* (figura 32C) no se vio afectada por las diferentes condiciones experimentales. Mientras que los niveles de transcritos de *PTEN* se incrementaron significativamente en presencia de fenofibrato ($p=0,0089$), pero no con los demás tratamientos en medio B.G (figura 32B). En el caso de los isotipos de PPAR, la expresión de *PPAR- α* (figura 33A) se vio disminuida bajo el tratamiento con fenofibrato ($p=0,0053$), aunque *PPAR- β* no presentó alteraciones en sus niveles de transcritos en ninguna condición analizada (figura 33B).

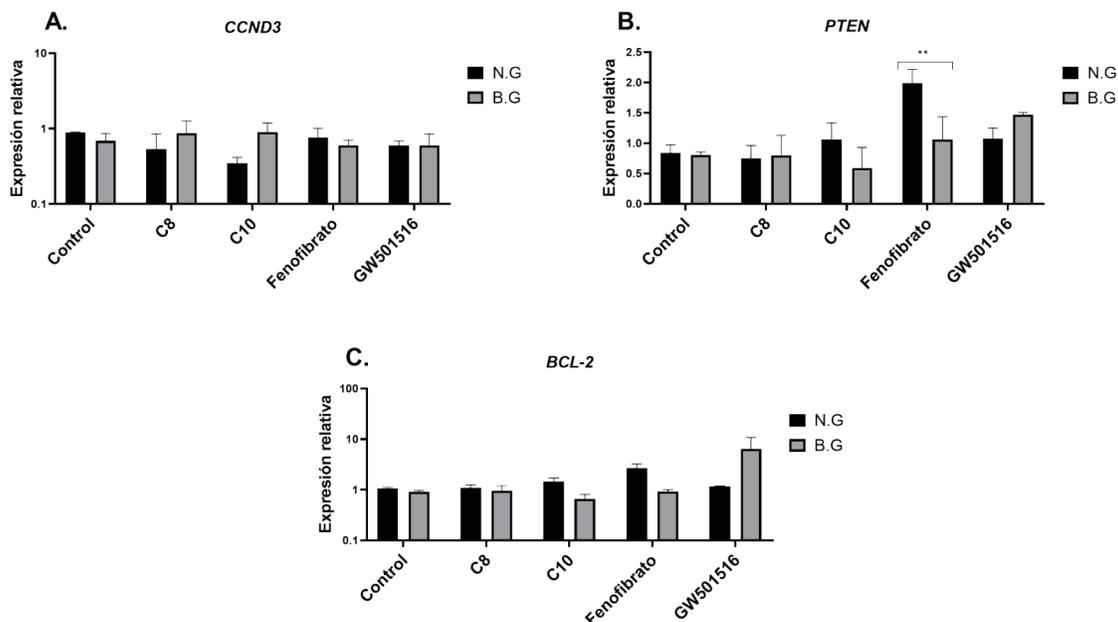


Figura 32. Expresión relativa de genes tumorales en la línea celular T98G con inflamación sin silenciamiento.

La expresión de (A) *CCND3*, (B) *PTEN* y (C) *BCL-2* fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron previamente tratadas con $IL-1\beta$ (1 $\mu g/mL$) durante 2 horas y posteriormente incubadas

con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y B.G (n=3). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,005$ (**).

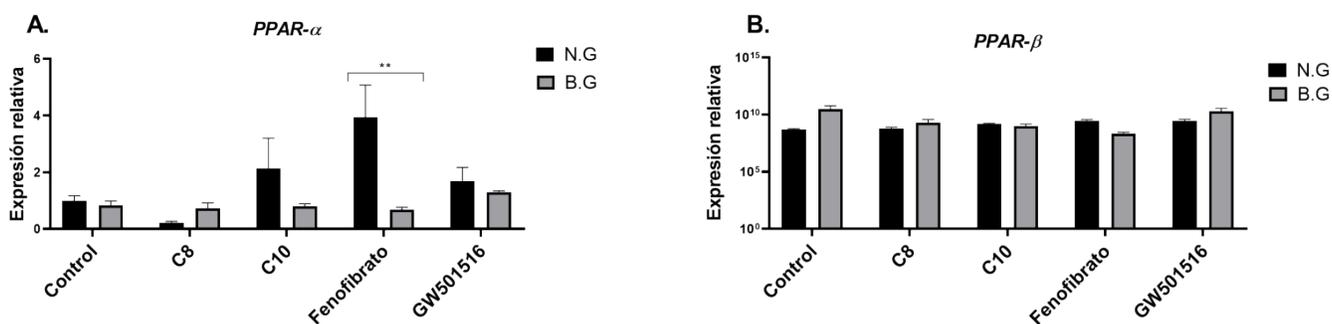


Figura 33. Expresión relativa de PPAR en la línea celular T98G con inflamación sin silenciamiento. La expresión de (A) PPAR- α y (B) PPAR- β fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta$ CT. Las células fueron previamente tratadas con IL-1 β (1 μ g/mL) durante 2 horas y posteriormente incubadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y B.G (n=3). Las diferencias estadísticas fueron analizadas por la prueba de ANOVA de doble vía y la prueba de múltiple comparación Bonferroni. $p < 0,005$ (**)

Por último, en la sección de resultados se presenta el mapa de calor donde se comparó el efecto de los tratamientos en condiciones inflamatorias en medio N.G y en medio B.G de forma independiente. En la figura 34 se destaca que en medio N.G sólo se genera un aumento significativo en la expresión génica con el tratamiento de fenofibrato para los genes *PTEN* ($p=0,0004$), *BCL-2* ($p=0,0013$) y *PPAR- α* ($p=0,0007$) con respecto a su control (figura 34A).

En la figura 34B se evidencia que al disminuir los niveles de glucosa se incrementan los niveles de expresión relativa de *IL-8* ($p=0,0074$), *BCL-2* ($p=0,0112$) y *PPAR- β* ($p=0,0044$) en

presencia de GW501516. Estos resultados señalan un papel importante de la activación de PPAR-
b en situaciones inflamatorias.

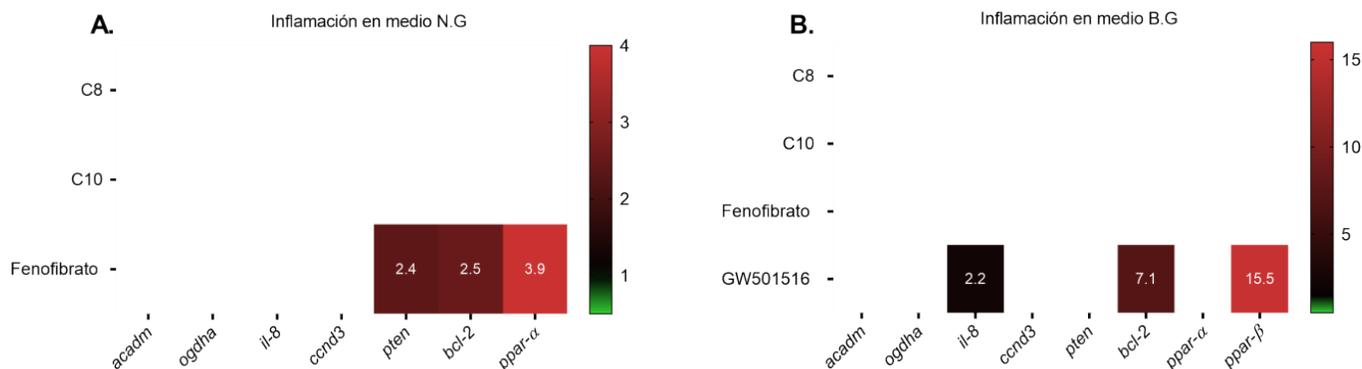


Figura 34. Diagrama de mapa de calor sobre la expresión de genes metabólicos, inflamatorios, de crecimiento tumoral y PPAR en condiciones inflamatorias sin silenciamiento. La expresión en condiciones (A) N.G y (B) B.G

fue determinada por PCR en tiempo real empleando el método del $\Delta\Delta CT$. Las células fueron tratadas con C8 (250 μ M), C10 (250 μ M), fenofibrato (100nM) y GW501516 (100nM) durante 72 horas en medio N.G y medio B.G (n= 3). Los valores son expresados como relaciones normalizadas entre la expresión del gen constitutivo *PGK*. Las columnas y filas del mapa de calor representan los genes y grupos experimentales, respectivamente. La escala de colores indica veces de cambio en la expresión génica verde con expresión relativa menor a 1, y rojo superior a 1.

Discusión

La KD se ha propuesto como una terapia complementaria para el tratamiento del GBM. Esta podría tener un efecto limitante en el crecimiento tumoral al proteger las células sanas del daño causado por radioterapia o quimioterapia y acelerando la toxicidad hacia las células cancerosas, debido a gracias a la disminución de glucosa [90]. Teniendo en cuenta que las células tumorales funcionan bajo lo que se conoce como efecto Warburg, la alteración metabólica de

estas células generan un aumento en el consumo de glucosa con mayor producción de lactato, incluso en presencia de oxígeno [91].

Los efectos de la KD pueden ser mediados por cambios en diferentes vías metabólicas, incluyendo el ciclo de Krebs y la β -oxidación [92, 93]. La β -oxidación es la vía más importante en la catálisis de los ácidos grasos [94] y durante esta dieta, el Acetil-CoA que se produce a partir de β -oxidación se convierte en la molécula precursora de la cetogénesis [95]. Teniendo en cuenta esto, los cambios en la actividad enzimática asociada a metabolismo lipídico que van desde el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia la membrana mitocondrial hasta β -oxidación puede tener efectos en el tratamiento antitumoral con la KD [95]. En consecuencia, en el modelo animal se seleccionaron tres genes importantes que expresan proteínas asociadas a este proceso: *cpt-1*, *cpt-2*, y *acadm*.

El cerebro es el órgano que más requiere energía para cumplir sus funciones. Este tiene como principal combustible energético a la glucosa. Sin embargo, en la KD los niveles de glucosa disminuyen considerablemente y al presentarse una mayor concentración de ácidos grasos de cadena media, la β -oxidación se convierte en la vía metabólica por excelencia para obtención de energía el cerebro [96]. En el presente trabajo se identificó un aumento significativo en la expresión del gen *cpt-2* en peces alimentados con KD, sugiriendo una actividad metabólica positiva, al producir energía eficientemente a partir de esta dieta en pez cebra.

En línea con este hallazgo, en el cerebro de los peces con KD también se detectó un incremento en la expresión de *acadm*. Estudios ha encontrado que una disminución en la actividad de ACADM puede desencadenar una acumulación de lípidos que están destinados a la producción de energía, lo que causaría un daño mitocondrial [97]. De manera que la actividad de esta enzima es esencial para la β -oxidación y regular los niveles de ácidos grasos presentes en la

dieta. Por tanto, la alta expresión de *acadm* y *cpt-2* obtenida en el cerebro de peces con KD sugiere que la dieta podría tener un papel neuroprotector frente a un efecto lipotóxico.

Como se ha mencionado antes, la KD resulta en la limitación de la glucólisis al aumentar la oxidación de ácidos grasos [98], causando cetosis e induciendo anaplerosis, así como restauración de neurotransmisores y la función de canales iónicos [98]. Nuestros resultados muestran el incremento en la expresión de genes como *ogdha* e *idh2* en el cerebro de peces con KD, indicando que el producto de la β -oxidación (Acetil-CoA) podría estar ingresando a ciclo de Krebs. En adición, estudios han reportado que una actividad disminuida de la enzima OGDHA está relacionada con la disfunción mitocondrial presente en los procesos neurodegenerativos [21]. Además, se ha reportado que los productos de la actividad catalítica de IDH, el α -cetoglutarato y NADPH, son importantes en procesos de regulación celular, incluida la defensa frente a estrés oxidativo, síntesis de ácidos grasos y biosíntesis de colesterol [99]. Por lo tanto, el incremento en la expresión de *ogdha* e *idh* también podría señalar un efecto neuroprotector de la KD en el cerebro [100].

En el presente trabajo, se utilizó una KD que dentro de sus componentes no sólo contenía AGCM sino también colesterol. Estructuralmente, esta molécula es indispensable para las membranas celulares, modulando la fluidez, permeabilidad y función celular [101]. El cerebro es considerado el órgano más rico en colesterol, conteniendo aproximadamente el 20% del colesterol total, encontrándose en las vainas de mielina y membranas de astrocitos y neuronas [102, 103]. Sin embargo, el exceso de este componente también puede traer consecuencias negativas, como la hipercolesterolemia o aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas [101, 102], por lo que es importante metabolizarlo. Esta actividad es cumplida por la enzima ABCA-1, para la cual se ha reportado que sus alteraciones en el SNC se relacionan con déficits

estructurales y funcionales de las neuronas [83]. La disminución de ABCA-1 puede llevar a la acumulación de lípidos en astrocitos y microglía [55][104]. Teniendo en cuenta lo anterior, desde los resultados obtenidos en el presente estudio, el incremento en la expresión de *abca-1*, como consecuencia de la KD, estaría manifestando una apropiada regulación del colesterol en presencia de una dieta alta en grasas.

También se ha demostrado que el GBM necesita colesterol como molécula estructural para sobrevivir, por lo que es importante la actividad de ABCA-1 que regula los niveles de colesterol disponibles para el tumor [105]. Así mismo, se ha reportado que las células del glioma son capaces de aumentar la síntesis de colesterol, por lo que la elevada expresión de *abca-1* podría relacionarse con el adecuado control del colesterol en el cerebro [103].

Adicional a la influencia de la KD en metabolismo, esta dieta ha demostrado tener un efecto positivo en procesos neuroinflamatorios [106], por lo que fue relevante también valorar factores asociados con inflamación. Desde los últimos tiempos, se le ha otorgado un papel antiinflamatorio a la KD reduciendo la capacidad proliferativa del tumor [107]. Por otro lado, también puede influir la disminución de carbohidratos generada por KD, donde se ha encontrado que esta condición puede aumentar la expresión de *PPAR-γ* y disminuir la expresión de genes proinflamatorios como *il-6* y *tnf-α*, en tejido adiposo de ratón [107-109]. En contraposición con estos antecedentes, en este trabajo encontramos un aumento en la expresión de moléculas proinflamatorias como *ifn-γ*, *il-8* y *mmp-9* en el tejido cerebral del grupo KD. No obstante, es importante considerar la particularidad de cada tejido, además de factores asociados con el modelo experimental como el tiempo de exposición a la dieta, el cual puede afectar de manera diferencial la respuesta cerebral del pez cebra. En el cerebro, el perfil de cuerpos cetónicos que puede utilizar está limitado por la formulación y dosis de la KD [110]. Esto se ha demostrado

experimentalmente al reportar que los niveles plasmáticos de β -hidroxibutirato y acetoacetato se alcanzan luego de 15 minutos tras la inyección DL- β -hidroxibutirato en pacientes sanos [110]. No obstante, no existen estudios disponibles en el modelo de pez cebra donde se evidencien los cambios cinéticos del perfil inflamatorio relacionados con el tiempo de administración a la KD.

Otro aspecto que se evaluó en el cerebro de los peces con KD fue la expresión de los isotipos de PPAR, dado que existen múltiples estudios que los relacionan con la modulación de la respuesta a los ácidos grasos [111, 112] Teniendo en cuenta esto, nuestros resultados reportan una incrementada expresión del receptor *PPAR- γ* . Similar a este hallazgo, un reciente informe indica que el tratamiento con KD en ratones aumenta la expresión de *PPAR- γ* cerebral [113]. El incremento en la expresión de este isotipo puede estar asociado a su papel como promotor de los procesos de cetogénesis y cetólisis [110]. Por el contrario, el isotipo *PPAR- β* presentó una disminución significativa en su expresión en el grupo de peces alimentado con la KD, este resultado es positivo, ya que se ha encontrado que este isotipo del receptor se encuentra asociado con la angiogénesis y supervivencia tumoral [114].

Aunque no exploramos el papel de la KD en el crecimiento tumoral, es importante resaltar que la sobreexpresión de *PPAR- γ* causada por la dieta podría tener un impacto en el tratamiento del glioblastoma. Estudios han evidenciado que la activación de *PPAR- γ* causada por la KD genera un efecto supresor de la neuroinflamación en el hipocampo de ratones con convulsiones [110]. Además, se ha reportado que el agonista de *PPAR- γ* pioglitazona y la sobreexpresión del receptor reducen la viabilidad de células de gliomas humanos *in vitro* [115]. De forma complementaria, se ha encontrado que el agonista de *PPAR- β* GW501516 es capaz de aumentar la expresión del factor

de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células tumorales de colón [116, 117]. También se ha encontrado que GW501516 induce la expresión de *il-8* en células endoteliales, lo que genera aumento de angiogénesis y metástasis en cáncer de piel [116, 118]. Por tanto, la expresión reducida de *PPAR-β* encontrada en nuestro estudio, sugiere efectos positivos para la disminución del crecimiento tumoral a partir de la KD.

Los resultados obtenidos en el modelo animal con KD nos sugieren un comportamiento metabólico acorde a lo esperado, pero que requiere ser profundizado en los aspectos inflamatorios del mismo. Es importante que posteriores investigaciones aborden el efecto de la KD en el tiempo y en los diferentes tipos celulares encontrados en el SNC. Adicionalmente, el papel de PPAR en este modelo frente a la dieta cetogénica fue llamativo, al mostrar aumento en la expresión *PPAR-γ* relacionado con un efecto neuroprotector; mientras que el isotipo *PPAR-β* que se ha encontrado relacionado con el crecimiento tumoral, presentó expresión disminuida. En consecuencia, el modelo de pez cebra tiene un gran potencial para ser explorado en el contexto de la KD y su impacto de en desarrollo tumoral.

Teniendo en cuenta el potencial de la KD en el control del crecimiento del GBM se diseñó una aproximación experimental a una KD *in vitro*. Para esto se cultivó una línea celular de glioblastoma derivada de astrocitos humanos, empleando medio de cultivo bajo en glucosa suplementado con C8, C10 o agonistas de *PPAR-α* o *PPAR-β*. En GBM se ha encontrado que la restricción calórica, y el aumento de β -oxidación podrían conducir a un estrés energético, eventualmente letal para el tumor [119]. Esto se relaciona con el alto costo metabólico que requiere mantener la oxidación de ácidos grasos, lo cual impediría la supervivencia y proliferación de GBM en su microambiente [119].

En relación con los cambios en expresión génica, se identificó una mayor expresión de *ACADM* en condiciones de B.G. independiente del tratamiento empleado. Este aumento es congruente con reportes previos que han encontrado que los astrocitos primarios humanos en condiciones de glucosa baja aumentan la oxidación de ácidos grasos [120]. En adición, en glioblastoma se ha determinado que la baja expresión de *ACADM* podría ocasionar disfunción mitocondrial, al provocar acumulación de AGCM, generando lipotoxicidad [97].

En el caso de los astrocitos, los principales cuerpos cetónicos son β -hidroxibutirato y acetoacetato que son captados a través del transportador MCT1, codificado por el gen *SLC16A1*. Los niveles de expresión de este gen se vieron regulados positivamente en medio B.G. sin ligandos para los receptores PPAR, lo que facilitaría la captación de cetonas para obtención de energía. Además, al disminuir los niveles de glucosa en el medio, el ingreso de cetonas al ciclo de Krebs es directo a través del acetyl-CoA [121], lo cual podría estar relacionado con el incremento en *OGDH* e *IDH* en medio B.G. De esta manera, en cáncer, la pérdida en la función de *IDH* es crítica [100].

Notablemente, la disminución de glucosa en el medio de cultivo parece potenciar la β -oxidación, independiente de la suplementación con ácidos grasos o agonistas de los isotipos de PPAR. Los resultados sugieren que el ciclo de Krebs también se mantiene activo como parte de su mecanismo para obtención de energía. Sin embargo, la activación de los receptores PPAR parece modular hacia la baja las enzimas de ciclo de Krebs y el transporte de monocarboxilato, lo cual podría repercutir en la adquisición de energía de las células tumorales [122, 123].

En glioblastoma y gliosarcoma se ha encontrado que la expresión de *CCND3* promueve la pérdida del control del ciclo celular [124], de manera que este gen podría estar involucrado en el desarrollo y progresión del GBM [125]. En el linaje celular empleado se identificó un incremento

en la expresión de *CCND3* en presencia de ligandos de los receptores PPAR en medio B.G., sugiriendo una promoción del ciclo celular. A pesar de esto, la elevada expresión del gen *PTEN* observada en presencia de C8 y C10; y de *BCL-2* en todas las condiciones experimentales en medio B.G podría relacionarse con una disminución en la progresión tumoral [126]. En conjunto, estos resultados parecieran sugerir la activación de vías opuestas, por lo que resulta esencial realizar ensayos funcionales de proliferación celular que ayuden a esclarecer este aspecto. No obstante, existen reportes que han encontrado que solo la disminución de glucosa es capaz de inducir apoptosis en células de glioblastoma multiforme aunque no en astrocitos normales [126, 127].

Relacionado con esto, también se ha determinado que en presencia de glucosa baja y AGCM se podría inducir una disfunción mitocondrial, basado en la elevada expresión de genes metabólicos e inflamatorios con estos tratamientos, que podrían desencadenar un proceso apoptótico en las células [128]. En consecuencia, es de esperarse una disminución en la progresión tumoral en nuestro modelo, en condiciones de baja glucosa y presencia de C8 y C10 mediado por la activación de los receptores PPAR. Se ha reportado que los astrocitos son dependientes de glucosa como fuente principal de energía, sin embargo, se ha reportado que la energía total del cerebro en adultos puede surgir de la oxidación de ácidos grasos [129]. La línea celular T98G cultivada en medio bajo en glucosa presentó un cambio de expresión para ambos isotipos de PPAR (*PPAR- α* , *PPAR- β*).

Así mismo, también se han encontrado reportes sobre una posible actividad tumoral para este receptor cuando se encuentra activo [130], por lo que se destaca la importancia de esclarecer el rol de *PPAR- α* en la progresión tumoral. Es importante destacar que los niveles de expresión de *PPAR- β* se vieron drásticamente reducidos en las células cultivadas en medio B.G

independiente del tratamiento analizado. Esto resalta la importancia de este receptor en la KD. Como se ha mencionado anteriormente, respecto a *PPAR-β* se ha encontrado que tiene un papel importante sobre la angiogénesis fisiológica. Esto se respalda en un estudio que demostró que el agonista GW501516 aumenta la proliferación de células endoteliales, así como la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor (VGEFR1) [131].

Ahora bien, con el propósito de evaluar el papel de los isotipos de PPAR en las condiciones de baja glucosa y presencia de los ácidos grasos C8 y C10, se realizó un silenciamiento génico de la expresión de cada isotipo en la línea celular de glioblastoma. El efecto del *knockdown* de *PPAR-α* en medio B.G presentó una tendencia hacia el aumento en todos los genes, mientras que en medio N.G su efecto fue más sutil. Los cambios inducidos por *PPAR-α* en la expresión de genes asociados con metabolismo sugieren una sensibilidad del receptor a los niveles de glucosa y una participación importante en la modulación de la β -oxidación. Es reconocido que *PPAR-α* juega un papel importante en el metabolismo lipídico, implicado en la captación, unión y oxidación de ácidos grasos [132]. En condiciones de B.G. y *knockdown* de *PPAR-α* el aumento en expresión de genes de β -oxidación y ciclo de Krebs, sugiere que además de la partición de *PPAR-α*, existen otros mecanismos que permiten potenciar la obtención de energía a partir de esas vías.

Se ha encontrado que el fenofibrato induce la producción de β -hidroxibutirato en células de glioblastoma, la cual es independiente de la actividad de *PPAR-α* y de su nivel de expresión. La cetogénesis inducida por fenofibrato está relacionado con la detención de crecimiento de células cancerosas [123].

Los astrocitos tienen la capacidad de producir cuerpos cetónicos que sirven como substrato energético neuronal cuando los niveles de glucosa son bajos [133, 134]. Estos cuerpos

cetónicos también pueden ser liberados por las células de glioblastoma funcionando como combustible y como protector neuronal en el microambiente del tumor [133]. En este trabajo, se logró identificar que en medio B.G se incrementa la expresión del transportador de monocarboxilato, *SLC16A1*, al tratar las células con los ácidos grasos o fenofibrato en la línea celular con siRNA *PPAR- α* , sugiriendo un incremento en el ingreso de cuerpos cetónicos a las células del glioblastoma. No obstante, se ha encontrado que los cánceres primarios del SNC no tienen la capacidad de metabolizar cuerpos cetónicos para su propio beneficio [133]. Por tanto, es de esperarse que a pesar de la presencia de los cuerpos cetónicos no se obtenga energía a partir de los mismos.

En línea con lo anterior, se buscó identificar si este evento podría tener relación con el perfil de moléculas pro y antiapoptóticas, sin embargo, el comportamiento nuevamente no fue claro y requiere que se realicen nuevos ensayos funcionales en proliferación celular que indiquen si hay un déficit energético que disminuya el crecimiento tumoral. La reprogramación metabólica generada por cada tratamiento en condiciones de baja expresión para este receptor se podría relacionar con la alteración del efecto Warburg, donde se ha reportado que *PPAR- α* podría inducir muerte celular en células cancerígenas al bloquear este efecto [135].

Sin embargo, existen varias teorías sobre el papel de *PPAR- α* en el crecimiento celular donde se ha probado que este receptor es capaz de bloquear apoptosis celular mediada por *TNF- α* [102]. Esto podría relacionarse con la expresión de genes asociados a crecimiento tumoral encontrados en el presente trabajo. Donde bajo el efecto del silenciamiento de *PPAR- α* indujo a la disminución de la expresión de *CCND3* en condiciones N.G, y de *CCND3*, *BCL-2* y *PTEN* en medio B.G. Por otra parte, se ha encontrado que la eliminación de *PPAR- α* disminuye las capacidades proliferativas y de formación de tumores de glioblastoma [76]. Esta actividad podría

ser cumplida también por su agonista Fenofibrato indicando que la actividad positiva de este agonista podría ser independiente de PPAR- α [130].

Se ha encontrado también que el bloqueo de PPAR- α podría ocasionar anomalías metabólicas profundas en tejidos como el hígado y el corazón, debido a su importancia en β -oxidación [136]. Sin embargo, en ese mismo estudio se demostró que los isotipos PPAR- α y PPAR- β participan en diversas vías celulares abundancia de reacciones, por lo que altos niveles de PPAR- β podría lograr compensar las deficiencias del otro isotipo [136]. En el presente trabajo se evidenció que, en las células de glioblastoma, los procesos metabólicos asociados a los tratamientos con ácidos grasos no se vieron fuertemente afectados en la línea celular con *knockdown* para PPAR- α por lo que posiblemente PPAR- β está respaldando esta actividad.

De los tres isotipos de PPAR, PPAR- β es el menos explorado y en la presente investigación se destaca su papel en la KD y el proceso tumoral. Los cambios inducidos por PPAR- β sugieren una estrecha relación del receptor con los niveles de glucosa y una participación importante en la modulación de la expresión de enzimas que participan en β -oxidación, ciclo de Krebs y en los genes de crecimiento tumoral seleccionados [114]. Notoriamente, en condiciones de glucosa reducida y *knockdown* de PPAR- β se observó una ausencia de expresión de *IDH*, pero aumento de *OGDH* en todos los grupos experimentales, indicando una marcada alteración en el ciclo de Krebs.

Al analizar el comportamiento solamente en medio B.G. con las células silenciadas para PPAR- β se percibe una importante participación de C8 en el aumento de todos los genes evaluados, exceptuando *CCND3*. Aunque C10 y GW501516 también aumentan expresión génica, parecen perder su capacidad para modular *ACADM* y *OGDH*. Este comportamiento sugiere que C8 puede actuar a través de vías alternativas y reafirma que PPAR- β es un regulador metabólico

clave tanto de β -oxidación como del ciclo de Krebs. Estudios complementarios de metabolómica podrían ayudar a esclarecer y validar las rutas metabólicas influenciadas por este receptor.

Con respecto a su agonista GW501516 se ha reportado un papel interesante en la regulación de la inflamación mediada por el inflamasoma NLRP3, específicamente en astrocitos murinos [137]. En el presente trabajo se encontró un aumento significativo en la expresión de genes de *OGDH* y disminución significativa de *CCND3* cuando se silencia PPAR- β en medio B.G. En estas mismas condiciones, los AGCM disminuyeron significativamente la expresión de genes tumorales, indicando una posible represión del crecimiento celular.

Respecto al papel de PPAR- β en el crecimiento tumoral, se ha encontrado que este receptor promueve la angiogénesis fisiológica y patológica [131]. Donde se ha encontrado mayor neovascularización tumoral y mayor crecimiento tumoral en diferentes tumores de animales que presentan sobreexpresión de *PPAR- β* , aunque este comportamiento podría variar en diferentes tipos de cáncer [131]. Esto se pudo confirmar en el ensayo in vitro, ya que al silenciar este gen en la línea T98G se generó disminución en la expresión de *CCND3* en condiciones de glucosa normal, indicando que PPAR- β estaría implicado en la promoción del ciclo celular. No obstante, en medio B.G la reducción de *CCND3* estuvo acompañada por la de *PTEN* y *BCL-2* (en C8 y C10), señalando nuevamente que la reducción en glucosa cumple un papel clave en la actividad de PPAR- β y su influencia en las vías de crecimiento tumoral. Aunque no es posible afirmar si el rol de este isotipo en nuestro modelo es promotor de crecimiento tumoral. Los hallazgos de otros autores han demostrado que PPAR- β puede unirse a un supresor de la respuesta inmunitaria específico BCL-6, caracterizado por encontrarse en varios linfomas. Esta unión conlleva a una actividad antiapoptótica para el tumor inducida por este receptor [138].

Curiosamente, al cambiar los niveles de glucosa y silenciar el isotipo *PPAR-β*, los resultados proponen que la disminución en la expresión de genes tumorales inducida por los ácidos grasos C8 y C10, podría influenciar el crecimiento tumoral y ser importantes factores a considerar en la dieta cetogénica [139].

Bajo el efecto de ambos silenciamientos en medio bajo en glucosa se observó que al silenciar *PPAR-α* se incrementaba significativamente la expresión de *PPAR-β*, y al silenciar *PPAR-β* se aumentaba la expresión de *PPAR-α*. Previamente, se ha reportado que la sobreexpresión de *PPAR-β* podría suprimir la actividad de los isotipos *PPAR-α* y *PPAR-γ* [140]. Por consiguiente, es de esperarse que condiciones de estrés por baja de glucosa y baja expresión de uno de los isotipos, se altere la expresión de los otros receptores de PPAR, actuando como una respuesta compensatoria.

Gran parte de la información reportada sobre los receptores PPARs manifiesta una actividad antiinflamatoria inducida por productos de ácidos grasos [141]. Sin embargo, en el presente estudio se encontró que para el modelo *in vivo* (*pez cebra*) e *in vitro* (T98G) el aumento en la expresión de *IL-8* fue dependiente de la concentración de glucosa e independiente de la presencia de *PPAR-α*. Por lo que el medio B.G podría estar induciendo estrés en nuestros modelos experimentales, que conllevan a esa posible respuesta inflamatoria. Se ha encontrado que los niveles de glucosa afectan el microambiente de los astrocitos, alterando su metabolismo y homeóstasis cerebral. Los cambios en los niveles de glucosa podrían inducir daño glial por disminución de la proliferación astrocítica e inducir disfunción mitocondrial y aumentar la liberación de citocinas inflamatorias [142].

En contraste con lo ocurrido con *PPAR-α*, al silenciar *PPAR-β* el tratamiento con C8 fue el único que generó un incremento de expresión de *IL-8* en medio B.G, indicando un efecto

específico para este ácido graso y una regulación positiva de los niveles de IL-8 por parte de PPAR- β . Estos hallazgos sugieren que PPAR- β es necesario para modular la respuesta inflamatoria y que C8 puede emplear una vía alternativa a este isotipo. Cabe resaltar que en glioblastoma, IL-8 participa en la progresión del tumor al promover la proliferación celular y la neovascularización [143], por lo que más procesos tumorogénicos adicionales pueden estar siendo afectados al silenciar PPAR- β .

Para respaldar estos resultados, se realizó la cuantificación de proteínas asociadas a inflamación: IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , MMP-9 y TNF- α . en medio B.G los ácidos C8 y C10 provocaron mayor producción de IL-1 β , citocina fuertemente relacionada con la proliferación en tumores de glioblastoma [144]. Curiosamente, los tratamientos empleados en medio B.G disminuyeron la producción de IL-6. La producción de esta citocina es altamente frecuente en células de glioblastoma *in vivo* e *in vitro* y juega un papel en el edema tisular, angiogénesis e inflamación en este tipo de tumor [144, 145]. Tanto en medio alto como bajo en glucosa y en presencia de C8 y C10 estaría predominando la secreción de citocinas proinflamatorias. Este comportamiento indica que los ácidos grasos sí participarían en un efecto proinflamatorio que promueve crecimiento tumoral. Por su parte, los agonistas de PPAR, fenofibrato y GW501516 disminuyeron la secreción de IL-6 e IL-8 en condiciones de baja glucosa, siendo mayor la reducción con GW501516. Estos hallazgos señalan que la activación fuerte y específica de PPAR- α y PPAR- β impactaría negativamente la actividad inflamatoria.

Teniendo en cuenta la relevancia del receptor PPAR- β , se realizó un análisis del perfil inflamatorio para la condición siRNA PPAR- β . Notablemente, en medio N.G todas las citocinas y MMP-9 presentaron un incremento respecto a la línea sin silenciamiento. En medio B.G también se detectó un incremento en la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) en

las células interferidas para *PPAR-β*, aunque menos marcado. Algunos autores han reportado que cuando se activa *PPAR-β* con su agonista GW501516 se disminuye la inflamación mediada por el inflamasoma NLRP3, específicamente en astrocitos murinos [137]. Nuestros resultados: (1) apoyan la evidencia de que *PPAR-β* regula la producción de proteínas proinflamatorias; (2) revelan el papel crucial de este isotipo en el microambiente inflamatorio tumoral; y (3) destacan la importancia de la disminución de glucosa como factor potenciador del proceso inflamatorio.

La angiogénesis inflamatoria es elemental para el proceso de progresión tumoral. En este proceso participan proteínas como la IL-8 que regula la angiogénesis por medio del reclutamiento de neutrófilos, que promueve la actividad de VEGF [146]. Básicamente, *PPAR-β* es un factor indispensable en la angiogénesis tumoral mediada por factores inflamatorios que se asocian al microambiente tumoral. Considerando que la inflamación hace parte de la respuesta crónica de células asociadas a gliosis, la disminución de inflamación crónica mediante el uso de agonistas de *PPAR* es una estrategia de protección para las células neuronales involucradas en Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple [23]. Sin embargo, es importante analizar con precaución esta información. Como se ha mencionado anteriormente, la elevada expresión *PPAR-β* se ha relacionado con un estadio tumoral avanzado patológicamente y mayor probabilidad de metástasis [146], por lo que resulta esencial ahondar en sus mecanismos, ligandos, y grados de activación que conducen a diferentes fenotipos.

Considerando que la inflamación hace parte de la respuesta crónica de células asociadas a gliosis, la disminución de inflamación crónica mediante el uso de agonistas de *PPAR* es una estrategia de protección para las células neuronales involucradas en dichas enfermedades [23]. Sin embargo, es importante analizar con precaución esta información.

Para finalizar, en el tratamiento inflamatorio con IL-1 β en la línea celular T98G se

encontró, para aquellos genes que mostraron cambios significativos, una disminución en la expresión de todos los genes metabólicos, inflamatorios, de crecimiento tumoral y PPAR evaluados. Respecto a *IL-8*, la disminución de su expresión resulta ser positiva frente al efecto de la disminución de glucosa en un estado inflamatorio, ya que esta interleucina es importante en la inflamación astrocitaria inducida por $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN-\gamma$ in vitro.

En un estado inflamatorio, se ha encontrado que el metabolismo lipídico es interrumpido pero el fenofibrato es capaz de reprimir la inflamación con el fin de mantener un estado metabólico estable. En esta investigación se identificó un comportamiento similar, ya que el fenofibrato disminuyó la expresión de genes metabólicos (*ACADM*, *OGDHA*), también disminuyó la expresión del gen inflamatorio *il-8*, teniendo un posible efecto neuroprotector en medio bajo en glucosa [147]. Este agonista fue el único elemento que bajo efectos inflamatorios disminuyó la expresión del gen proapoptótico *PTEN* por lo que podría disminuir la supervivencia en la línea celular T98G [148]. Esto le otorga un papel importante al fenofibrato en la disminución de la tumorigénesis [133, 149]. Así mismo, en condiciones inflamatorias, el fenofibrato tuvo una respuesta importante al aumentar significativamente la expresión de *PTEN* y *BCL-2* en medio N.G, pudiéndose relacionar con la disminución del crecimiento tumoral. Por otro lado, con estado inflamatorio en B.G el protagonista fue GW501516 que incrementó la expresión de *IL-8* y *BCL-2*. Estos resultados soportan el papel importante de los receptores PPAR en la respuesta tumoral.

En el presente trabajo se logró determinar el papel de PPAR frente a la actividad de células de glioblastoma *in vitro*. Se encontró que PPAR- β sí podría tener efectos que promueven la supervivencia de células tumorales. Los ácidos grasos de cadena media son capaces de regular la actividad inflamatoria en la línea celular T98G a pesar de que no regulan de forma significativa los genes asociados a tumor. El metabolismo de los ácidos grasos está fuertemente influenciado por los ácidos C8 y C10. Así mismo, el agonista de PPAR- α presentó un papel importante frente a la expresión de *OGDHA*, *PTEN* E *IL-8* en condiciones inflamatoria.

CONCLUSIONES

En nuestro modelo *in vivo* de pez cebra se encontró que la dieta cetogénica podría tener un papel neuroprotector al promover el metabolismo de ácidos grasos de cadena media, al aumentar el proceso de β -oxidación, lo cual en un modelo *in vivo* con glioblastoma podría generar estrés en células tumorales. Adicionalmente, el transporte de colesterol inducido por la dieta cetogénica en el cerebro también podría tener un efecto positivo frente al glioblastoma, ya que regula los niveles de colesterol disponibles para el tumor, evitando su supervivencia. Sin embargo, es importante tener en cuenta el tiempo de exposición de la dieta, ya que esto puede influir en la respuesta cerebral, aumentando la expresión de genes inflamatorios cuando la dieta es prolongada. Por otro lado se identificó que en condiciones de KD el cerebro promueve la expresión de *PPAR- γ* , que se ha caracterizado por presentar un papel neuroprotector. Por el contrario, indujo disminución en la expresión de *PPAR- β* , este resultado en condiciones tumorales podría ser positivo ya que este isotipo se ha caracterizado por promover la supervivencia y crecimiento tumoral.

Respecto al modelo *in vitro*, se corroboró un papel importante para el isotipo *PPAR- β* , donde al silenciar este gen se observó la disminución de la expresión de genes asociados a crecimiento tumoral en condiciones de baja glucosa, corroborando el papel que tiene este isotipo en la tumorigénesis del glioblastoma. A pesar del efecto de este isotipo en la supervivencia tumoral, se encontró que el bloqueo en su expresión en condiciones N.G desencadena una mayor secreción de proteínas inflamatorias tales como IL-6, IL-8 e IFN- γ . También se encontró que *PPAR- β* es un importante regulador del metabolismo asociado a β -oxidación y ciclo de Krebs. Adicionalmente, su agonista GW501516 podría promover el transporte de cuerpos cetónicos,

disminuir la supervivencia celular y activar PPAR- α como una posible respuesta compensatoria a la ausencia de PPAR- β . En condiciones inflamatorias en medio B.G, este agonista presentó mayor afinidad por su receptor, aumentando su expresión. Estos hallazgos están relacionados con la disminución de glucosa en el medio, que promueve estos efectos positivos bajo el efecto de knockdown de *PPAR- β* .

Respecto a PPAR- α los hallazgos obtenidos también estuvieron sujetos a la concentración de glucosa, donde se encontró que en medio B.G el *knockdown* de este isotipo podría inducir el transporte de monocarboxilato en presencia de C8, C10 o fenofibrato. Esto es importante teniendo en cuenta que la cetogénesis inducida por fenofibrato está relacionada con la detención de crecimiento de células cancerosas. El fenofibrato también presentó un papel importante en condiciones de siRNA PPAR- α aumentando la expresión del gen antiapoptótico *PTEN*. Por otro lado en medio B.G se observó que al silenciar *PPAR- α* se incrementa significativamente la expresión de *PPAR- β* , y al silenciar *PPAR- β* se aumenta la expresión de *PPAR- α* , por lo que se propone una respuesta compensatoria entre estos dos receptores. Del mismo modo, en condiciones de estrés por baja de glucosa y baja expresión de uno de los isotipos, se altera la expresión de los otros receptores de PPAR.

A pesar de los efectos positivos que puede tener el estado cetogénico frente al crecimiento tumoral, respecto a inflamación se encontró que en condiciones B.G se incrementa la expresión de *IL-8*, principalmente con C8. De manera que al disminuir la glucosa, este tratamiento podría inducir estrés en las células. De forma similar, en condiciones no silenciadas y de knockdown para *PPAR- α* se indujo estrés bajo el efecto de todos los tratamientos. A pesar de esto, los agonistas de PPAR, fenofibrato y GW501516 disminuyeron la secreción de IL-6 e IL-8 en medio B.G, por lo que nosotros señalamos que la activación fuerte y específica de PPAR- α y PPAR- β

impactaría negativamente la actividad inflamatoria. Es importante resaltar que la secreción de proteínas inflamatorias estaría fuertemente ligada al silenciamiento de *PPAR-β*, ya que en condiciones sin silenciamiento, se disminuyó la secreción de IL-6 e IL-8. Sin embargo, bajo el efecto de siRNA *PPAR-β* en medio N.G se vio incrementada la secreción de IL-8, IL-6 e IFN- γ .

Finalmente, se espera realizar más investigaciones que profundicen el papel de *PPAR-β*, principalmente, con el fin de mejorar el conocimiento sobre este receptor y poder utilizarlos como diana terapéutica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tan, A.C., Ashley, D. M., López, G. Y., Malinzak, M., Friedman, H. S., & Khasraw, M. , *Management of glioblastoma: State of the art and future directions*. CA: a cancer journal for clinicians, 2020. **70**(4): p. 299-312.
2. Stadlbauer, A., Marhold, F., Oberndorfer, S., Heinz, G., Zimmermann, M., Buchfelder, M., ... & Kiefe, T. M., *Metabolic Tumor Microenvironment Characterization of Contrast Enhancing Brain Tumors Using Physiologic MRI*. Metabolites, 2021. **11**(10): p. 668.
3. Wesolowska, A., Kwiatkowska, A., Slomnicki, L., Dembinski, M., Master, A., Sliwa, M., ... & Kaminska, B. , *Microglia-derived TGF- β as an important regulator of glioblastoma invasion—an inhibition of TGF- β -dependent effects by shRNA against human TGF- β type II receptor*. Oncogene, 2008. **27**(7): p. 918-930.
4. Sowers, J., Johnson, KM, Conrad, C., Patterson, JT y Sowers, LC, *The role of inflammation in brain cancer*. . Inflammation and Cancer, 2014: p. 75-105.
5. Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J., & Takeya, M. , *Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas*. . The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 2008. **216**(1): p. 15-24.
6. Conroy, S., Kruyt, F. A., Wagemakers, M., Bhat, K. P., & den Dunnen, W. F., *IL-8 associates with a pro-angiogenic and mesenchymal subtype in glioblastoma*. . Oncotarget, 2018. **9**(21): p. 15721.

7. Mendes, O., Kim, H. T., & Stoica, G. , *Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model* . Clinical & experimental metastasis, 2005. **22**(3): p. 237-246.
8. Lefranc, F., Sadeghi, N., Camby, I., Metens, T., Dewitte, O., & Kiss, R. , *Present and potential future issues in glioblastoma treatment* . Expert review of anticancer therapy, 2006. **6**(5): p. 719-732.
9. Ramírez Camacho, A., Meavilla, S., Catalán, N., Gutiérrez, A., & Campistol Plana, J., *Experiencia con la dieta cetogénica como tratamiento en la epilepsia refractaria*. Revista de Neurologia, 2011. **53**(9): p. 524-530.
10. Zhou, W., Mukherjee, P., Kiebish, M. A., Markis, W. T., Mantis, J. G., & Seyfried, T. N., *The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer*. Nutrition & metabolism. , 2007. **41**: p. 1-15.
11. Seyfried, T.N., Sanderson, T. M., El-Abbadi, M. M., McGowan, R., & Mukherjee, P. , *Role of glucose and ketone bodies in the metabolic control of experimental brain cancer*. . British journal of cancer,, 2003. **89**(7): p. 1375-1382.
12. Seyfried, T.N., Kiebish, M., Mukherjee, P., & Marsh, J. , *Targeting energy metabolism in brain cancer with calorically restricted ketogenic diets* . Epilepsia, 2008. **49**: p. 114-116.
13. Neal, E.G., 2014. **6**(25). *Ketogenic dietary therapy for epilepsy and other disorders: current perspectives*. . Nutrition and Dietary Supplements, 2014. **6**(25).
14. Rao, M.S., & Jacobson, M. (Eds.), *Developmental neurobiology*, ed. S.S.B. Media. 2006.

15. Steenbergen, P.J., Richardson, M. K., & Champagne, D. L. , *The use of the zebrafish model in stress research*. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2011. **35**(6): p. 1432-1451.
16. Newman, M., Ebrahimie, E., & Lardelli, M., *Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research*. . Frontiers in genetics, 2014. **5**: p. 189.
17. Stewart, A.M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. V., *Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside*. . Trends in neurosciences, 2014. **37**(5): p. 264-278.
18. Jernberg, J.N., Bowman, C. E., Wolfgang, M. J., & Scafidi, S. , *Developmental regulation and localization of carnitine palmitoyltransferases (CPT s) in rat brain*. Journal of neurochemistry, 2017. **142**(3): p. 407-419.
19. White, C.J., Lee, J., Choi, J., Chu, T., Scafidi, S., & Wolfgang, M. J. , *Determining the bioenergetic capacity for fatty acid oxidation in the mammalian nervous system*. Molecular and cellular biology, 2020. 40(10): p. e00037-20.
20. Ma, A.P., Yeung, C. L., Tey, S. K., Mao, X., Wong, S. W., Ng, T. H., ... & Yam, J. W., *Suppression of ACADM-Mediated Fatty Acid Oxidation Promotes Hepatocellular Carcinoma via Aberrant CAV1/SREBP1 Signaling*. Cancer Research, 2021. 81(3): p. 3679-3692.
21. Tretter, L., & Adam-Vizi, V., *Alpha-ketoglutarate dehydrogenase: a target and generator of oxidative stress*. . Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005. **360**(1464): p. 2335-2345.
22. Khoo, N.K., Hebbar, S., Zhao, W., Moore, S. A., Domann, F. E., & Robbins, M. E. , *Differential activation of catalase expression and activity by PPAR agonists*:

implications for astrocyte protection in anti-glioma therapy. Redox biology, 2013. **1**(1): p. 70-79.

23. Iglesias, J., Morales, L., & Barreto, G. E. , *Metabolic and inflammatory adaptation of reactive astrocytes: role of PPARs*. Molecular neurobiology, 2017. **54**(4): p. 2518-2538.

24. Strakova, N., Ehrmann, J., Bartos, J., Malikova, J., Dolezel, J., & Kolar, Z. , *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) agonists affect cell viability, apoptosis and expression of cell cycle related proteins in cell lines of glial brain tumors*. Neoplasma, 2005. **52**(2): p. 126-136.

25. Defaux, A., Zurich, M. G., Braissant, O., Honegger, P., & Monnet-Tschudi, F. , *Effects of the PPAR- β agonist GW501516 in an in vitro model of brain inflammation and antibody-induced demyelination*. . Journal of neuroinflammation, 2009. **6**(1): p. 1-13.

26. Arsenijevic, D., De Bilbao, F., Plamondon, J., Paradis, E., Vallet, P., Richard, D., ... & Giannakopoulos, P, *Increased infarct size and lack of hyperphagic response after focal cerebral ischemia in peroxisome proliferator-activated receptor β -deficient mice*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2006. **26**(3): p. 433-445.

27. Wang, Y.X., *PPARs: diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases*. Cell research, 2010. **20**(2): p. 124-137.

28. Altinoz, M.A., Ozpinar, A., & Seyfried, T. N. , *Caprylic (Octanoic) Acid as a potential fatty acid chemotherapeutic for glioblastoma*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2020. **159**(102142).

29. Seyfried, T.N., Shelton, L., Arismendi-Morillo, G., Kalamian, M., Elsakka, A., Maroon, J., & Mukherjee, P. , *Provocative question: should ketogenic metabolic therapy become the standard of care for glioblastoma?* Neurochemical Research, 2019. **44**(10): p. 2392-2404.
30. Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. U. , *Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment.* Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP, 2017. **18**(1): p. 3.
31. Flechl, B., Ackerl, M., Sax, C., Dieckmann, K., Crevenna, R., Gaiger, A., ... & Marosi, C. , *Neurocognitive and sociodemographic functioning of glioblastoma long-term survivors.* Journal of Neuro-oncology, 2012. **109**(2): p. 331-339.
32. Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., ... & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. , *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.* The lancet oncology, 2009. **10**(5): p. 459-466.
33. Taphoorn, M.J., Stupp, R., Coens, C., Osoba, D., Kortmann, R., van den Bent, M. J., ... & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. , *Health-related quality of life in patients with glioblastoma: a randomised controlled trial.* . The lancet oncology, 2005. **6**(12): p. 937-944.
34. Poff, A.K., A. P. Egan, K. M. Sahebjam, S. D'Agostino, D. and B. Kumar, N. , *Targeting the Warburg effect for cancer treatment: Ketogenic diets for management of glioma.* Seminars in Cancer Biology, 2019. **56**: p. 135-148.

35. Thomas, J.G., & Veznedaroglu, E. , *Ketogenic diet for malignant gliomas: a review*. Current Nutrition Reports, 2020. **9**(3): p. 258-263.
36. Maroon, J., Bost, J., Amos, A., & Zuccoli, G. , *Restricted calorie ketogenic diet for the treatment of glioblastoma multiforme*. . Journal of child neurology, 2013. **28**(8): p. 1002-1008.
37. Damiano, F., De Benedetto, G. E., Longo, S., Giannotti, L., Fico, D., Siculella, L., & Giudetti, A. M. , *Decanoic acid and not octanoic acid stimulates fatty acid synthesis in U87MG glioblastoma cells: a metabolomics study*. Frontiers in Neuroscience, 2020. **14**: p. 783.
38. Kostadinova, R., Wahli, W., & Michalik, L. , *PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation*. Current medicinal chemistry, 2005. **12**(25): p. 2995-3009.
39. Wahli, W., & Michalik, L. , *PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2012. **23**(7): p. 351-363.
40. VALENZUELA, I.V., *Reprogramación Metabólica en Cáncer*. La portada, 2021. **23**.
41. Schumann, T., Adhikary, T., Wortmann, A., Finkernagel, F., Lieber, S., Schnitzer, E., . & Müller, R. , *Deregulation of PPAR β / δ target genes in tumor-associated macrophages by fatty acid ligands in the ovarian cancer microenvironment*. Oncotarget, 2015. **6**(15): p. 13416.
42. Lee, J.C., Mayer-Proschel, M., & Rao, M. S. , *Gliogenesis in the central nervous system*. . Glia, 2000. **30**(2): p. 105-121.
43. Talaverón, R., & CJ, M. D. , *La glía, las otras células del sistema nervioso*. 2019.

44. Jessen, K.R., *Glial cells*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004. **36**(10): p. 1861–1867.
45. Altinoz, M.A., Ozpinar, A., & Seyfried, T. N. , *Caprylic (Octanoic) Acid as a potential fatty acid chemotherapeutic for glioblastoma*. . Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2020. **159**: p. 102-142.
46. Idoate, M.A., & Echeveste, J. I. , *Actualización sobre la biología molecular de los gliomas: hacia una clasificación patomolecular de los gliomas*. 2007.
47. Kapoor, M., & Gupta, V. , *Astrocytoma*. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing., 2021.
48. Sathornsumetee, S., Rich, J. N., & Reardon, D. A., *Diagnosis and treatment of high-grade astrocytoma*. . Neurologic clinics, 2007. **25**(4): p. 1111-1139.
49. Seyfried, T.N., Shelton, L., Arismendi-Morillo, G., Kalamian, M., Elsakka, A., Maroon, J., & Mukherjee, P., *Provocative question: should ketogenic metabolic therapy become the standard of care for glioblastoma?* . Neurochemical Research, 2019. **44**(10): p. 2392-2404.
50. Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. U. , *Glioblastoma multiforme: a review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment*. . Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP 2017. **18**(1): p. 3.
51. Grivennikov, S.I., Greten, F. R., & Karin, M. , *Immunity, inflammation, and cancer*. . Cell, 2010. **140**(6): p. 883-899.
52. Sica, A., Allavena, P., & Mantovani, A. , *Cancer related inflammation: the macrophage connection*. Cancer letters, 2008. **267**(2): p. 204-215.

53. Poff, A.K., A. P. Egan, K. M. Sahebjam, S. D'Agostino, D. and B. Kumar, N. , *Targeting the Warburg effect for cancer treatment: Ketogenic diets for management of glioma*. *Seminars in Cancer Biology*, 2019. **56**: p. 135-148.
54. N. Seyfried, T.a.M.S., L., *Cancer as a metabolic disease*. *Nutrition and Metabolism*, 2010. **7**(1): p. 1-22.
55. Yeung, Y.T., McDonald, K. L., Grewal, T., & Munoz, L. , *Interleukins in glioblastoma pathophysiology: implications for therapy*. *British journal of pharmacology*, 2013. **168**(3): p. 591-606.
56. Buonfiglioli, A., & Hambardzumyan, D. , *Macrophages and microglia: The cerberus of glioblastoma*. *Acta Neuropathologica Communications*, 2021. **9**(1): p. 1-21.
57. Panni, R.Z., Linehan, D. C., & DeNardo, D. G, *Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer*. . *Immunotherapy*, 2013. **5**(10): p. 1075-1087.
58. Mendiola, A.V., & Cruz, I. S., *Metabolismo energético y cáncer*. . *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salu*, 2014. **17**(2): p. 108-113. .
59. DeBerardinis, R.J., & Chandel, N. S. , *Fundamentals of cancer metabolism*. *Science advances*, 2016. **2**(5): p. e1600200. .
60. Castillo, A., *Metabolismo del cáncer efecto Warburg y lactato. Regreso a 1920*. Fissac, 2021
61. Currie, E., Schulze, A., Zechner, R., Walther, T. C., & Farese Jr, R. V. , *Cellular fatty acid metabolism and cancer*. *Cell metabolism*, 2013. **18**(2): p. 153-161.
62. Chen, M., & Huang, J. , , *The expanded role of fatty acid metabolism in cancer: new aspects and targets*. . *Precision clinical medicine*, 2019. **2**(3): p. 183-191. .

63. Armeno, M., Caraballo, R., Vaccarezza, M., Alberti, M. J., Ríos, V., Galicchio, S., ... & Sosa, P., , *Consenso nacional sobre dieta cetogénica*. . Rev Neurol, 2014. **59**(5): p. 213-223.
64. Ávila, E., *La dieta cetogénica*. Rev Chil Epilepsia, 2006. **1**: p. 25-33.
65. C. Woolf, E.S., N; and C. Scheck, A.,, *Tumor metabolism, the ketogenic diet and β hydroxybutyrate: Novel approaches to adjuvant brain tumor therapy*. Frontiers in Molecular Neuroscience, 2016. **9**: p. 2016.
66. Moreno-Sepúlveda, J., & Capponi, M. , *Dieta baja en carbohidratos y dieta cetogénica: impacto en enfermedades metabólicas y reproductivas*. . Revista médica de Chile, 2020. **148**(11): p. 1630-1639.
67. Zhou, W., Mukherjee, P., Kiebish, M. A., Markis, W. T., Mantis, J. G., & Seyfried, T. N., *The calorically restricted ketogenic diet, an effective alternative therapy for malignant brain cancer*. Nutrition & metabolism, 2007. **4**(1): p. 1-15.
68. Fine, E.J., Miller, A., Quadros, E. V., Sequeira, J. M., & Feinman, R. D. , . , *Acetoacetate reduces growth and ATP concentration in cancer cell lines which over-express uncoupling protein 2*. Cancer cell international, 2009. **9**(1): p. 1-11.
69. Tachibana, K., Yamasaki, D., & Ishimoto, K. , *The role of PPARs in cancer*. . PPAR research, 2008: p. 2008.
70. Corrales, P.I.-L., Adriana; Medina-Gómez, Gema *Maintenance of Kidney Metabolic Homeostasis by PPAR Gamma*. . International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(7): p. 2063.

71. Chinetti, G., Fruchart, J. C., & Staels, B., *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation*. *Inflammation research*, 2000. **49**(10): p. 497-505.
72. Haluzik, M.M., & Haluzik, M. , , *PPAR-alpha and insulin sensitivity*. . *Physiological research*, 2006. **55**(2): p. 115-122.
73. Li, A.C., & Glass, C. K. , , *PPAR-and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis*. *Journal of lipid research* 2004. **45**(12): p. 2161-2173.
74. Luquet, S., Gaudel, C., Holst, D., Lopez-Soriano, J., Jehl-Pietri, C., Fredenrich, A., & Grimaldi, P. A. , *Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes*. . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)Molecular Basis of Disease*, 2005. **1740**(2): p. 313-317.
75. Marion-Letellier, R., Savoye, G., & Ghosh, S., , *Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma*. . *European journal of pharmacology*, 2016. **785**: p. 44-49. .
76. Tan, Y., Wang, M., Yang, K., Chi, T., Liao, Z., & Wei, P. , *PPAR- α modulators as current and potential cancer treatments*. . *Frontiers in oncology*, 2021. **11**: p. 599995.
77. Chi, T., Wang, M., Wang, X., Yang, K., Xie, F., Liao, Z., & Wei, P., *PPAR- γ modulators as current and potential cancer treatments*. . *Frontiers in Oncology*, 2021. **11**: p. 737776.
78. Ogino, S., Shima, K., Baba, Y., Nosho, K., Irahara, N., Kure, S., ... & Fuchs, C. S. , *Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARG, PPARgamma) is associated with good prognosis*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(4): p. 1242-1250.

79. Liu, Y., Colby, J. K., Zuo, X., Jaoude, J., Wei, D., & Shureiqi, I. , *The role of PPAR- δ in metabolism, inflammation, and cancer: many characters of a critical transcription factor*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(11): p. 3339.
80. Pfaffl, M.W., *Quantification strategies in real-time PCR. AZ of quantitative PCR*. 2004. **1**: p. 89-113.
81. Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. , *Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease*. . Nature communications, 2020. **11**(1): p. 1-11.
82. Sanzana-Cuche, R., & Atenas, T. L. , *Dieta cetogénica: mecanismos en el control de la epilepsia refractaria: Ketogenic diet: refractory epilepsy control mechanisms*. ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas, 2020. **45**(1): p. 51-56.
83. Karasinska, J.M., Rinninger, F., Lütjohann, D., Ruddle, P., Franciosi, S., Kruit, J. K., ... & Hayden, M. R. , *Specific loss of brain ABCA1 increases brain cholesterol uptake and influences neuronal structure and function*. Journal of Neuroscience, 2009. **29**(11): p. 3579-3589.
84. Park, S.J., Smith, C. P., Wilbur, R. R., Cain, C. P., Kallu, S. R., Valasapalli, S., ... & Velpula, K. K. , *An overview of MCT1 and MCT4 in GBM: small molecule transporters with large implications*. American journal of cancer research, 2018. **8**(10): p. 1967.
85. Andersen, J.V., Westi, E. W., Jakobsen, E., Urruticoechea, N., Borges, K., & Aldana, B. I., *Astrocyte metabolism of the medium-chain fatty acids octanoic acid and decanoic acid promotes GABA synthesis in neurons via elevated glutamine supply*. . Molecular brain, 2021. **14**(1): p. 1-13.

86. Ketzer, F., Abdelrasoul, H., Vogel, M., Marienfeld, R., Müschen, M., Jumaa, H., ... & Ushmorov, A., *CCND3 is indispensable for the maintenance of B-cell acute lymphoblastic leukemia*. . *Oncogenesis*, 2022. **11**(1): p. 1.
87. Song, M.S., Salmena, L., & Pandolfi, *The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2012. **13**(5): p. 283-296.
88. Tsujimoto, Y., *Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?* . *Genes to cells*, 1998: p. 697-707.
89. Yin, J., Valin, K. L., Dixon, M. L., & Leavenworth, J. W., *The role of microglia and macrophages in CNS homeostasis, autoimmunity, and cancer*. . *Journal of Immunology Research*, 2017. **2017**.
90. Weber, D.D., Aminzadeh-Gohari, S., Tulipan, J., Catalano, L., Feichtinger, R. G., & Kofler, B. , *Ketogenic diet in the treatment of cancer—where do we stand?*. *Molecular metabolism*, 2020. **33**: p. 102-121.
91. Herrera-González, N.E., Martínez-García, F., & Mejía-Jiménez, E. , *El efecto Warburg: la mano derecha en el desarrollo del cáncer*. *Revista de especialidades médico-quirúrgicas*, 2015. **20**(2): p. 171-177.
92. Maroon, J., Bost, J., Amos, A., & Zuccoli, G. , *Restricted calorie ketogenic diet for the treatment of glioblastoma multiforme*. *Journal of child neurology*, 2013. **28**(8): p. 1002-1008.
93. Zhang, Q., Xu, L., Xia, J., Wang, D., Qian, M., & Ding, S., *Treatment of diabetic mice with a combination of ketogenic diet and aerobic exercise via modulations of PPARs gene programs*. . *PPAR research*, 2018. **2018**.

94. Longo, R., Peri, C., Cricrì, D., Coppi, L., Caruso, D., Mitro, N., ... & Crestani, M. , *Ketogenic diet: a new light shining on old but gold biochemistry*. *Nutrients*, 2019. **11**(10): p. 2497.
95. Paoli, A., Bianco, A., Damiani, E., & Bosco, G. , *Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases*. *BioMed research international*, 2014: p. 2014.
96. Chen, C.T., & Bazinet, R. P. , *β -oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2015. **92**: p. 33-40.
97. Puca, F., Yu, F., Bartolacci, C., Pettazzoni, P., Carugo, A., Huang-Hobbs, E., ... & Draetta, G. F. , *Medium-chain acyl CoA dehydrogenase protects mitochondria from lipid peroxidation in glioblastoma*. . *Cancer discovery*, 2021. **11**(11): p. 2904.
98. Gano, L.B., Patel, M., & Rho, J. M., *Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases*. *Journal of lipid research*, 2014. **55**(11): p. 2211-2228.
99. Yang, H., Ye, D., Guan, K. L., & Xiong, Y. , *IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives*. . *Clinical cancer research*, 2012. **18**(20): p. 5562-5571.
100. Krell, D., Assoku, M., Galloway, M., Mulholland, P., Tomlinson, I., & Bardella, C. , *Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma*. *PloS one*,, 2011. **6**(5): p. e19868.
101. Maldonado Saavedra, O., Ramírez Sánchez, I., García Sánchez, J. R., Ceballos Reyes, G. M., & Méndez Bolaina, E. , *Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas*. . *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, , 2012. **43**(2): p. 7-22.

102. Wang, W.R., Liu, E. Q., Zhang, J. Y., Li, Y. X., Yang, X. F., He, Y. H., & Lin, R. , *Activation of PPAR alpha by fenofibrate inhibits apoptosis in vascular adventitial fibroblasts partly through SIRT1-mediated deacetylation of FoxO1*. . Experimental Cell Research, , 2015. **338**(154-63).
103. Ahmad, F., Sun, Q., Patel, D., & Stommel, J. M. , *Cholesterol metabolism: A potential therapeutic target in glioblastoma*. . Cancers, 2019. **11**(2): p. 146.
104. Hirsch-Reinshagen, V., Zhou, S., Burgess, B. L., Bernier, L., McIsaac, S. A., Chan, J. Y., ... & Wellington, C. L., *Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(39): p. 41197-41207.
105. Şovrea, A.S., Boşca, B., Melincovici, C. S., Constantin, A. M., Crintea, A., Mărginean, M., ... & Crivii, C. B. , *Multiple faces of the glioblastoma microenvironment*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(2): p. 595.
106. Dupuis, N., Curatolo, N., Benoist, J. F., & Auvin, S. , *Ketogenic diet exhibits anti-inflammatory properties*. . Epilepsia, 2015. **56**(7): p. e95-e98.
107. Koh, S., Dupuis, N., & Auvin, S. , *Ketogenic diet and neuroinflammation*. . Epilepsy Research, 2020. **167**: p. 106454.
108. Higami, Y., Barger, J. L., Page, G. P., Allison, D. B., Smith, S. R., Prolla, T. A., & Weindruch, R. , *Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue*. . The Journal of nutrition, 2006. **136**(2): p. 343-352.
109. Jung, K.J., Lee, E. K., Kim, J. Y., Zou, Y., Sung, B., Heo, H. S., ... & Chung, H. Y. , *Effect of short term calorie restriction on pro-inflammatory NF-kB and AP-1 in aged rat kidney*. . Inflammation Research, 2009. **58**: p. 143-150.

110. Jiang, Z., Yin, X., Wang, M., Chen, T., Wang, Y., Gao, Z., & Wang, Z., *Effects of Ketogenic Diet on Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases*. *Aging and Disease*, 2022. **13**(4): p. 1146.
111. la Cour Poulsen, L., Siersbæk, M., & Mandrup, S. , *PPARs: fatty acid sensors controlling metabolism*. In *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press., 2012. **23**(6): p. 631-639.
112. Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. , *PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR- β/δ and PPAR- γ* . *Future cardiology*, 2017. **13**(3): p. 279-296.
113. Simeone, T.A., Matthews, S. A., Samson, K. K., & Simeone, K. A. , *Regulation of brain PPAR γ 2 contributes to ketogenic diet anti-seizure efficacy* . *Experimental neurology*, 2017. **287**: p. 54-64.
114. Strosznajder, A.K., Wójtowicz, S., Jeżyna, M. J., Sun, G. Y., & Strosznajder, J. B. , *Recent Insights on the Role of PPAR- β/δ in Neuroinflammation and Neurodegeneration, and Its Potential Target for Therapy* . *Neromolecular medicine*, 2021. **23**: p. 86-98.
115. Heneka, M.T., & Landreth, G. E. , *PPARs in the brain*. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular and cell biology of lipids*, 2007. **1771**(8): p. 1031-1045.
116. Wagner, N., & Wagner, K. D. , *PPAR beta/delta and the hallmarks of cancer*. *Cells*, 2020. **9**(5): p. 1133.
117. Wang, D., Wang, H., Guo, Y., Ning, W., Katkuri, S., Wahli, W., ... & DuBois, R. N. , *Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor δ and VEGF stimulates cancer progression* . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. **103**(50): p. 19069-19074.

118. Zuo, X., Xu, W., Xu, M., Tian, R., Moussalli, M. J., Mao, F., ... & Shureiqi, I. , 2(1). *Metastasis regulation by PPAR δ expression in cancer cells*. JCI insight, 2017. **2**(1).
119. Kant, S., Kesarwani, P., Prabhu, A., Graham, S. F., Buelow, K. L., Nakano, I., & Chinnaiyan, P. , *Enhanced fatty acid oxidation provides glioblastoma cells metabolic plasticity to accommodate to its dynamic nutrient microenvironment*. . Cell Death & Disease, 2020. **11**(4): p. 253.
120. Weightman Potter, P.G., Vlachaki Walker, J. M., Robb, J. L., Chilton, J. K., Williamson, R., Randall, A. D., *Basal fatty acid oxidation increases after recurrent low glucose in human primary astrocytes*. . Diabetologia,, 2019. **62**(187-198).
121. Nugent, S., Courchesne-Loyer, A., St-Pierre, V., Vandenberghe, C., Castellano, C. A., & Cunnane, S. C. , *Ketones and brain development: Implications for correcting deteriorating brain glucose metabolism during aging*. . OCL, 2016. **23**(1): p. D110.
122. Regueira, M., Riera, M. F., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Cigorruga, S. B., & Meroni, S. B., *Activation of PPAR α and PPAR β/δ regulates Sertoli cell metabolism*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2014. **382**(1): p. 271-281.
123. Grabacka, M., Pierzchalska, M., Dean, M., & Reiss, K., *Regulation of ketone body metabolism and the role of PPAR α* . . International journal of molecular sciences, 2016. **17**(12): p. 2093.
124. Büschges, R., Weber, R. G., Actor, B., Lichter, P., Collins, V. P., & Reifenberger, G. , *Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1 CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas*. . Brain pathology, 1999. **9**(3): p. 435-442.
125. Kuchiki, H., Saino, M., Nobukuni, T., Yasuda, J., Maruyama, T., Kayama, T., ... & Sekiya, T. , *Detection of amplification of a chromosomal fragment at 6p21 including the*

- cyclin D3 gene in a glioblastoma cell line by arbitrarily primed polymerase chain reaction*. International journal of cancer, 2000. **85**(1): p. 113-116.
126. Jelluma, N., Yang, X., Stokoe, D., Evan, G. I., Dansen, T. B., & Haas-Kogan, D. A. , *Glucose withdrawal induces oxidative stress followed by apoptosis in glioblastoma cells but not in normal human astrocytes*. . Molecular cancer research, 2006. **4**(5): p. 319-330.
127. Ouyang, Y.B., & Giffard, R. G. , *Changes in astrocyte mitochondrial function with stress: effects of Bcl-2 family proteins*. Neurochemistry international, 2004. **45**(2-3): p. 371-379.
128. Pons, R., & De Vivo, D. C. , *Mitochondrial disease*. . Current Treatment Options in Neurology, 2001. **3**(271-288).
129. Iglesias, J., Morales, L., & Barreto, G. E. , *Metabolic and inflammatory adaptation of reactive astrocytes: role of PPARs*. Molecular neurobiology, 2017. **54**: p. 2518-2538.
130. Wagner, N., & Wagner, K. D., *Peroxisome proliferator-activated receptors and the hallmarks of cancer*. . Cells, 2022. **11**(15): p. 2432.
131. Du, S., *Siyue Du. Impact of Vascular PPAR beta/delta Expression on Tumor Progression and Metastasis Formation*. Molecular biology. Université Côte d'Azur, 2020. English. (NNT : 2020COAZ6015). (tel-03122768), 2020.
132. Monsalve, F.A., Pyarasani, R. D., Delgado-Lopez, F., & Moore-Carrasco, R. , *Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases*. . Mediators of inflammation, 2013. **2013**.

133. Grabacka, M.M., Wilk, A., Antonczyk, A., Banks, P., Walczyk-Tytko, E., Dean, M., ... & Reiss, K., *Fenofibrate induces ketone body production in melanoma and glioblastoma cells*. . *Frontiers in endocrinology*, 2016. **7**: p. 5.
134. Guzmán, M., & Blázquez, C. , *Is there an astrocyte–neuron ketone body shuttle?*. . *TRENDS in Endocrinology & metabolism*, 2001. **12**(4): p. 169-173.
135. Huang, Y.P., & Chang, N. W. , *Proteomic analysis of oral cancer reveals new potential therapeutic targets involved in the Warburg effect*. . *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2017. **44**(8): p. 880-887.
136. Muoio, D.M., MacLean, P. S., Lang, D. B., Li, S., Houmard, J. A., Way, J. M., ... & Kraus, W. E. , *Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α knock-out mice: evidence for compensatory regulation by PPAR δ* . *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(9): p. 26089-26097.
137. Chen, L., Xue, L., Zheng, J., Tian, X., Zhang, Y., & Tong, Q. , *PPAR β/δ agonist alleviates NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease*. . *Behavioural brain research*, 2019. **356**: p. 483-489.
138. Busch, D., Kapoor, A., Rademann, P., Hildebrand, F., Bahrami, S., Thiemermann, C., & Osuchowski, M. F. , *Delayed activation of PPAR- β/δ improves long-term survival in mouse sepsis: effects on organ inflammation and coagulation*. *Innate Immunity*, 2018. **24**(4): p. 262-273.
139. Scheck, A.C., Abdelwahab, M. G., Fenton, K. E., & Stafford, P. 100(3), . *The ketogenic diet for the treatment of glioma: insights from genetic profiling*. *Epilepsy research*, 2012. **100**(3): p. 327-337.

140. Zuo, X., Wu, Y., Morris, J. S., Stimmel, J. B., Leesnitzer, L. M., Fischer, S. M., ... & Shureiqi, I. , *Oxidative metabolism of linoleic acid modulates PPAR-beta/delta suppression of PPAR-gamma activity*. *oncogene*, 2006. **25**(8): p. 1225-1241.
141. Varga, T., Czimmerer, Z., & Nagy, L. , *PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2011. **1812**(8): p. 1007-1022.
142. Staricha, K., Meyers, N., Garvin, J., Liu, Q., Rarick, K., Harder, D., & Cohen, S. , *Effect of high glucose condition on glucose metabolism in primary astrocytes*. *Brain research*, 2020. **1732**: p. 146702.
143. Sharma, I., Singh, A., Siraj, F., & Saxena, S., *IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma*. . *Journal of biomedical science*, 2018. **25**(1): p. 1-13.
144. Chang, C.Y., Li, M. C., Liao, S. L., Huang, Y. L., Shen, C. C., & Pan, H. C. , *Prognostic and clinical implication of IL-6 expression in glioblastoma multiforme*. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2005. **12**(8): p. 930-933.
145. Cavalheiro, V.J., Campos, A. C. P., Lima, L. G., Roça, C. T., Docema, M. F. L., Lancellotti, C. L. P., ... & Neville, I. S. , *Unraveling the peripheral and local role of inflammatory cytokines in glioblastoma survival*. *Cytokine*, 2023. **161**: p. 156059.
- 146.** Du, S., Wagner, N., & Wagner, K. D., *The emerging role of PPAR beta/delta in tumor angiogenesis*. *PPAR research*, 2020. **2020**.
147. Jin, L., Hua, H., Ji, Y., Jia, Z., Peng, M., & Huang, S. , *Anti-inflammatory role of fenofibrate in treating diseases*. . *Biomolecules and Biomedicine*., 2023.

148. Nickkho-Amiry, M., McVey, R., & Holland, C., *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Modulate Proliferation and Angiogenesis in Human Endometrial Carcinoma* *Actions of PPARs and Their Ligands in Endometrial Cancer*. . Molecular Cancer Research, 2012. **10**(3): p. 441-453.
149. Wilk, A., Wyczechowska, D., Zapata, A., Dean, M., Mullinax, J., Marrero, L., ... & Reiss, K. , *Molecular mechanisms of fenofibrate-induced metabolic catastrophe and glioblastoma cell death*. Molecular and cellular biology, 2015. **35**(1): p. 182-198.